



HAL
open science

Comprendre l'implication de familles d'effecteurs du champignon phytopathogène *Leptosphaeria maculans* dans l'infection du colza

Nacera Talbi

► **To cite this version:**

Nacera Talbi. Comprendre l'implication de familles d'effecteurs du champignon phytopathogène *Leptosphaeria maculans* dans l'infection du colza. Biologie végétale. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASB041 . tel-04224310

HAL Id: tel-04224310

<https://theses.hal.science/tel-04224310>

Submitted on 2 Oct 2023

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.

Comprendre l'implication de familles d'effecteurs du champignon phytopathogène *Leptosphaeria maculans* dans l'infection du colza

*Deciphering the involvement of effector families from the plant pathogenic
fungus *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape infection*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale 567 : Sciences du végétal : du gène à l'écosystème (SEVE)
Spécialité de doctorat : Sciences agronomiques
Graduate School : BioSphERA. Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche **BIOGER (Université Paris-Saclay, INRAE)**, sous la
direction d'Isabelle Fudal, Directrice de Recherche, INRAE - Université Paris-Saclay

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 28 juin 2022, par
Nacera TALBI

Composition du Jury

Jacqui SHYKOFF

Directrice de Recherche, CNRS-Université
Paris-Saclay

Présidente

Elodie GAULIN

Maître de Conférences HDR, Université
de Toulouse

Rapporteuse & Examinatrice

Thomas KROJ

Directeur de Recherche, INRAE-Université de
Montpellier

Rapporteur & Examineur

Bruno FAVERY

Directeur de Recherche, INRAE-Université Côte
d'Azur

Examineur

Isabelle FUDAL

Directrice de Recherche, INRAE - Université
Paris-Saclay

Directrice de thèse

Titre : Comprendre l'implication de familles d'effecteurs du champignon phytopathogène *Leptosphaeria maculans* dans l'infection du colza.

Mots clés : Pathogénèse, Effecteur, Avirulence, Famille multigénique, Structure tridimensionnelle, Résistance Spécifique

Résumé : Les organismes phytopathogènes sécrètent au moment de l'infection un ensemble de molécules collectivement regroupées sous le terme d'effecteurs, éléments clés de la pathogénie qui modulent l'immunité de l'hôte et facilitent l'infection. Un effecteur peut être reconnu par une protéine de résistance végétale, qu'on qualifiera alors de protéine d'avirulence (AVR). Les effecteurs fongiques ont généralement été décrits comme présentant peu ou pas d'homologies dans les bases de données. Cependant, ces dernières années, des familles d'effecteurs conservées entre les espèces fongiques ont pu être identifiées. C'est notamment le cas de *Leptosphaeria maculans*, l'ascomycète hémibiotrophe responsable de la nécrose du collet du colza, chez qui plusieurs protéines AVR appartiennent à des familles d'effecteurs. Ainsi, AvrLm10A et AvrLm10B, deux protéines AVR toutes deux nécessaires pour induire une reconnaissance par la protéine de résistance Rlm10, présentent quatre couples de paralogues chez *L. maculans*, ainsi que plusieurs homologues chez d'autres champignons phytopathogènes. De même, AvrLm3 et AvrLm5-9, présentent des homologies de séquence entre elles et ont également des homologues chez plusieurs champignons phytopathogènes. Sur ces bases, l'objectif de ma thèse était de caractériser fonctionnellement ces deux familles d'effecteurs.

AvrLm10A et AvrLm10B sont des gènes voisins organisés en orientation inverse. Les quatre paralogues du couple identifiés chez *L. maculans* sont retrouvés dans différents environnements génomiques mais partagent tous cette même organisation ainsi qu'une coexpression des deux gènes formant chaque couple. AvrLm10A présente des homologues chez 30 champignons phytopathogènes de la famille des Dothidiomycètes et des Sordariomycètes qui sont associés à au moins huit familles d'effecteurs putatifs distinctes, ce qui suggère une capacité d'AvrLm10A et de ses homologues à coopérer avec plusieurs familles d'effecteurs. Un des homologues d'AvrLm10A est l'effecteur SIX5 de *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici qui interagit physiquement avec l'effecteur Avr2 qu'il transporte de cellule à cellule via les plasmodesmes afin de promouvoir la virulence.

Nous avons mené des analyses fonctionnelles sur trois des couples de la famille AvrLm10 (AvrLm10A/AvrLm10B, Lmb_jn3_08094/Lmb_jn3_08095 et Lmb_jn3_09745/Lmb_jn3_09746), révélant une forte analogie structurale entre AvrLm10A et ses homologues ainsi que SIX5. Lmb_jn3_09745 et Lmb_jn3_09746, tout comme AvrLm10A et AvrLm10B, ont la capacité d'interagir physiquement. AvrLm10A et ses homologues sont également capables de transporter de cellule à cellule, non seulement leur protéine partenaire (à l'exception de Lmb_jn3_08094), mais également Avr2. AvrLm10A et Lmb_jn3_09745 pourraient intervenir lors de l'infection sur cotylédons en limitant le développement des macules. Enfin, Lmb_jn3_08095 serait capable d'inhiber fortement la PTI

AvrLm3 et AvrLm5-9 sont des gènes AVR très conservés dans les populations de *L. maculans*. Des homologues de ces gènes ont été identifiés chez d'autres champignons, dont un gène AVR de *Fulvia fulvum* ECP11-1 et des effecteurs de *F. oxysporum* et *Zymoseptoria ardabiliae*. J'ai montré qu'Ecp11-1 et un effecteur de *F. oxysporum* f.sp. narcissi étaient reconnus par Rlm3 et que cette reconnaissance était masquée par la présence du gène AVR AvrLm4-7. J'ai également identifié des acides aminés nécessaires à la reconnaissance d'AvrLm3 et d'Ecp11-1 par Rlm3.

Mes travaux ont permis de mettre en évidence la conservation protéique ou structurale de famille d'effecteurs pouvant potentiellement cibler les mêmes protéines végétales ou processus cellulaire, ou être reconnues par un même gène de résistance. Il s'agit d'une première étape vers le développement de résistances à large spectre permettant une reconnaissance multi-effecteurs et / ou multi-pathogènes, ou de diminuer la sensibilité du colza à l'infection.

Title : Deciphering the involvement of effector families from the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape infection

Keywords : Pathogenesis, effector, avirulence, multigene family, three-dimensional structure, specific resistance

Abstract : During infection, plant pathogens secrete a set of molecules collectively called effectors, key elements of pathogenesis that modulate host immunity and facilitate infection. An effector can be recognized by a plant resistance protein, which is then called an avirulence protein (AVR). Fungal effectors have generally been described as having few or no homologies in databases. However, in recent years, effector families conserved between fungal species have been identified. This is notably the case for the hemibiotrophic fungal *Leptosphaeria maculans*, causal agent of stem canker of oilseed rape, in which several AVR proteins belong to effector families. Thus, AvrLm10A and AvrLm10B, two AVR proteins both required to induce recognition by resistance protein Rlm10, have four paralogous pairs in *L. maculans*, as well as several homologs in other plant pathogenic fungi. Likewise, AvrLm3 and AvrLm5-9, display sequence homologies and also have homologs in several plant pathogenic fungi. The objective of my thesis was to functionally characterize these two effector families.

AvrLm10A and AvrLm10B are neighboring genes organized in reverse transcriptional orientation. All four paralogs identified in *L. maculans* are found in different genomic locations but all share the same organization and coexpression of the two genes forming each pair. AvrLm10A has homologs in 30 plant pathogenic fungi, in the Dothidomycetes and Sordariomycetes, which are associated with at least eight distinct putative effector families, suggesting an ability of AvrLm10A and its homologs to cooperate with multiple effector families. One of the AvrLm10A homologs is the effector SIX5 from *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, which physically interacts with the effector Avr2, transporting it from cell to cell via plasmodesmata to promote virulence.

I performed functional analyses on three of the AvrLm10 family pairs (AvrLm10A/AvrLm10B, Lmb_jn3_08094/Lmb_jn3_08095 and Lmb_jn3_09745/Lmb_jn3_09746), revealing a strong structural analogy between AvrLm10A and its homologs as well as SIX5. Lmb_jn3_09745 and Lmb_jn3_09746, like AvrLm10A and AvrLm10B, have the ability to physically interact. AvrLm10A and its homologs are also able to transport from cell to cell, not only their partner protein (except for Lmb_jn3_08094), but also Avr2. AvrLm10A and Lmb_jn3_09745 could be involved in infection of cotyledons and regulates fungal aggressiveness by restraining leaf lesion development. Finally, Lmb_jn3_08095 could strongly suppress PTI.

AvrLm3 and AvrLm5-9 are highly conserved AVR proteins in *L. maculans* populations. Homologues of these proteins have been identified in other fungi, including an AVR protein from *Fulvia fulvum* ECP11-1 and effectors from *F. oxysporum* and *Zymoseptoria ardabiliae*. I have demonstrated that Ecp11-1 and an effector from *F. oxysporum f.sp. narcissi* were recognized by Rlm3 and that this recognition was masked by the presence of the AVR gene *AvrLm4-7*. I also identified amino acids required for the recognition of AvrLm3 and Ecp11-1 by Rlm3.

My work has allowed to highlight the protein or structural conservation of effector families that can potentially target the same plant proteins or cellular processes, or be recognized by the same resistance gene. This is a first step towards the development of broad-spectrum resistances allowing a multi-effector and/or multi-pathogen recognition, or to decrease the susceptibility of oilseed rape to infection.

Remerciements

Mardi 5 septembre 2017, salle de cours de l'IPS2, des chercheurs étaient venus pour présenter des offres de stage... Et dès les cinq premières minutes de la journée, j'ai eu le coup de cœur... Un sujet, une scientifique, m'avaient tapé dans l'œil. Avec ma légendaire « confiance en moi », je ne m'étais donné aucune chance (c'était pourtant ma seule option !). Ce jour-là, je ne pensais pas que j'allais passer plus de trois ans à travailler sur un sujet qui me faisait rêver et pour lequel j'avais traversé la méditerranée... Aujourd'hui, presque quatre ans plus tard (Covid oblige), le temps est venu pour moi, de vous faire part de mes travaux de thèse et surtout de vous présenter mes remerciements

Alors, tout d'abord, mes plus sincères remerciements et ma plus grande gratitude vont à Isabelle Fudal, ma directrice de thèse. D'abord pour m'avoir fait confiance et avoir cru en moi. Je ne peux oublier la fameuse phrase que tu m'avais dite en attendant les résultats du concours « ***De tout façon, je n'ai pas prévu que tu n'aies pas le concours*** ». Sans, peut-être, le savoir, tu as fait de mon rêve, une réalité, de mon ambition, un projet et de mes sacrifices, une belle réussite. Merci, aussi, de m'avoir accompagnée durant ces années. Ton expérience et tes qualités scientifiques m'ont beaucoup apporté. Ton grand intérêt pour différentes approches scientifiques, différents organismes, ainsi que ton réseau créé avec des scientifiques de différents domaines ont fait en sorte que ma thèse englobe des aspects aussi différents que passionnants et j'en ressors enrichie scientifiquement.

Je remercie les membres du jury de thèse, Bruno Favery, Elodie Gaulin, Jacqui Shykoff et Thomas Kroj, d'avoir accepté d'accorder de leur temps à l'évaluation de mes travaux de thèse. Partager mes travaux de thèse et en discuter avec vous m'honore particulièrement. Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse, Benjamin Pêtre, Jeanne Ropars et Stella Cesari, qui m'ont aidé, de manière bienveillante, tout au long de cette thèse.

Je remercie, également, Sabine Fillingner, directrice de l'unité Bioger de m'avoir accueillie et permis de réaliser ces travaux au sein de l'unité.

Un grand merci à l'équipe EPLM pour l'accueil chaleureux, les pauses café et les débats originaux quelques fois, pour ne pas dire bizarres, mais aussi rigolos. C'était un réel plaisir d'intégrer cette équipe que j'espère réintégrer un jour.

Je remercie particulièrement Thierry Rouxel, qui, sans être mon encadrant, a bien suivi mon projet et qui était d'une grande aide dans la valorisation de mes résultats notamment dans la relecture des articles. Durant les premiers mois de la thèse, dans ma tête, c'était surtout... Mais qu'est-ce qu'il dit ?... Est-ce une blague ?... Oui c'est une blague, ouf ! je tiens à te dire que j'apprécie particulièrement ta franchise. Je ne vais pas dire que je ne suis pas quelqu'un de sensible (ou plutôt je ne fais pas semblant de ne pas l'être, car pour moi toute personne par définition à une certaine sensibilité) mais je sais très bien repérer les personnes bienveillantes, qui te poussent à aller vers le meilleur et tu en fais partie.

Merci à Jessica, Valérie, Mylène, Bénédicte, Angélique et Noémie pour votre soutien scientifique, moral et votre bonne humeur de tous les jours. Jessica! Je compte sur toi pour me sortir de prison si on m'attrape en train de faire mes courses (private joke).

Merci à Françoise et Laurent qui m'ont apporté une aide très précieuse pour les transformations Lepto, surtout lors du gros confinement. Grâce à vous, plusieurs résultats intéressants ont vu le jour. Merci à Michel pour toutes tes différentes réponses " en question" à mes questions.

Merci aux différentes super héroïnes du labo : à l'adorable Julie, la défenseuse des égalités, Audren la sauveuse de la planète, Laetitia (littéralement) la sauveuse des vies, Mathilde la justicière et enfin Tinh-Suong, on ne te la pas dit mais j'avais besoin d'une thérapeute, c'est pour ça que tu es là, pas pour le poste de chercheuse. C'est un réel plaisir de vous avoir connues (Croyez moi, j'aurais aimé vous connaître bien avant), d'avoir partagé avec vous de très bons moments, entre discussions philosophiques, drôles et décalées et par moment juste pour râler de quelque chose (j'espère pouvoir encore partager de bons moments avec vous, même si je ne serai plus là au quotidien).

Je souhaite remercier tous les membres de l'unité Bioger, notamment Jean-Felix, Kaori, Nico, les deux Anais et Alicia qui m'ont bien aidé à différentes étapes de la thèse, mais aussi tous les autres membres de l'unité pour leur gentillesse, bienveillance et sourires, notamment Selma, Anne-lise. Je remercie aussi les anciens membres, ceux qui sont partis vers d'autres aventures, notamment Yohann, Claire-Line et Elise.

Je suis incapable de citer tout le monde et j'en ai certainement oublié certains, ce qui ne remet pas en question ma reconnaissance envers eux. Je remercie donc toutes les personnes ayant participé de près ou de loin au bon déroulement de ma thèse, que ce soit du côté scientifique ou du côté humain.

Et le meilleur pour la fin ! Je tiens à remercier les personnes les plus importantes de ma vie et sans qui, je n'aurais jamais pu réaliser tout ça... ma petite famille.

Ma chère maman Nedjma (qui veut dire littéralement l'étoile en français) ma précieuse,

Mon papa Abdelghani, celui qui croit en moi plus que je ne crois en moi-même,

Je remercie mon petit frère Hadji et ma belle-sœur Laetitia, mon petit soutien au quotidien.

Un grand merci à ma petite sœur, Lilia, avec qui l'aventure «France» a commencé et continue et qui sait vraiment (pour de vrai) en quoi consiste mon travail même si pour elle la biologie ne vaut pas les mathématiques « Ah la biologie, rien n'est vrai pour l'ensemble \mathbb{R} ».

Enfin, à Riadh, parce que ma pudeur m'empêche d'exprimer certaines choses, je me contente de te dire merci pour tout ce que tu es et tout ce que tu fais de moi.

Merci à tous!

Nacera

Table des matières

<i>Introduction bibliographique</i>	1
Introduction à la phytopathologie	2
I.1. Les maladies des plantes	2
I.2. L'impact des épidémies sur les systèmes culturaux	2
I.3. Les modes de vie des agents phytopathogènes et les interactions associées	4
II. Déterminants moléculaires des interactions plantes / agents pathogènes	6
II.1. Le « zig-zag » des interactions moléculaires plante-pathogène	7
II.2 Les effecteurs	15
III. Facteurs impliqués dans l'immunité végétale	44
III.1. Les protéines de résistance	45
III.2. La reconnaissance des effecteurs par les protéines de résistance	46
III.3. La suppression de l'ETI, résultat de la coévolution plante / agent pathogène	50
III.4 Stratégies de gestion des résistances pour augmenter leur durabilité	54
IV. Le pathosystème <i>Leptosphaeria maculans</i> / <i>Brassica napus</i>	56
IV.1 <i>Brassica napus</i>	56
IV.2. <i>Leptosphaeria maculans</i>	59
V. Objectifs de la thèse	67
<i>Chapitre I</i>	71
<i>Caractérisation de la famille multigénique AvrLm10</i>	71
Introduction	72
<i>Article 1</i>	74
<i>The neighboring genes AvrLm10A and AvrLm10B are part of a large multigene family of cooperating effector genes conserved in Dothideomycetes and Sordariomycetes</i>	74
<i>Chapitre II</i>	130
<i>Caractérisation fonctionnelle de la famille AvrLm10A/AvrLm10B</i>	130
Introduction	131
Résultats	134
Matériels et méthodes	158
Discussion	162
<i>Chapitre III</i>	168
<i>Caractérisation de la famille structurale AvrLm3, AvrLm4-7 et AvrLm5-9</i>	168
Introduction	169
<i>Article 2</i>	171

<i>A new family of structurally conserved fungal effectors displays epistatic interactions with plant resistance proteins</i>	171
<i>Article 3</i>	211
<i>Molecular investigation of the broad-spectrum resistance Rlm3 from oilseed rape against fungal pathogens</i>	211
<i>Discussion et perspectives</i>	252
<i>Annexes</i>	275
<i>Références</i>	278

Liste des figures

Figure 1. Symptômes causés par des champignons phytopathogènes	4
Figure 2. Stratégies de colonisation de la plante par les champignons phytopathogènes présentant divers modes de vie.....	6
Figure 3. Le modèle en Zig-Zag des interactions moléculaires plantes-parasites.....	7
Figure 4. Exemples de récepteurs PRR et leur interaction avec des PAMP issus de différents agents pathogènes et des DAMP issus de dommages infligés à la plante.....	9
Figure 5. Représentation schématique des interactions plante-pathogène.....	11
Figure 6. Comparaison du modèle en zig-zag et du modèle d'invasion.....	13
Figure 7. Modèle proposant une adaptation du modèle en zig-zag pour la reconnaissance des effecteurs aposplastiques.....	14
Figure 8. Comparaison des interactions génétiques gène-pour-gène et gène-pour-gène inverse.	15
Figure 9. Diverses méthodes de caractérisation des effecteurs de champignons phytopathogènes	21
Figure 10. Caractéristiques des effecteurs putatifs chez divers champignons phytopathogènes (D'après Jaswal <i>et al.</i> , 2020).....	23
Figure 11. Exemples de localisations des gènes codant d'effecteurs au sein des génomes de champignons pathogènes.....	26
Figure 12. Différents systèmes de transport des effecteurs chez les agents pathogènes filamenteux et les bactéries.	29
Figure 13. Exemples de localisation subcellulaire d'effecteurs fongiques.	32
Figure 14. Structures d'effecteurs d'oomycètes et de champignons phytopathogènes.....	36
Figure 15. Exemples de mode et site d'action des effecteurs fongiques.	38
Figure 16. « Birth and death » : évolution des effecteurs.....	42
Figure 17. L'évolution des effecteurs permet d'optimiser leur fonction (à gauche) ou d'échapper à la reconnaissance (à droite).....	44
Figure 18. Principales classes de protéines de résistance.....	46
Figure 19. Les différents modèles de reconnaissance des effecteurs par les protéines de résistance.....	48
Figure 20. Scénarios expliquant l'évolution des interactions hôte-pathogène.....	51
Figure 21. Différents mécanismes responsables de l'évolution des agents pathogènes vers la virulence.....	53

Figure 22. Résistance durable grâce au ciblage de gènes codant des effecteurs conservés localisés dans le génome central.	55
Figure 23. Croisements interspécifiques entre espèces de Brassicaceae.	57
Figure 24. Cycle de vie de <i>Leptosphaeria maculans</i>	60
Figure 25. Exemple de structure en isochores du génome de <i>L. maculans</i>	62
Figure 26. Profils d'expression des gènes codant des effecteurs connus ou putatifs de <i>L. maculans</i> lors de la colonisation du colza.	65
Figure 27. Prédiction de la structure 3D d'AvrLm10A, Lmb_jn3_08094, Lmb_jn3_09745 et SIX5 et alignement de leurs séquences protéiques basé sur leurs structures.	135
Figure 28. Prédiction de la structure 3D d'AvrLm10B, Lmb_jn3_08095 et Lmb_jn3_09746 et comparaison avec la structure d'Avr2.	137
Figure 29. AvrLm10A et AvrLm10B ainsi que Lmb_jn3_09745 et Lmb_jn3_09746 co-localisent au niveau des plasmodesmes.	139
Figure 31. Transformation transitoire médiée par <i>Agrobacterium</i> de plusieurs cellules dans un modèle de type mosaïque.	140
Figure 32. AvrLm10A et Lmb_jn3_09745 sont capables de transporter leurs partenaires de cellule à cellule dans <i>N. benthamiana</i>	142
Figure 33. AvrLm10A, Lmb_jn3_09745 et Lmb_jn3_08094 sont capables de transporter AVR2 de cellule à cellule dans <i>N. benthamiana</i>	145
Figure 34. Suppression de la mort cellulaire induite par BAX chez <i>Nicotiana benthamiana</i> par Lmb_jn3_08094, Lmb_jn3_08095, Lmb_jn3_09745, Lmb_jn3_09746.	147
Figure 35. Niveau relatif des ROS produites suite à un traitement par flg22 dans des feuilles de <i>N. benthamiana</i> exprimant différents effecteurs candidats.	149
Figure 36. Production de mutants CRISPR-Cas9 inactivés pour AvrLm10A, Lmb_jn3_08094 et Lmb_jn3_09745 dans un fond génétique JN3.	151
Figure 37. Production de mutants CRISPR-Cas9 inactivés pour AvrLm10B, Lmb_jn3_08095 et Lmb_jn3_09746 dans un fond génétique V41-2-24.	152
Figure 38. Les transformants inactivés pour AvrLm10A ou AvrLm10B sont virulents vis-à-vis de Rlm10.	153
Figure 39. Boxplot représentant les médianes de taille de lésions provoquées par les transformants mutés pour les gènes AvrLm10A, Lmb_jn3_09745, AvrLm10B et Lmb_jn3_09746.	155
Figure 40. Effet de l'inactivation de Lmb_jn3_08094 et Lmb_jn3_08095 sur la capacité de <i>L. maculans</i> à infecter les tiges de colza.	157

Figure 41. Modèles illustrant les interactions effecteur-effecteur.....	267
---	-----

Liste des tableaux

Tableau 1. Relations gène-pour-gène connues entre <i>L. maculans</i> et <i>B. napus</i>	64
Tableau 2. Comptage des événements de transport de cellule à cellule.....	143
Tableau 3. Liste des structures d'effecteurs fongiques résolues et disponibles dans la base de données PDB. (Amoozadeh et al., 2021)	262
Tableau S. Amorces utilisées dans le chapitre II.	276

Introduction bibliographique

Introduction à la phytopathologie

I.1. Les maladies des plantes

La maladie d'une plante correspond à une altération anormale et significative de ses fonctions. En phytopathologie, on étudie les maladies qui sont notamment causées par des agents phytopathogènes. De ce fait, il est important de distinguer les maladies dues à des agents pathogènes des maladies physiologiques, souvent considérées comme des pseudo-maladies et qui sont dues à des facteurs abiotiques liés à des conditions environnementales défavorables pour la plante (carences nutritives, irrigation ou ensoleillement inadaptés, etc.). La distinction entre une maladie causée par un agent pathogène et une maladie physiologique n'est pas toujours évidente.

Les maladies des plantes peuvent être causées par huit groupes d'organismes différents: les plantes parasites, les bactéries, les virus, les particules viroïdes, les nématodes, les insectes, les oomycètes et les champignons. Malgré cette grande diversité d'agent bio-agresseurs et l'aspect vulnérable de la plante, les maladies des plantes, bien que pouvant avoir des conséquences désastreuses, semblent être des exceptions dans les interactions plantes-pathogènes (Gilbert, 2007). En effet, il est possible de distinguer deux catégories d'interactions plantes-pathogènes: l'interaction « non-hôte » et l'interaction « hôte ». L'interaction « non-hôte » implique une incompatibilité fondamentale entre espèce végétale et agent pathogène, puisque la plante n'est pas un hôte et l'agent pathogène ne peut infecter cette plante (Nürnberg et Lipka 2005). Cette incompatibilité est la forme la plus commune chez les plantes et elle est due à de multiples facteurs tels que les conditions environnementales ou le stade de développement de l'hôte et/ou de l'agent pathogène (Panstruga et Moscou 2020).

Les moyens de lutte contre les agents phytopathogènes comprennent: (i) la lutte culturale qui correspond à l'utilisation de pratiques visant principalement à diminuer l'inoculum primaire telles que les rotations ou les associations, (ii) la lutte chimique qui correspond à l'utilisation de produits phytosanitaires d'origine chimique, (iii) la lutte biologique qui correspond à l'utilisation de produits naturels ou de microorganismes auxiliaires et (iv) la lutte génétique qui consiste en l'utilisation de variétés résistantes issues de programmes d'amélioration végétale.

I.2. L'impact des épidémies sur les systèmes cultureux

Maximiser les rendements, tel est le slogan de l'agriculture moderne. Il s'agit d'un système d'agriculture intensive qui a pour principal objectif de satisfaire les demandes en

produits alimentaires d'une population mondiale à croissance rapide, faisant souvent l'impasse sur la qualité des produits. L'optimisation des systèmes agricoles améliore la productivité mais augmente en parallèle la vulnérabilité des plantes aux agents pathogènes qui est accentuée par des pratiques agricoles telles que les monocultures, la sélection intensive, le travail du sol et la fertilisation (Yarwood, 1970; Stukenbrock et McDonald, 2008)

Les maladies des plantes entraînent une perte annuelle estimée à 10-15% des principales cultures mondiales (Al-Sadi *et al.*, 2017). 70 à 80 % des maladies des plantes sont causées par des champignons pathogènes. Les maladies fongiques affectent fortement le rendement et la qualité des cultures, et représentent un important goulot d'étranglement pour le développement d'une agriculture durable (Marin-Menguiano *et al.*, 2019). Certaines maladies ne sont pas causées par un seul agent pathogène, mais sont le résultat de la synergie de plusieurs agents pathogènes (Chatterjee *et al.*, 2016). Au cours de la longue histoire évolutive des plantes et des champignons pathogènes, des relations hautement spécialisées et complexes se sont formées, créant un modèle de sélection mutuelle et de co-évolution. Par conséquent, avec l'émergence continue de nouvelles variétés et l'évolution rapide des champignons pathogènes, les relations plantes / champignons pathogènes ont également changé (Quintanilha-Peixoto *et al.*, 2019).

Les agents phytopathogènes provoquent des dégâts sur les plantes de grande culture, les espèces potagères, mais également les cultures pérennes, et peuvent atteindre différents organes tels que les racines, les feuilles, les tiges, les fruits et les graines (Figure 1). Les grandes cultures, telles que le blé et le riz, peuvent être fortement impactés par certains organismes phytopathogènes, tels que *Magnaporthe oryzae* et *Puccinia graminis* qui peuvent induire des pertes allant jusqu'à 35% et 70% du rendement respectivement. Le plus gros impact d'un agent phytopathogène reste celui dû à l'oomycète *Phytophthora infestans*, l'agent responsable du mildiou de la pomme de terre, responsable en 1845 de la plus grande famine de l'histoire de l'Europe (particulièrement en Irlande). Les produits agricoles peuvent également être touchés par des agents pathogènes après récolte, lors du stockage, induisant des pertes allant jusqu'à 50%. C'est le cas de la pomme qui est souvent sujette aux maladies post-récolte (Dutot *et al.*, 2013). En plus d'impacter les cultures, certains agents pathogènes sont capables de produire des toxines dangereuses pour la santé humaine et animale. C'est notamment le cas de plusieurs espèces du genre *Fusarium* qui produisent des mycotoxines lors de l'infection de l'hôte (Polak-Śliwińska & Paszczyk, 2021).

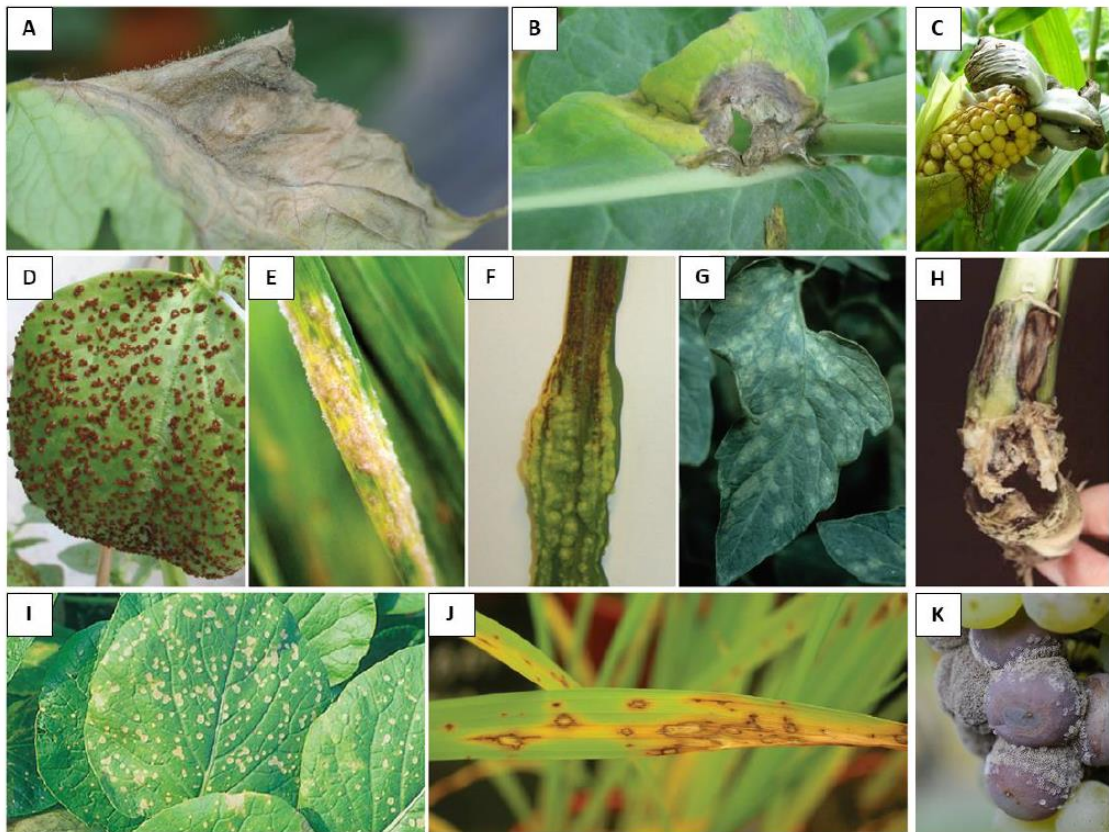


Figure 1. Symptômes causés par des champignons phytopathogènes

(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 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 l'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]). ^[1] Auteur K. Hirdes. Disponible à l'adresse https://fr.m.wikipedia.org/wiki/Fichier:Ustilago_maydis_de_1.jpg, ^[2]Auteur D. Blancard. Disponible à l'adresse <http://ephytia.inra.fr/fr/C/6979/Vigne-Principaux-symptomes>

I.3. Les modes de vie des agents phytopathogènes et les interactions associées

Les champignons phytopathogènes ont des modes de vie variés et déploient différentes stratégies d'infection pour interagir avec leurs plantes hôtes (Figure 2). On peut ainsi distinguer les champignons nécrotrophes, biotrophes et hémibiotrophes qui diffèrent non seulement dans leurs modes de vie et leurs stratégies infectieuses mais également dans la gamme de plantes hôtes qu'ils peuvent infecter.

Les champignons biotrophes

Les champignons biotrophes se développent dans des plantes vivantes sans détruire les tissus. Ils se trouvent souvent dans les espaces intracellulaires de l'hôte. Ces champignons se nourrissent, donc, par la mobilisation et le détournement des ressources issues du métabolisme primaire de l'hôte (Figure 2). Des structures spécialisées telles que des haustoria sont utilisées lors de la nutrition permettant une plus grande surface d'échange avec la plante hôte. Ces structures sont retrouvées chez de nombreux agents pathogènes tels que *Blumeria graminis* ou *Puccinia* sp. (Spanu et Panstruga, 2017)

Les champignons nécrotrophes

Contrairement aux champignons biotrophes, les champignons nécrotrophes détruisent les tissus de la plante hôte et se nourrissent des molécules issues de cette dégradation (Figure 2). Les champignons nécrotrophes, tels que *Botrytis cinerea* ou *Alternaria* sp., utilisent un arsenal d'enzymes dédiées à la dégradation de la paroi des cellules végétales pour se nourrir (van Kan, 2006). Si, dans le cas des champignons biotrophes, l'activation des réponses immunitaires de la plante représente une menace pour leur survie dans l'hôte, les champignons nécrotrophes profitent de certains mécanismes de défense de l'hôte tel que la « mort cellulaire programmée » qui active une autodestruction des tissus végétaux et offre un environnement propice à leur développement (Dickman *et al.*, 2013) (Figure 2).

Les champignons hémibiotrophes

Les cycles infectieux des champignons hémibiotrophes sont caractérisés par la succession d'une étape de colonisation biotrophe suivie par une étape de colonisation nécrotrophe, voire par la succession de plusieurs phases de vie biotrophe et nécrotrophe (Figure 2). La phase biotrophe se caractérise, comme chez les biotrophes stricts, par un développement mycélien asymptotique parfois associé au développement de structures spécialisées dans les échanges avec la plante. Le passage de la phase biotrophe à la phase nécrotrophe est plus ou moins longue, allant de quelques heures à plusieurs jours, et dépend des agents pathogènes en question. Par exemple, chez *Colletotrichum higginsianum*, la transition biotrophie / nécrotrophie se fait 40 heures après l'inoculation (O'Connell *et al.*,

2012), alors que chez *Leptosphaeria maculans*, elle apparaît après 9 jours d'infection (Haddadi *et al.*, 2016).

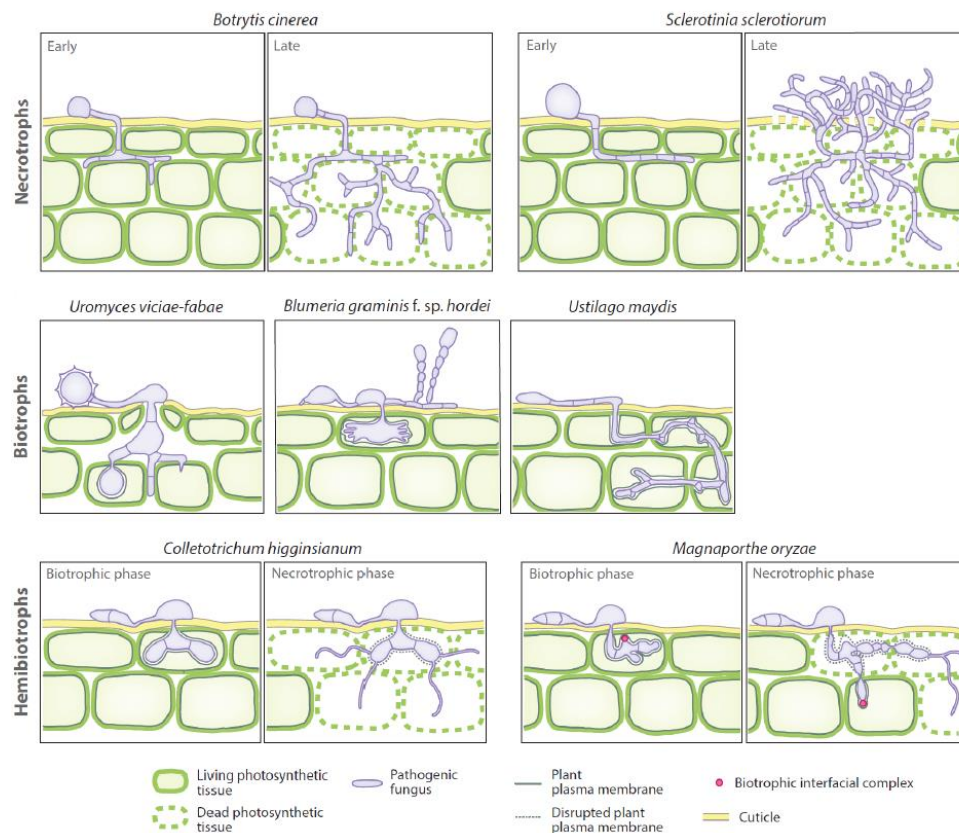


Figure 2. Stratégies de colonisation de la plante par les champignons phytopathogènes présentant divers modes de vie

Les champignons nécrotrophes tuent les cellules végétales en sécrétant des protéases et des métabolites toxiques. Les champignons biotrophes forment, ou non selon les espèces, un haustorium permettant au champignon de se nourrir en détournant le métabolisme de l'hôte. Les champignons hémi-biotrophes commencent leur cycle infectieux par une phase de vie biotrophe puis deviennent nécrotrophes (D'après Lo Presti *et al.*, 2015)

II. Déterminants moléculaires des interactions plantes / agents pathogènes

Si les barrières physiques (cuticules, épines...) qui représentent le premier niveau de défense des plantes échouent à repousser les agents pathogènes, un dialogue moléculaire est alors engagé, impliquant le système immunitaire végétal à différents niveaux.

II.1. Le « zig-zag » des interactions moléculaires plante-pathogène

Intégré au sein de chaque cellule, le système immunitaire végétal possède ses propres récepteurs, voies de signalisation et mécanismes de défense (Spoel et Dong, 2012). Le système immunitaire végétal tel qu'il a été proposé par Jones et Dangl (2006) repose sur un système à deux niveaux appelé « modèle en zig-zag ». Ce modèle évolutif et fonctionnel résume les différents niveaux de défense des plantes face aux agents pathogènes et l'évolution de ceux-ci dans le cadre d'une coévolution plante-agent pathogène. En effet, le modèle en zigzag comprend quatre phases, les trois premières phases représentant la chronologie d'une unique infection localisée (pouvant s'interrompre à n'importe quelle phase selon le niveau de résistance de la plante et de virulence de l'agent pathogène), alors que la quatrième phase illustre les interactions moléculaires à l'échelle micro-évolutive. De plus, le modèle permet de faire la distinction entre les défenses basales de la plante, à large spectre de résistance, et les défenses spécifiques, activées par la reconnaissance d'un agent pathogène en particulier (Figure 3)

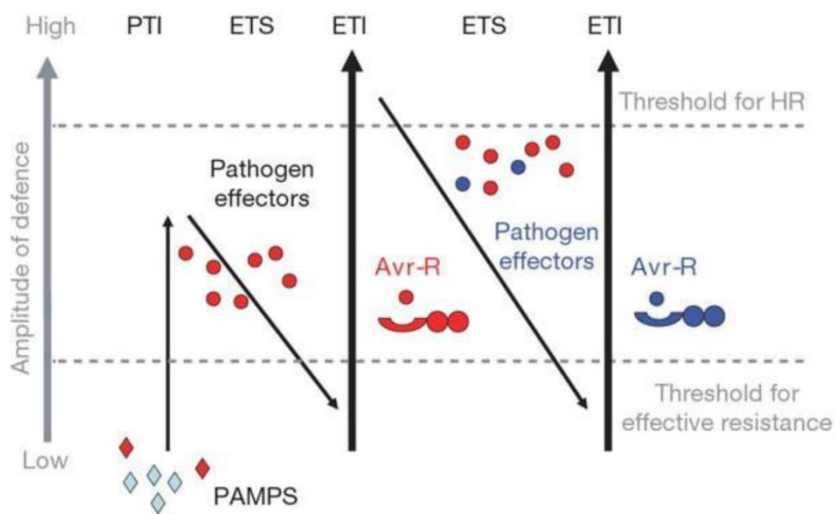


Figure 3. Le modèle en Zig-Zag des interactions moléculaires plantes-parasites.

Ce modèle de l'immunité végétale est constitué de quatre phases. La première phase consiste en la reconnaissance par la plante de molécules très conservées des agents pathogènes appelées Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs). Cette phase est qualifiée de PTI (PAMP-Triggered Immunity). Certains agents pathogènes adaptés sont capables de contourner la PTI en employant une classe de molécules qualifiées d'effecteurs, déclenchant la deuxième phase de ce modèle : l'ETS (Effector-Triggered Susceptibility). Les plantes résistantes possèdent des protéines de résistance (R)

qui reconnaissent un effecteur donné et déclenchent l'ETI (Effector-Triggered Immunity). L'agent pathogène peut supprimer l'ETI via différents moyens et rétablir l'ETS. La coévolution entre la plante et son agent pathogène entraîne une « course aux armements » qui peut induire plusieurs cycles d'ETI/ETS à l'échelle évolutive. L'amplitude des réactions de défense associées aux phases de PTI et ETI diffèrent, comme indiqué sur le graphique avec deux seuils pour la mise en place d'une résistance effective contre un agent pathogène. (Adapté de Jones et Dangl, 2006).

a) *La PTI (PAMP-Triggered Immunity)*

La PTI, défense basale à large spectre représentée par la première phase du modèle en zig-zag, est déclenchée suite à la reconnaissance de molécules conservées chez les agents pathogènes (et même symbiotiques) appelées Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP) ou Microbe-Associated Molecular Patterns (MAMP) ou encore suite à des modifications cellulaires induites par l'agent pathogène lors de l'infection appelées Damage-Associated Molecular Patterns (DAMP). Si la reconnaissance des DAMP est complètement aspécifique puisque ceux-ci sont issus des dommages causés aux cellules végétales (Heil, 2009), la reconnaissance des PAMP (et MAMP) qui correspondent généralement à des composés microbiens constitutifs extracellulaires (par ex. la chitine chez les champignons ou la flagelline chez les bactéries), se fait de façon plus ou moins spécifique (Cook *et al.*, 2015 ; Dodds et Rathjen, 2010). Par exemple, le facteur d'élongation EF-Tu est reconnu seulement par les plantes de la famille des Brassicaceae (Kunze *et al.*, 2004). La reconnaissance de ces différentes molécules par les plantes se fait par des récepteurs localisés au niveau de la membrane plasmique (Pattern Recognition Receptors ; PRR). Les PRR sont classés, selon la nature des domaines protéiques présents, en deux sous-familles : les RLP (Receptor-Like Proteins) et RLK (Receptor-Like Kinases) qui peuvent présenter des structures et des fonctions différentes (Boutrot et Zipfel, 2017). En pratique, l'ensemble des PRR sont des protéines membranaires comprenant un domaine transmembranaire, ainsi qu'un domaine N-terminal qui interagit avec le PAMP. Cette partie N-terminale comporte généralement un motif conservé, tel que le domaine LysM contenant des motifs lysine, ou le domaine LRR (Leucine-Rich Repeat) contenant des motifs Leucine (Tör *et al.*, 2009 ; Monaghan et Zipfel, 2012 ; Figure 4) . On retrouve parfois un domaine C-terminal intra-cytoplasmique responsable de la transduction du signal, tel qu'un domaine kinase. Le couple PAMP/PRR formé par le peptide flg22 (constituant de la flagelline bactérienne) et le récepteur correspondant FLS2 chez *A. thaliana* est le plus étudié et le mieux caractérisé (Boller et Felix, 2009). FLS2 est un

PRR comprenant un domaine N-terminal de type LRR et un domaine C-terminal qui présente une activité sérine/thréonine kinase qui, au contact de flg22, dimérise avec un autre récepteur membranaire LRR-RLK appelé BAK1 qui déclenche les réactions de défense subséquentes (Figure 4)

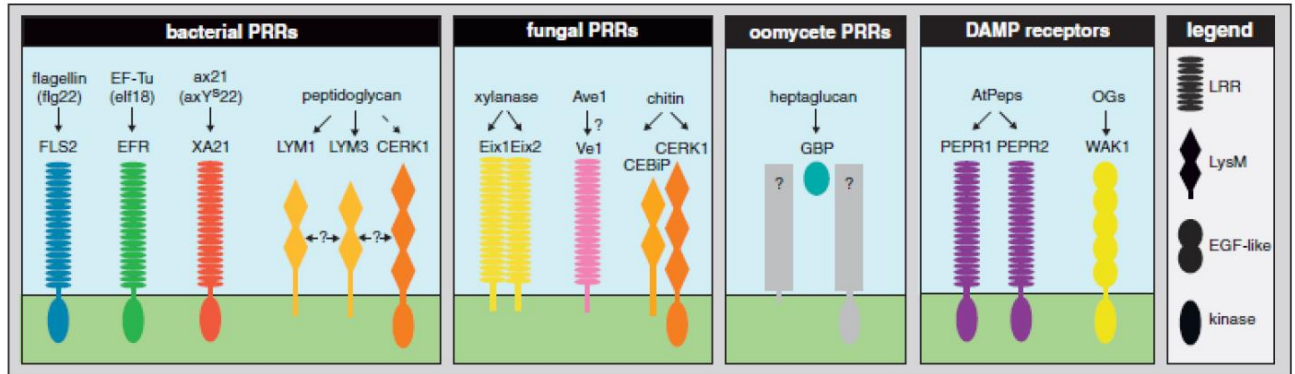


Figure 4. Exemples de récepteurs PRR et leur interaction avec des PAMP issus de différents agents pathogènes et des DAMP issus de dommages infligés à la plante.

Les PRR (Pattern-Recognition Receptor) sont des récepteurs membranaires de type Receptor-Like Proteins (RLP) ou Receptor-Like Kinases (RLK). Ils comportent un domaine transmembranaire (ou une ancre GPI - glycosyl-phosphatidylinositol) et un domaine N-terminal extracellulaire responsable de la reconnaissance des PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns). Ce domaine N-terminal peut être un domaine riche en leucine LRR (Leucine-Rich Repeat), ou encore un domaine LysM. Les RLK possèdent également un domaine intracellulaire à activité kinase impliqué dans la transduction du signal. (Adapté de Monaghan et Zipfel, 2012).

Suite à la reconnaissance par les PRR, une cascade de signalisation est déclenchée induisant des réponses à plusieurs niveaux. Une réaction physique, qui se traduit par une fermeture stomatique, est déclenchée pour limiter la pénétration des agents pathogènes. D'un point de vue moléculaire, des espèces réactives de l'oxygène (ROS) possédant des effets toxiques sont générées et des composés antimicrobiens tels que les protéines PR (Pathogenesis-Related) et des défensines sont sécrétés pour limiter la progression de l'infection. Des cascades de phosphorylation, une entrée de calcium dans la cellule, une activation de facteurs de transcription et de gènes de défense, ainsi que l'accumulation de métabolites toxiques pour les bio-agresseurs peuvent être observés. Enfin, une mort cellulaire programmée, appelée réponse hypersensible (Hypersensitive Response ; HR), peut parfois être observée au site de l'infection (Bigéard *et al.*, 2015; Cook *et al.*, 2015), limitant la progression de l'agent pathogène. Grâce à la PTI, les plantes arrivent à résister à la plupart des agents pathogènes non adaptés.

b) L'ETI (Effector-Triggered-Immunity)

Le second niveau de résistance, développé par les plantes pour contrer des agents pathogènes adaptés et capables de contourner la PTI, est plus spécifique et lié à la détection d'effecteurs produits par ces agents pathogènes (cf. chapitre 1 partie II.2). Cette reconnaissance suit généralement une relation dite « gène-pour-gène», initialement mise en évidence par Flor (1971) lors de ses travaux sur la rouille du lin, causée par le champignon *Melampsora lini*, et selon laquelle : à un gène d'avirulence (AVR) de l'agent pathogène correspond un gène de résistance (R) de la plante (cf. chapitre I partie III.1). Cette reconnaissance, qu'elle se fasse par une interaction directe ou indirecte entre les protéines R et Avr, déclenche une forte réponse immunitaire de la plante, appelée Effector-Triggered-Immunity (ETI), se traduisant généralement par une HR. La progression des agents pathogènes est alors stoppée et l'interaction est qualifiée d'« incompatible ». A l'inverse, lorsque la protéine R ou/et Avr est absente, l'infection se poursuit et l'interaction est dite « compatible » (**Figure 5**).

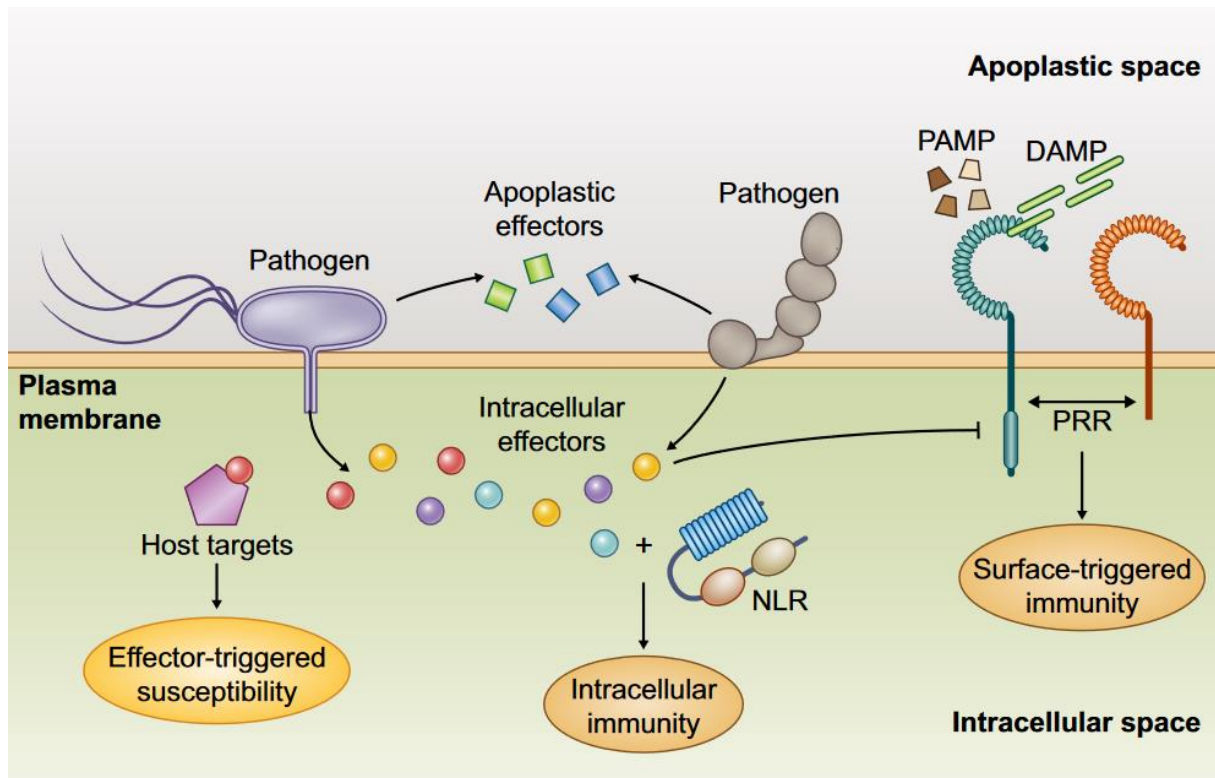


Figure 5. Représentation schématique des interactions plante-pathogène.

Les récepteurs de reconnaissance de motifs (PRR) localisés au niveau de la membrane plasmique des plantes reconnaissent les motifs moléculaires associés aux micro-organismes (MAMP) et les motifs moléculaires associés aux dommages causés à l'hôte (DAMP), déclenchant une signalisation de défense basale conduisant à une immunité 'de surface'. Pour échapper à ce premier niveau de défense, les agents pathogènes sécrètent des effecteurs à l'extérieur ou à l'intérieur des cellules qui, en se liant à diverses cibles hôtes, peuvent supprimer l'immunité de 'surface', entraînant une sensibilité de la plante. Un deuxième niveau de défense peut alors intervenir, les plantes codant des récepteurs immunitaires intracellulaires appelés NLR (Nucleotide-Binding Site Leucine-Rich-Repeat), qui reconnaissent les effecteurs cytoplasmiques, ce qui entraîne une immunité intracellulaire (à noter que les effecteurs apoplastiques peuvent, eux, être reconnus par des protéines de résistance membranaires) (Adapté de Mukhi *et al.*, 2020).

c) Les limites du modèle en zig-zag et de la relation gène-pour-gène

Le modèle en zig-zag, comme tout modèle, présente des limites et des exceptions. Ainsi, il lui est notamment reproché de définir une séparation trop stricte entre la PTI et l'ETI, et de représenter la PTI comme peu dynamique, impliquant d'une part que les PAMP sont stables et conservés et d'autre part que les PRR évoluent peu. Cependant, il existe des exceptions au schéma binaire qui associe PAMP et PTI d'une part et effecteurs et ETI d'autre part. Ainsi, pour la flagelline, qui est très conservée chez les bactéries et qui est considérée comme un PAMP induisant la PTI, un variant (flgII-28) a été identifié chez certains pathovars de *Pseudomonas syringae*. Ce variant n'est pas reconnu par toutes les Solanacées, qui

habituellement reconnaissent la flagelline flg22 (Cai *et al.*, 2011; Clarke *et al.*, 2013). A l'inverse, certains effecteurs comme les NLP (Necrosis and ethylene-inducing peptide : Nep1-like proteins) sont très conservés à la fois chez des bactéries, des oomycètes et des champignons. De plus, une étude a pu identifier une région de 20-24 acides aminés chez des NLPs (nommées respectivement nlp20 et nlp24) qui sont capables d'induire la PTI comme des PAMP (Böhm *et al.*, 2014; Oome & Van Den Ackerveken, 2014). Aussi, en plus de leur rôle décrit initialement dans la reconnaissance des PAMPs (Medzhitov, 2009), il a été proposé que les PRR reconnaissent directement ou indirectement des effecteurs produits par les agents pathogènes apoplastiques (Win, *et al.*, 2012).

Ainsi, d'autres modèles ont été proposés dont celui de Cook *et al.* (2015), appelé le modèle d'invasion (IM, Invasion Model) impliquant des récepteurs de motifs d'invasion (IPR, Invasion Pattern Receptors) qui reconnaissent des motifs d'invasion (IP, Invasion Patterns) (Figure 6). Le modèle de Stotz *et al.* (2014), quant à lui, définit le concept d'ETD (défense déclenchée par les effecteurs) qui permet de mieux comprendre les réponses de défense induites par les agents pathogènes apoplastiques (Figure 7)

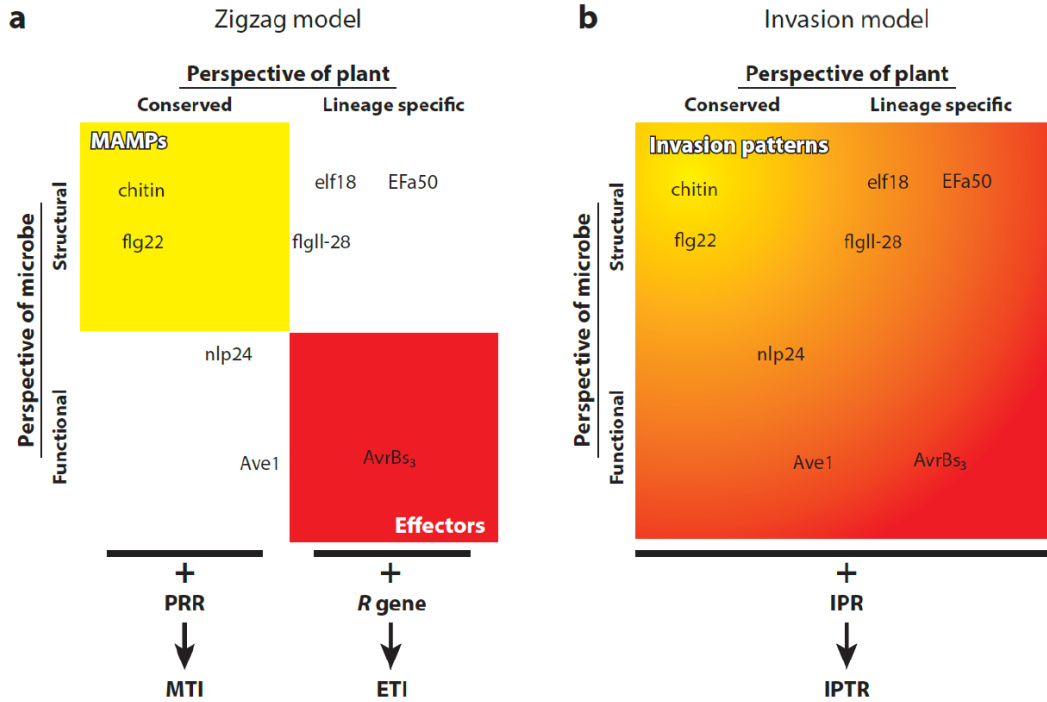


Figure 6. Comparaison du modèle en zig-zag et du modèle d'invasion.

(a) Le modèle en zig-zag sépare d'un côté la MTI (MAMP-Triggered Immunity, en jaune) qui est due à la reconnaissance de MAMP/PAMPs par des PRR et de l'autre côté l'ETI (Effector-Triggered Immunity, en rouge) qui est due à la reconnaissance directe ou indirecte d'effecteurs par des protéines de résistance. Certaines interactions moléculaires 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).

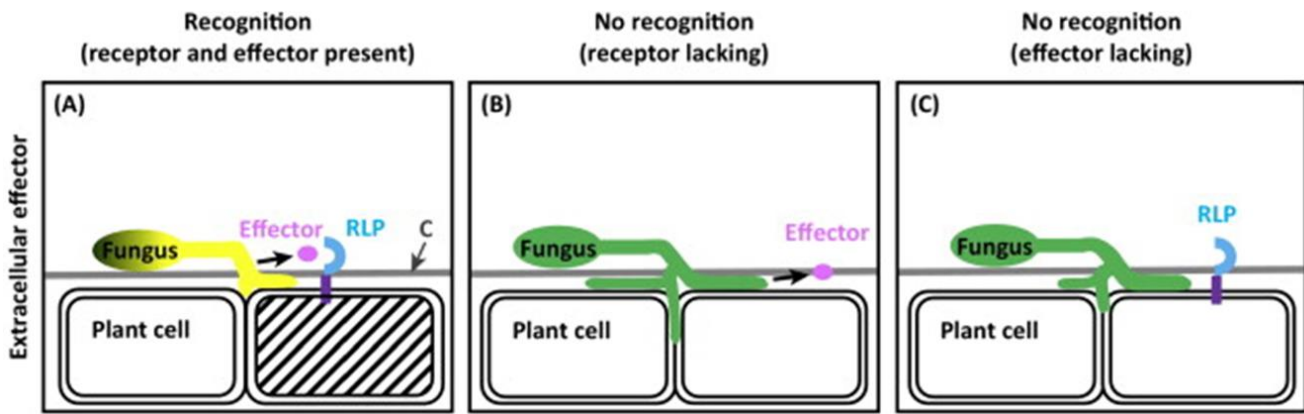


Figure 7. Modèle proposant une adaptation du modèle en zig-zag pour la reconnaissance des effecteurs aposplastiques.

(A) (B) (C) illustrent le cas des effecteurs aposplastiques : (A) La reconnaissance d'un effecteurs aposplastique par un gène de la résistance « R » membranaire entraîne des interactions incompatibles avec les agents pathogènes fongiques aposplastiques. La reconnaissance extracellulaire des effecteurs des pathogènes fongiques se développant sous la cuticule de l'hôte « C » ou entre les cellules du mésophylle par des protéines de type récepteur (RLP) peut entraîner une résistance sans mort cellulaire macroscopiquement visible de l'hôte La mort des cellules de l'hôte se produit généralement dans quelques cellules seulement, plusieurs jours ou semaines après l'infection. (B) En l'absence de RLP, l'hôte reste en vie et la fonction de virulence de l'effecteur peut favoriser une prolifération fongique, (C) En l'absence de l'effecteur, l'agent pathogène prolifère également mais moins que si l'effecteur était présent. (d'après Stotz *et al.*, 2014)

L'interaction « gène-pour-gène » conduisant à une HR ne semble être efficace que pour des agents pathogènes biotrophes ou hémi-biotrophes (dans leur phase de vie biotrophe). En effet, pour des espèces nécrotrophes telles que *B. cinerea*, la HR permet de favoriser l'infection (Govrin & Levine, 2000). En effet, *B. cinerea* est capable de sécréter des molécules telle que BcXyl1, une Xylanase qui contribue à la virulence de ce champignon et qui déclenche la PTI induisant une mort cellulaire médiée par BAK1 et SOBIR1. Cette induction de mort cellulaire passe parfois par une interaction « gène-pour-gène inverse » (Figure 8). C'est ce qui a été mis en évidence chez des Dothidéomycètes nécrotrophes utilisant des toxines « hôte-spécifique » (HST ; Friesen *et al.*, 2008). Dans ce cas précis, le succès de l'infection est conditionné par l'interaction spécifique entre un gène codant une HST et un gène de sensibilité présent chez la plante-hôte. C'est le cas notamment de la toxine ToxA, produite par les champignons *Pyrenophora tritici-repentis* et *Stagonospora nodorum* qui interagit avec une protéine de sensibilité du blé (Tsn1) favorisant ainsi la colonisation (Faris *et al.*, 2010)

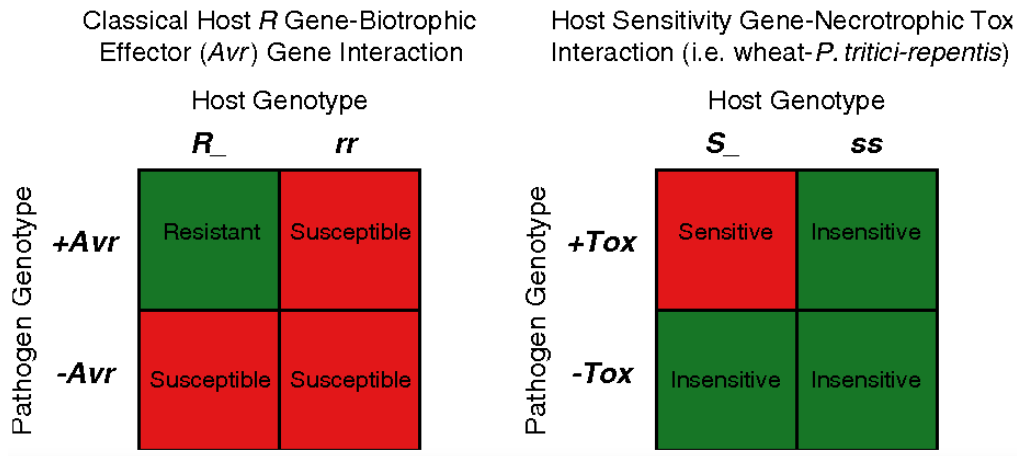


Figure 8. Comparaison des interactions génétiques gène-pour-gène et gène-pour-gène inverse.

Comparaison des interactions génétiques qui se produisent dans les relations classiques gène pour gène impliquant un hôte et un agent pathogène biotrophe (à gauche), et les interactions inverses gène pour gène qui impliquent des gènes spécifiques de sensibilité de l'hôte et les toxines hôte-spécifique correspondantes, comme observé dans le patho-système blé-Pyrenophora tritici-repentis (à droite) (Faris *et al.*, 2013).

II.2 Les effecteurs

II.2.1. La notion d'effecteur

Comme cela a été indiqué précédemment, afin de faciliter l'infection des plantes-hôtes, et notamment afin de contourner la PTI, les agents pathogènes adaptés sont capables de sécréter un arsenal de molécules communément appelées effecteurs. Les effecteurs pouvant également être utilisés par des agents non pathogènes dans leur interaction avec leur plante hôte, tels que les champignons mutualistes mycorhiziens, et même par des agents saprophytes, il est important de préciser que nous nous focaliserons dans ce manuscrit sur les effecteurs d'organismes phytopathogènes exprimés lors de l'infection. Ainsi, dans ce cadre, nous considérerons que les effecteurs correspondent à des molécules qui sont capables de manipuler la structure et/ou de la fonction de la cellule végétale, facilitant ainsi l'infection (Lo Presti *et al.*, 2015). Nous avons choisi ici de répartir les effecteurs en deux grands groupes selon leur nature : les effecteurs protéiques représentés par les protéines sécrétées (PS) et les effecteurs non-protéiques englobant les métabolites secondaires et les petits ARN.

II.2.1.1) Les effecteurs non-protéiques

a) *Métabolites secondaires (ou effecteurs chimiques)*

Appartenant majoritairement à trois grandes familles de composés chimiques, les polycétides, les terpénoïdes et les peptides non ribosomiques, les métabolites secondaires (MS) sont généralement considérés comme non essentiels au cycle de vie alors que leur rôle est assez polyvalent (Perez-Nadales *et al.*, 2014 ; Scharf *et al.*, 2014). Les gènes codant les enzymes de leurs voies de biosynthèse sont regroupés en cluster dans les génomes fongiques et leur expression est généralement régulée par un facteur de transcription commun permettant la co-expression de tous les gènes du cluster (Bok and Keller, 2004).

Parmi les MS, certains ont des rôles de phytotoxines pouvant être classées comme toxines non spécifiques de l'hôte (NHST) ou en toxines hôte-spécifique (HST). Chez *Alternaria alternata*, les gènes impliqués dans la biosynthèse de HST sont localisés sur un chromosome dispensable impliqué dans la spécificité d'hôte (Hatta *et al.*, 2002). Dans certains pathosystèmes, la sensibilité de l'hôte à l'infection est médiée par des interactions inverse gène -pour-gène, la sensibilité à une HST étant impliquée dans le développement de la maladie. Ainsi, il a été montré que chez le pathotype du fraisier d'*Alternaria alternata*, l'AF-toxine était indispensable pour la pathogénie. Les gènes codant cette AF-toxine sont tous localisés sur un chromosome dispensable qui contrôle la spécificité d'hôte. (Hatta *et al.* 2002). Au contraire, les NHST ne sont pas des déterminants primaires de la gamme d'hôtes et ne sont pas essentielles à la pathogénie, bien qu'elles puissent contribuer à la virulence. Ces toxines ont une gamme d'activité plus large, provoquant des symptômes non seulement sur les hôtes du champignon pathogène mais aussi sur d'autres espèces végétales (Walton, 1996).

Les MS fongiques peuvent également jouer le rôle de facteurs d'avirulence (Böhnert *et al.*, 2004), supprimer les mécanismes de défense de l'hôte et même aider à renforcer les parois cellulaires fongiques (Pusztahelyi *et al.*, 2015). Un nombre croissant de données transcriptomiques permettent d'identifier des clusters de gènes de biosynthèse (CGB) de MS fongiques qui sont exprimés à des stades spécifiques de la colonisation des plantes. Par exemple, la moitié des CGB prédits chez *Magnaporthe oryzae* sont surexprimés pendant la phase de pénétration ou la colonisation biotrophe des feuilles de riz (*Oryza sativa*) ou d'orge (*Hordeum vulgare*) (Collemare *et al.*, 2008). De même, *Colletotrichum higginsianum* exprime quatorze CGB pendant la pénétration ou la colonisation biotrophe des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* (Dallery *et al.*, 2017), et l'agent pathogène héli-biotrophe du blé *Zymoseptoria*

tritici exprime onze CGB pendant la colonisation asymptomatique des feuilles de blé ou au début de sa phase nécrotrophe (Rudd *et al.*, 2015 ; Palma-Guerrero *et al.*, 2017). Ces études suggèrent fortement que les agents pathogènes fongiques produisent un large éventail de MS pendant l'infection des plantes, aux différentes étapes de l'infection, y compris les phases de colonisation asymptomatique. Il est donc peu probable que ces MS fongiques jouent uniquement le rôle des phytotoxines. Néanmoins, peu de MS sont caractérisés chimiquement et fonctionnellement (cibles végétales et mode d'action connus). Certains métabolites ciblent directement des protéines végétales impliquées dans les voies de défense de l'hôte, telles que l'higginsianine B chez *C. higginsianum* qui est impliquée dans l'inhibition de la voie du JA (Dallery *et al.*, 2020). Chez *M. oryzae*, la mélanine est nécessaire à la mise en place des étapes précoces de l'infection sur riz en s'accumulant au niveau des parois des appressoria et en aidant à la pénétration (Belozerskaya *et al.*, 2015). Enfin, chez *L. maculans*, la sirodesmine est une phytotoxine impliquée dans l'infection tardive de la tige du colza qui présente aussi des propriétés antifongiques et antivirales (Gardiner *et al.*, 2004).

b) *ARN non codants (effecteurs ARN)*

Les ARN non-codants de petite taille (20 à 30 nucléotides) sont principalement connus pour leur implication dans la régulation de l'expression des gènes, induisant l'extinction de l'expression de gènes cibles, connue sous le nom d'interférence ARN (ARNi), au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel. Pour cela, ils s'associent avec des protéines de la famille Argonaute avec l'aide desquelles ils peuvent reconnaître les ARNm cibles et diminuer leur expression (Ghildiyal et Zamore, 2009). En fonction de leur origine et de leur taille, ces ARN non-codants sont classés en petits ARN interférents (siRNA), microARN (miRNA) et PIWI (P-element-induced wimpy testis)-interacting siRNA (piRNA) ; Ghildiyal et Zamore, 2009).

L'implication directe d'ARN non-codants de petite taille dans la pathogénie fongique a été mise en évidence. Ainsi il a été démontré que les siRNA fongiques étaient transportés dans la cellule végétale et interagissaient avec des protéines Argonautes dans le cytoplasme de l'hôte. Ce processus, appelé "Cross-Kingdom RNAi", a été observé pour plusieurs espèces de champignons pathogènes. Chez *Botrytis cinerea*, des petits ARN de ce champignon polyphage (Bc-sRNA) induisent le « silencing » de gènes de défense chez *A. thaliana* et la tomate (Weiberg *et al.*, 2013). Des "Cross-Kingdom RNAi" ont été observés chez d'autres

champignons pathogènes, notamment *Verticillium dahliae* et *Puccinia striiformis*, ainsi que chez d'autres agents pathogènes eucaryotes comme l'oomycète *Phytophthora capsici* et la plante parasite *Cuscuta campestris* (Wang *et al.*, 2016 ; Shahid *et al.*, 2018). Les analyses basées sur des approches de transcriptomique et d'étude d'association à l'échelle du génome (GWAS) chez *Sclerotinia sclerotiorum* et *Blumeria graminis* suggèrent qu'ils produisent des effecteurs ARN qui ciblent potentiellement des gènes de leurs plantes-hôtes (Derbyshire *et al.*, 2019 ; Kusch *et al.*, 2018). Ces analyses montrent que l'expression d'effecteurs ARN pour cibler des gènes de défense de la plante-hôte pourrait être une stratégie répandue chez les agents pathogènes. Les effecteurs ARN ont le potentiel de cibler plusieurs processus cellulaires végétaux impliqués dans les défenses des plantes. En effet, un unique siARN de *B. cinerea*, Bc-siR37, est capable d'interférer avec l'expression de facteurs de transcription (WRKY), de récepteurs de type RLK et d'enzymes de modification de la paroi chez *A. thaliana* (Wang *et al.*, 2017b). De plus, l'étude réalisée chez *S. sclerotiorum* par Derbyshire *et al.* (2019) suggère que les effecteurs ARN ciblent de nombreux gènes chez *Phaseolus vulgaris* (haricot commun) et *A. thaliana* des espèces hôtes phylogénétiquement éloignées.

II.2.1.2) Les effecteurs protéiques

Historiquement, les premiers effecteurs ayant été identifiés correspondaient à des PPS caractérisées chez l'agent pathogène bactérien *P. syringae* (Collmer *et al.*, 2000) Cette notion d'effecteur protéique a ensuite été utilisée plus largement chez les champignons et oomycètes (Kamoun, 2007). 40 à 60 % du sécrétome des champignons phytopathogènes correspond à des effecteurs protéiques, quel que soit le mode de vie ou le groupe phylogénétique considéré (Pellegrin *et al.*, 2015 ; Kim *et al.*, 2016). Certaines études ont considéré que toute protéine fongique sécrétée peut potentiellement agir comme un effecteur.

La comparaison, par Pellegrin *et al.* (2015), 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 alors que le type de protéines composant le sécrétome l'est. En effet, ce sont les champignons hémibiotrophes qui codent le plus de petites protéines sécrétées (Pellegrin *et al.*, 2015 , Lo Presti *et al.*, 2015). Par ailleurs, les génomes de champignons nécrotrophes, hémibiotrophes et saprotrophes présentent plus d'enzymes de dégradation des parois végétales que les génomes des champignons biotrophes et symbiotiques (Lo Presti *et al.*, 2015). Cela reste cohérent avec le fait que les champignons biotrophes et les champignons hémibiotrophes durant leur phase de vie biotrophe ont besoin

de tissus vivants pour progresser dans la plante, d'où la nécessité d'éviter d'endommager les cellules végétales. Par ailleurs, les produits de dégradation des parois peuvent être reconnus par la plante en tant que DAMP. Ne pas détruire les cellules constitue donc un avantage pour passer inaperçu lors de la colonisation de la plante. Les secrétomes des champignons ectomycorrhiziens, quant à eux, contiennent une proportion plus importante de PPS que les secrétomes des autres types de champignons, mais contiennent moins de PPS spécifiques de leur espèce fongique (Pellegrin *et al.*, 2015).

II.2.2. Etude des effecteurs fongiques : de leur identification à leur caractérisation fonctionnelle

L'étude du répertoire des effecteurs fongiques et leur caractérisation fonctionnelle permettent d'identifier des mécanismes moléculaires facilitant la mise en place de l'infection, des processus cellulaires et les protéines végétales ciblées par les effecteurs et ainsi de développer des stratégies de lutte contre les maladies. D'importantes avancées dans les méthodologies utilisées pour l'étude des effecteurs ont été réalisées depuis les prédictions *in silico* au sein des protéomes et à la production d'effecteurs protéiques en système hétérologue, jusqu'à la caractérisation fonctionnelle des effecteurs des agents phytopathogènes filamenteux et l'identification de leurs cibles végétales.

Cette partie sera dédiée à l'étude des effecteurs des champignons phytopathogènes en discriminant trois niveaux d'étude : (i) l'identification de répertoires d'effecteurs ; (ii) leur caractérisation fonctionnelle et (iii) l'étude de leur évolution.

II.2.2.1. Identification et caractéristiques des répertoires d'effecteurs chez les champignons phytopathogènes

a) Détermination du répertoire d'effecteurs

Le répertoire d'effecteurs d'un agent pathogène est un déterminant majeur de la spécialisation à l'hôte et peut avoir un impact important sur la réussite ou l'échec de l'interaction plante-pathogène en fonction du génotype végétal (Raffaele *et al.*, 2010 ; Sánchez-Vallet *et al.*, 2018a). Néanmoins, la détermination du répertoire d'effecteurs des champignons phytopathogènes reste un challenge. La principale raison de cette difficulté vient du fait que la plupart des effecteurs fongiques putatifs présentent peu ou pas d'homologie de

séquence entre eux, ni avec des protéines présentes dans les bases de données et ayant des fonctions connues.

Chez d'autres agents pathogènes tels que les oomycètes et les bactéries, la recherche de gènes codant des effecteurs putatifs est basée sur la recherche de motifs conservés qui sont généralement liés à leur système de transport dans la cellule végétale (Carreón-Anguiano *et al.*, 2020). Ainsi, chez les oomycètes phytopathogènes, une partie des effecteurs possèdent des motifs consensus dans leur partie N-terminale (RXLR, CHXC ou LFLAK) qui peuvent être utilisés pour la prédiction d'une partie du répertoire d'effecteurs (Petre & Kamoun, 2014). Pour les bactéries phytopathogènes, les effecteurs cytoplasmiques sont directement injectés dans le cytoplasme de la cellule hôte via des mécanismes de sécrétion spécialisés, tels que le système de sécrétion de type III, les motifs présents dans la partie N-terminale guidant les effecteurs vers le système de sécrétion. Ainsi, un apprentissage automatique a permis la prédiction des effecteurs bactériens sécrétés de type III à partir des protéomes bactériens sur la base des informations sur les séquences N-terminales (McDermott *et al.*, 2011).

Chez les champignons phytopathogènes, si la façon dont les effecteurs sont sécrétés hors du champignon majoritairement via le réticulum endoplasmique est bien décrite, on a encore actuellement peu d'informations sur la façon dont les effecteurs cytoplasmiques sont transportés dans la cellule végétale (cf chapitre 1 partie II.2.2.2.1)) et, contrairement aux oomycètes phytopathogènes, aucun motif conservé dans la partie N terminale de ces effecteurs n'a été identifié. Par conséquent, la détection ou la prédiction d'effecteurs fongiques candidats est généralement réalisée en utilisant une combinaison de données génomiques, transcriptomiques et protéomiques (Figure 9)

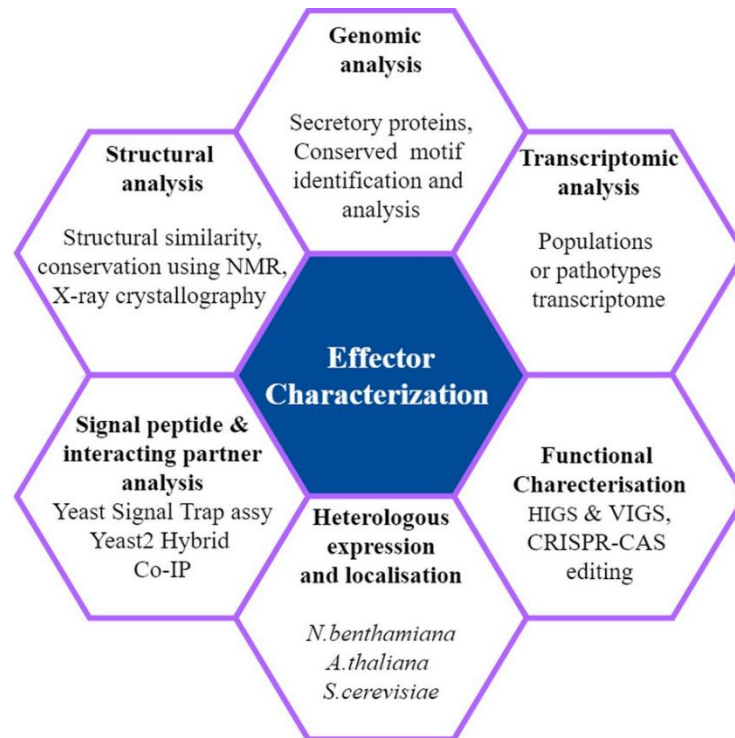


Figure 9. Diverses méthodes de caractérisation des effecteurs de champignons phytopathogènes

Les méthodes de caractérisation sont regroupées en classes selon l'objectif de la caractérisation. Plusieurs méthodes sont basées sur l'utilisation de systèmes hétérologues. Immuno-Précipitation (IP); Host Induced Gene Silencing (HIGS); Virus-Induced Gene Silencing (VIGS); Nuclear Magnetic Resonance (NMR) (D'après Jaswal *et al.*, 2020)

Le nombre de séquençages de génomes de champignons phytopathogènes, mutualistes ou saprophytes, a explosé depuis les années 2000, ce qui a permis de réaliser des analyses de génomique comparative de plus en plus poussées, ainsi que la constitution de répertoires de gènes codant des effecteurs putatifs. De plus, la diminution des coûts de séquençage a été concomitante avec l'apparition des dernières générations de technologies de séquençage, permettant de meilleures qualités d'assemblage et d'annotation fonctionnelle des génomes. Ainsi, les stratégies de séquençage de troisième génération ont conduit à la production de séquences chromosomiques (presque) parfaitement assemblées pour *Fusarium graminearum*, *V. dahliae*, *C. higginsianum*, *B. cinerea* et *Z. tritici* (Dallery *et al.*, 2017 ; Faino *et al.*, 2016, King *et al.*, 2015 ; Plissonneau *et al.*, 2016 and 2018; Van Kan *et al.*, 2017).

En l'absence de motifs / séquences consensus pour prédire les effecteurs fongiques, les caractéristiques qui sont utilisées pour la prédiction de ce répertoire sont les suivantes : des protéines (de petites taille, souvent moins de 300 aa) avec un peptide signal de sécrétion

prédit, au maximum un domaine transmembranaire prédit, pas d'homologie avec d'autres protéines ou de domaines fonctionnels prédits (Jones et Dangl, 2006 ; Stergiopoulos et de Wit, 2009 ; Djamei *et al.*, 2011 ; Lo Presti *et al.*, 2015). Le répertoire d'effecteurs est parfois limité aux gènes qui sont spécifiquement exprimés pendant l'infection de la plante hôte (Figure 10). Cependant, des protéines de plus grande taille peuvent également agir comme des protéines effectrices (voir par ex. Djamei *et al.*, 2011) ; de ce fait, le seuil de 300 acides aminés est plutôt arbitraire. Un critère fréquemment utilisé pour définir les effecteurs est l'absence de protéines homologues détectables en dehors du genre (O'Connell *et al.*, 2012 ; Spanuet *et al.*, 2010 ; Wicker *et al.*, 2013). Cependant, certaines protéines effectrices sont retrouvées chez plusieurs champignons phytopathogènes ou possèdent des domaines fonctionnels conservés (De Jonge *et al.*, 2010 ; Djamei *et al.*, 2011 ; Mentlak *et al.*, 2012 ; Stergiopoulos *et al.*, 2013).

Des outils d'apprentissage automatique ont été développés pour l'identification des protéines ayant des propriétés de type 'effecteur'. EffectorP et FunEffector-Pred utilisent les fréquences des acides aminés, le poids moléculaire, la charge, les k-mers AA et d'autres caractéristiques des protéines pour prédire directement les protéines de type 'effecteur'. Localizer et ApoplastP, qui prédisent les localisations subcellulaires ou apoplastiques des effecteurs dans leur plante hôte, sont utiles pour prédire le lieu d'action des effecteurs mais ne sont pas nécessaires pour la prédiction des effecteurs eux-mêmes (Sperschneider *et al.*, 2018a, Sperschneider *et al.*, 2018b) (Figure 10).

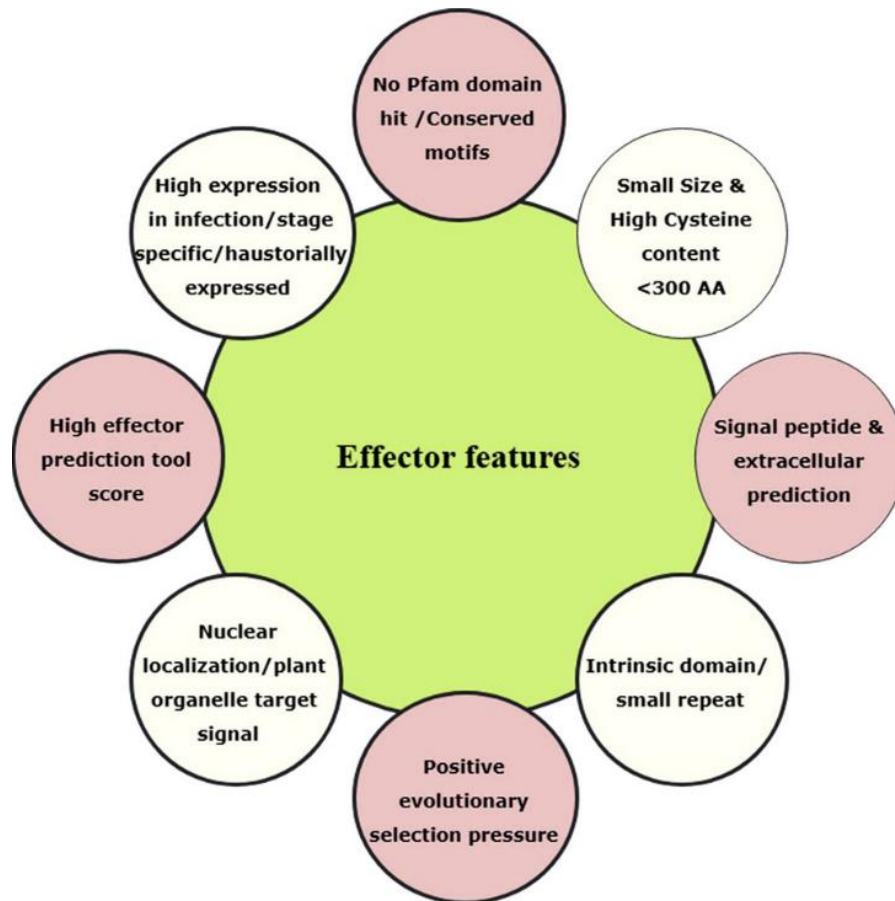


Figure 10. Caractéristiques des effecteurs putatifs chez divers champignons phytopathogènes (D'après Jaswal *et al.*, 2020)

Ainsi, chez de nombreuses espèces fongiques, le répertoire de gènes codant des petites protéines secrétées et des effecteurs putatifs a pu être déterminé. Par ex., chez l'isolat 70-15 de *M. oryzae*, 1309 gènes ont été prédits comme codant des protéines sécrétées (Yoshida *et al.*, 2009) alors qu'en 2017 l'annotation et la prédiction faite pour l'isolat V86010 de *M. oryzae* a révélé 1703 gènes codant des protéines sécrétées dont 616 effecteurs putatifs (avec un critère de taille <400 acides aminés et de richesse en cystéine). En variant les critères pour détecter les effecteurs putatifs, en allant des critères les plus strictes aux moins strictes (comme l'utilisation de filtres tolérant des sécrétions non conventionnelles), on estime que le sécrétome de *U. maydis* comprend entre 467 et 729 gènes codant des effecteurs putatifs, tandis que le sécrétome de *S. reliaum* en comprend entre 467 et 708 (Schuster *et al.* ; 2016 ; Dutheil *et al.* ; 2016). Une étude récente réalisée par Gay *et al.* (2020) sur le sécrétome de *L. maculans* a prédit 1 070 gènes codant des effecteurs protéiques putatifs (soit 8,2 % de l'ensemble des gènes de *L. maculans*).

b) Répartition des gènes codant des effecteurs au sein des génomes des champignons phytopathogènes

Une partie des génomes d'agents pathogènes partagent une structure bipartite constituée de compartiments conservés riches en gènes et de compartiments à évolution rapide riches en éléments transposables (ET). L'obtention de génomes complets a mis en lumière l'étendue et la structuration des régions riches en ET. Ainsi, le dernier assemblage du génome de *C. higginsianum* montre que ce dernier contient 7 % d'ET, contre 1,2 % trouvés lors du premier assemblage (Dallery *et al.*, 2017, O'Connell *et al.*, 2012). Chez certains champignons pathogènes, tels que *B. graminis* (Spanu *et al.*, 2010), ces compartiments sont étendus et contiennent un grand nombre d'ET. A l'inverse, *U. maydis* possède un petit génome avec des compartiments riches en ET compacts. Les compartiments riches en TE et pauvres en gènes peuvent correspondre à des chromosomes accessoires (e.g. *F. oxysporum f. sp. lycopersici* ; Ma *et al.*, 2010), des groupes de gènes dupliqués (e.g. les champignons responsables du 'charbon' / smut fungi ; Dutheil *et al.*, 2016), des îlots génomiques riches en ET (e.g. *V. dahliae* ; Faino *et al.*, 2016), des régions sub-téломériques hautement répétitives (e.g. *Fusarium fujikuroi* ; Chiara *et al.*, 2015), et des isochores riches en bases A et T (e.g. *L. maculans* ; Rouxel *et al.*, 2003 ; **Figure 11**).

Chez de nombreux agents pathogènes fongiques, les gènes codant des effecteurs sont situés dans ou à côté de ces régions à évolution rapide qu'il s'agisse d'isochores ou de chromosomes dispensables. Chez *F. oxysporum*, les chromosomes accessoires sont enrichis en transposons et en effecteurs putatifs (Ma *et al.*, 2010). Ainsi, les formes spéciales de ce champignon sont capables d'acquérir leur pouvoir pathogène grâce à un chromosome dispensable ou au contraire de perdre leur pouvoir pathogène suite à la perte de ce dernier (Ma *et al.*, 2010 ; Vlaardingerbroek *et al.*, 2016). Par ailleurs, le génome d'*U. maydis*, ainsi que ceux de champignons proches (*Ustilago hordei*, *Sporisorium scitamineum* et *Sporisorium reilianum*), présentent des regroupements des effecteurs en clusters, parfois associés à des ETs (Dutheil *et al.*, 2016).

Cette localisation préférentielle des gènes codant des effecteurs dans des régions particulières des génomes d'eucaryotes filamenteux a été formalisée dans le 'modèle de génome à deux vitesses' (Rouxel *et al.*, 2011; Grandaubert *et al.*, 2014; Frantzeskakis *et al.*, 2019). Dans ce modèle, les gènes essentiels sont protégés au sein du génome 'core' contre des taux élevés de mutations délétères, tandis que les gènes codant des effecteurs subissent des

changements évolutifs rapides au sein du génome accessoire (Croll et McDonald, 2012). Les augmentations locales des taux de mutations fonctionnelles peuvent permettre aux agents pathogènes de s'adapter plus rapidement à des changements environnementaux, comme par exemple l'introduction d'une nouvelle résistance variétale. Parmi les mutations apparaissant en réponse à un changement environnemental, certaines peuvent être dues à un mécanisme spécifique des ascomycètes appelé RIP pour « Repeat-Induced Point mutations ». Ce mécanisme pré-méiotique entraîne l'apparition de mutations de C vers T et de G vers A au sein des séquences répétées conduisant à l'apparition d'un nombre élevé de mutations et/ou d'un codon-stop au sein de la protéine correspondante (Galagan *et al.*, 2003). Ce mécanisme peut également affecter les gènes situés à proximité de séquences répétées (Fudal *et al.*, 2009 ; Rouxel *et al.*, 2011).

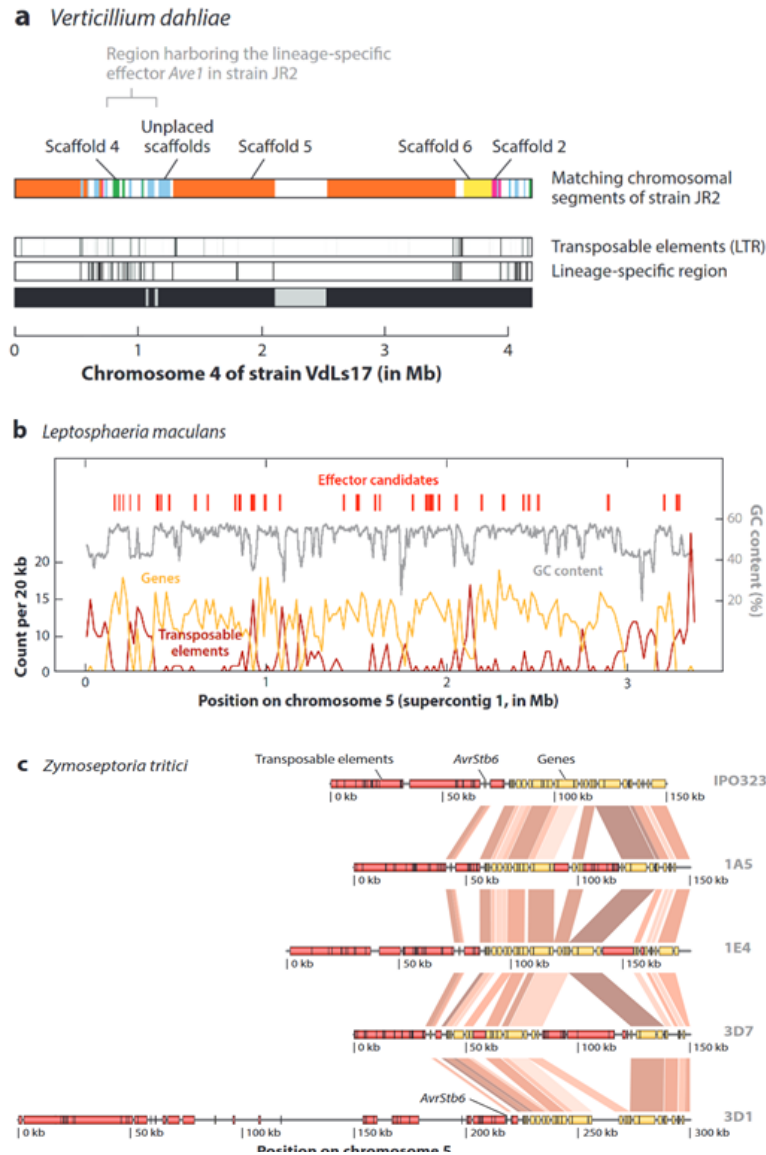


Figure 11. Exemples de localisations des gènes codant d'effecteurs au sein des génomes de champignons pathogènes.

- (a) Chez *Verticillium dahliae*, le gène codant l'effecteur *Ave1* est situé dans une région riche en éléments transposables (ETs)
- (b) Les gènes codant des effecteurs putatifs sont localisés dans des compartiment riche en bases A et T et en ETs chez *Leptosphaeria maculans*
- (c) Le gène codant l'effecteur *AvrStb6* de *Zymoseptoria tritici* est situé dans une région sub-télomérique. La comparaison de cinq génomes de *Z. tritici* complètement assemblés montre comment *AvrStb6* est entouré d'ETs et que toute la région sub-télomérique est très dynamique au sein des différentes souches. GC, guanine-cytosine ; LTR, longue répétition terminale (D'après Sanchez-Vallet *et al.*, 2018)

c) *Régulation de l'expression des gènes codant des effecteurs*

Les analyses transcriptomiques, basées sur des données RNAseq, se sont largement démocratisées depuis une dizaine d'années, permettent d'avoir une vue d'ensemble des gènes exprimés à un stade de vie donné, y compris lors de l'interaction plante hôte-agent pathogène. Les analyses d'expression se basent soit sur des comparaisons entre une / des condition(s) de croissance *in vitro* et des conditions d'infection *in planta*, soit sur des comparaisons deux à deux entre toutes les dates d'une cinétique d'infection.

Ainsi, de nombreuses analyses transcriptomiques, couplées à des méthodes de clustering permettant de regrouper des gènes partageant les mêmes profils d'expression, ont permis de mettre en évidence des vagues d'expression de gènes codant les effecteurs lors de l'infection de l'hôte et cela pour différents champignons phytopathogènes. Ces variations d'expression peuvent dépendre du mode de vie du champignon, des stades d'infection, de l'hôte, des tissus infectés, du génotype ou même des souches utilisées. Ainsi, chez les champignons hémibiotrophes, différents sets d'effecteurs et gènes impliqués dans la pathogénie s'expriment durant les stades d'infection biotrophe / asymptomatique, et nécrotrophe (ex. chez *Z. tritici*, Palma-Guerrero *et al.*, 2016; Haueisen *et al.*, 2019 ; ou *C. higginsianum*, Kleemann *et al.*, 2012; O'Connell *et al.*, 2012). Chez *U. maydis*, les gènes codant des effecteurs sont différentiellement exprimés selon l'organe infecté (Schilling *et al.*, 2014; Lanver *et al.*, 2018) alors que chez *Melampsora larici-populina* qui nécessite deux espèces hôtes pour effectuer l'intégralité de son cycle de vie et de reproduction (le mélèze pour la reproduction sexuée et le peuplier pour la reproduction asexuée), les gènes codant des effecteurs sont différentiellement exprimés selon l'hôte (Lorrain *et al.*, 2018).

L'expression des gènes codant des effecteurs est régulée par plusieurs mécanismes, dont l'intervention de facteurs de transcription (FT) spécifiques. Ainsi quelques FTs impliqués dans la régulation de l'expression des gènes codant des effecteurs ont été identifiés chez les champignons. Les FTs les mieux étudiés sont les orthologues du FT Sge1/Ros1. Sge1 est un régulateur positif des gènes de virulence chez de nombreuses espèces fongiques, notamment *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, *V. dahliae*, *Z. tritici*, *B. cinerea*, *Cladosporium fulvum* et *M. oryzae* (Chen *et al.*, 2017; Michielse *et al.*, 2009; Mirzadi *et al.*, 2014; Santhanam et Thomma, 2013). L'orthologue de Sge1 chez *U. maydis* active le passage aux phases finales de l'infection, y compris la sporogénèse, en régulant négativement l'expression des effecteurs associés au développement biotrophe et positivement les gènes liés à la

formation des spores (Tollot *et al.*, 2016). Chez *Alternaria brassicicola*, le facteur de transcription AbPf2 régule l'expression de 33 gènes codant des protéines sécrétées, dont huit effecteurs putatifs (Cho *et al.*, 2013). De même, les orthologues d'AbPf2 chez *Parastagonospora nodorum* et *Pyrenophora tritici-repentis* régulent positivement les effecteurs de la nécrotrophie SnToxA et ToxA, issus d'un transfert horizontal (Rybak *et al.*, 2017).

Une régulation épigénétique de l'expression des gènes codant des effecteurs a également été mise en évidence. Chez *Epichloë festucae*, un endophyte de *Lolium perenne*, les gènes impliqués dans la biosynthèse d'alcaloïdes toxiques *in planta*, montrent une diminution de méthylation H3K9me3 (tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3) et H3K27me3 (tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3) à leurs loci (marques caractéristiques de régions hétérochromatiniennes) lors de l'infection par rapport à la croissance axénique (Chujo *et al.*, 2014). De même, chez l'agent pathogène du colza *L. maculans*, la marque H3K9me3 réprime l'expression des gènes (notamment ceux codant des effecteurs) situés dans les compartiments riches en ET pendant la croissance axénique. Ceci suggère que l'expression concertée des gènes codant des effecteurs pendant l'infection est dépendante d'un remodelage et d'une ouverture de la chromatine au niveau de ces gènes (Soyer *et al.*, 2014).

II.2.2.2 Caractérisation fonctionnelle des effecteurs fongiques

a) Sécrétion et transport des effecteurs dans les cellules végétales

Comme cela a été évoqué plus tôt, les effecteurs doivent, d'une manière ou d'une autre, être sécrétés par l'agent pathogène lors de l'infection. Les effecteurs sont initialement synthétisés par la machinerie intracellulaire de l'agent pathogène et sont par la suite sécrétés dans l'espace extracellulaire végétal où ils vont soit exercer directement leur fonction (effecteurs apoplastiques) soit être transportés ultérieurement dans le cytoplasme de la cellule hôte puis parfois dans des organelles spécifiques (effecteurs cytoplasmiques, aussi appelés effecteurs transloqués ou symplastiques).

Le transport des effecteurs dans la cellule végétale se fait par des mécanismes différents en fonction des agents pathogènes. Pour les champignons pathogènes, le transport des effecteurs dans les cellules végétales a rarement été visualisé directement et est mal compris. Ces agents pathogènes possèdent parfois des structures d'infection différenciées tels que des hyphes

extracellulaires, des hyphes d'invasion ou des haustoria. Historiquement, les haustoria étaient associés uniquement à la nutrition des agents pathogènes (Voegelé et Mendgen 2003) (Figure 12). Cependant, ces derniers sont également impliqués dans la production et la sécrétion d'effecteurs (Wang *et al.* 2017).

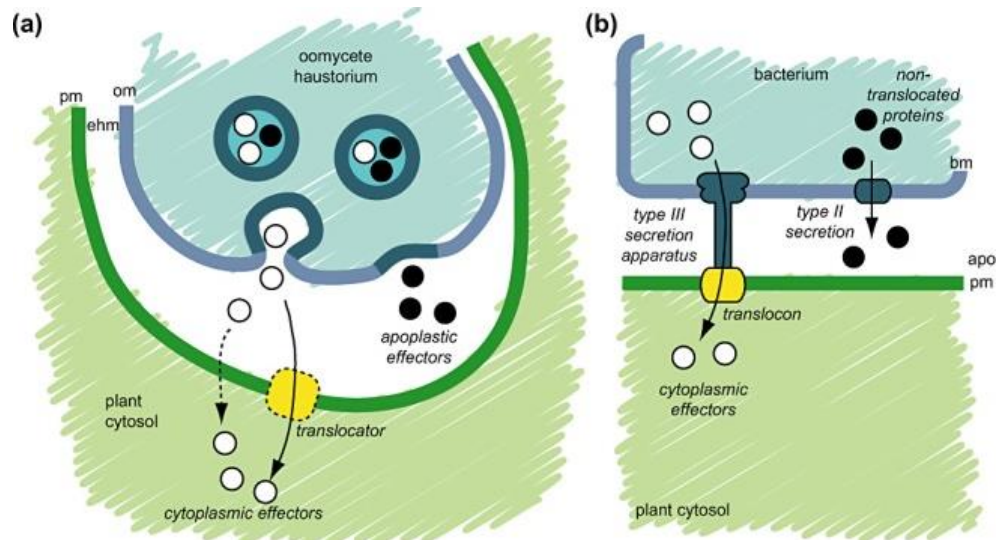


Figure 12. Différents systèmes de transport des effecteurs chez les agents pathogènes filamenteux et les bactéries.

Représentation schématique de la sécrétion d'effecteurs par un haustorium d'oomycète (a) et une bactérie phytopathogène (b). Les effecteurs apoplastiques (cercles noirs) sont sécrétés dans l'espace extracellulaire, où ils interfèrent avec les défenses apoplastiques de la plante. Les effecteurs cytoplasmiques (cercles blancs) sont transportés à l'intérieur des cellules de l'hôte, traversant ainsi deux membranes, une de l'agent pathogène et une autre de l'hôte. Le mécanisme eucaryote du transport de l'effecteur dans la cellule hôte n'est pas connu, mais pourrait inclure des protéines de transport codées par l'agent pathogène (a). Chez les bactéries, le transport dans la cellule hôte est réalisé par le système de sécrétion de type III qui implique des protéines de transport dédiées (jaune), tandis que la sécrétion de type II délivre les protéines dans l'apoplasme (b). apo, apoplasme ; bm, membrane bactérienne ; ehm, matrice extrahaustoriale ; om, membrane d'oomycète ; pm, membrane plasmique (D'après Schornack *et al.* 2009)

De manière générale, les effecteurs qui sont sécrétés possèdent un peptide signal en position N-terminale dans leur séquence protéique, permettant la sécrétion de la protéine par le réticulum endoplasmique de l'agent pathogène, qui est clivé lors de la sécrétion (Emanuelsson *et al.*, 2007). Cependant, plusieurs études indiquent que des voies de sécrétion non classiques et non caractérisées pourraient également être utilisées par les agents pathogènes filamenteux. C'est notamment le cas des effecteurs PsIsc1 et VdIsc1, produits respectivement par *Phytophthora sojae* et *V. dahliae* : ces effecteurs sont dépourvus de

peptide signal mais sont sécrétés de manière non conventionnelle dans leur hôte respectif pour supprimer les défenses de la plante (Liu *et al.*, 2014). Il n'a pas encore été démontré très clairement de quelle façon les effecteurs d'agents pathogènes filamenteux sont internalisés dans les cellules végétales et cette question est encore sujette à débats (Lo Presti et Kahmann, 2017; Petre et Kamoun, 2014). Le motif conservé RxLR identifié chez les oomycètes a été considéré comme impliqué dans le transport des effecteurs dans les cellules végétales (Dou *et al.*, 2008; Kale *et al.*, 2010). Néanmoins, ce rôle a été remis en question dans des études récentes qui suggèrent plutôt une implication de ce motif dans la sécrétion des effecteurs (Wawra *et al.*, 2017). Chez les effecteurs de champignons, des motifs « RxLR-like » ont été prédits, sans que leur implication dans le transport des effecteurs vers la cellule végétale ait été clairement démontrée (Kale *et al.*, 2010 ; Petre et Kamoun, 2014 ; Rafiqi *et al.*, 2010). Chez *B. graminis* et *P. graminis*, un motif Y/F/WxC a été trouvé dans 35 effecteurs mais son rôle dans le transport vers la cellule végétale reste inconnu (Godfrey *et al.*, 2010).

Les preuves expérimentales du transport des effecteurs à l'intérieur des cellules végétales sont générées soit directement par la fusion de protéines fluorescentes avec les effecteurs (Khang *et al.*, 2010), soit par des approches d'immuno-cylocalisation (Djamei *et al.*, 2011; Rafiqi *et al.*, 2010) ou sont déduites de la reconnaissance des effecteurs d'avirulence par une protéine de résistance cytosolique (Dodds *et al.*, 2006). Les résultats expérimentaux pour l'effecteur symplastique AvrM de *M. lini* indiquent une translocation autonome dans la cellule hôte (Djamei *et al.*, 2011; Ve *et al.*, 2013), ce qui implique qu'AvrM possède des propriétés biochimiques intrinsèques permettant sa translocation. En revanche, l'effecteur Avr2 de *Fusarium oxysporum* ne peut être transporté à l'intérieur des cellules de tomate qu'en présence de l'agent pathogène (Di *et al.*, 2016). Les différences observées entre les patho-systèmes rendent probables que les mécanismes de transport dans la cellule hôte puissent différer entre les espèces fongiques et même potentiellement entre les différents effecteurs symplastiques au sein d'une même espèce (Khang *et al.*, 2010 ; Djamei *et al.*, 2011 ; Rafiqi *et al.*, 2010). Chez *Magnaporthe oryzae*, il a été montré que les effecteurs apoplastiques (e.g. Slp1, Bas4 et Bas113) suivaient la voie de sécrétion conventionnelle, sensible à la brefeldine A (BFA) et dépendante du Golgi, tandis que les effecteurs cytoplasmiques (e.g. Pwl2, Avr-Pita, Bas1 et Bas107) étaient sécrétés par le complexe biotrophe interfacial (BIC) et suivaient une voie de sécrétion non conventionnelle, insensible à la BFA, impliquant des protéines exocystes et SNARE (Giraldo *et al.*, 2013).

b) Localisation et cible des effecteurs

La localisation précise des effecteurs dans la cellule végétale peut potentiellement apporter des informations sur leur mode d'action. Cependant, cette localisation dépend en partie de la capacité à manipuler génétiquement des agents pathogènes ou leur hôte. Quand la manipulation du champignon ou la plante hôte n'est pas possible, une expression hétérologue chez *Nicotiana benthamiana* ou *A. thaliana* pour la localisation représente une bonne alternative. Ainsi, la détermination de la localisation sub-cellulaire des effecteurs dans des cellules végétales est généralement réalisée en exprimant, de façon transitoire, l'effecteur couplé à un fluorochrome dans les cellules de *N. benthamiana*. Les résultats de ces travaux montrent les nombreux compartiments cellulaires (i.e. le noyau, l'appareil de Golgi, les chloroplastes, les mitochondries, etc.) que les effecteurs ciblent (Lorrain *et al.*, 2018 ; Robin *et al.*, 2018) donnant au passage des indications sur leur rôle. Par exemple, un effecteur localisé dans les chloroplastes pourrait interférer avec la photosynthèse ou avec la synthèse d'acide salicylique, alors qu'un effecteur nucléaire pourrait modifier la transcription de gènes de défense. Chez *M. larici-populina*, 20 effecteurs fusionnés à la GFP (Green Fluorescent Protein) ont été testés en expression transitoire dans *N. benthamiana*, parmi lesquels quatorze présentaient une localisation nucléo-cytoplasmique, qui est peu informative puisque la GFP libre présente également une localisation nucléo-cytoplasmique, deux étaient retrouvés dans les chloroplastes et deux dans le noyau (Petre *et al.*, 2015). Une étude similaire sur seize effecteurs de *M. larici-populina* a mis en évidence une localisation dans les chloroplastes, au niveau des plasmodesmes et dans des corps cytosoliques pour trois de ces effecteurs (Germain *et al.*, 2018). Enfin, sur les 82 effecteurs de *Phakopsora pachyrhizi* testés, une grande variabilité de localisation a été retrouvée : 33 avec une localisation nucléo-cytoplasmiques, 16 également nucléo-cytoplasmiques mais avec une distribution cytoplasmique sous forme de ponctuations, 12 strictement cytoplasmiques, 17 strictement nucléaires et un effecteur localisé dans le nucléole (Qi *et al.*, 2017) (**Figure 13**).

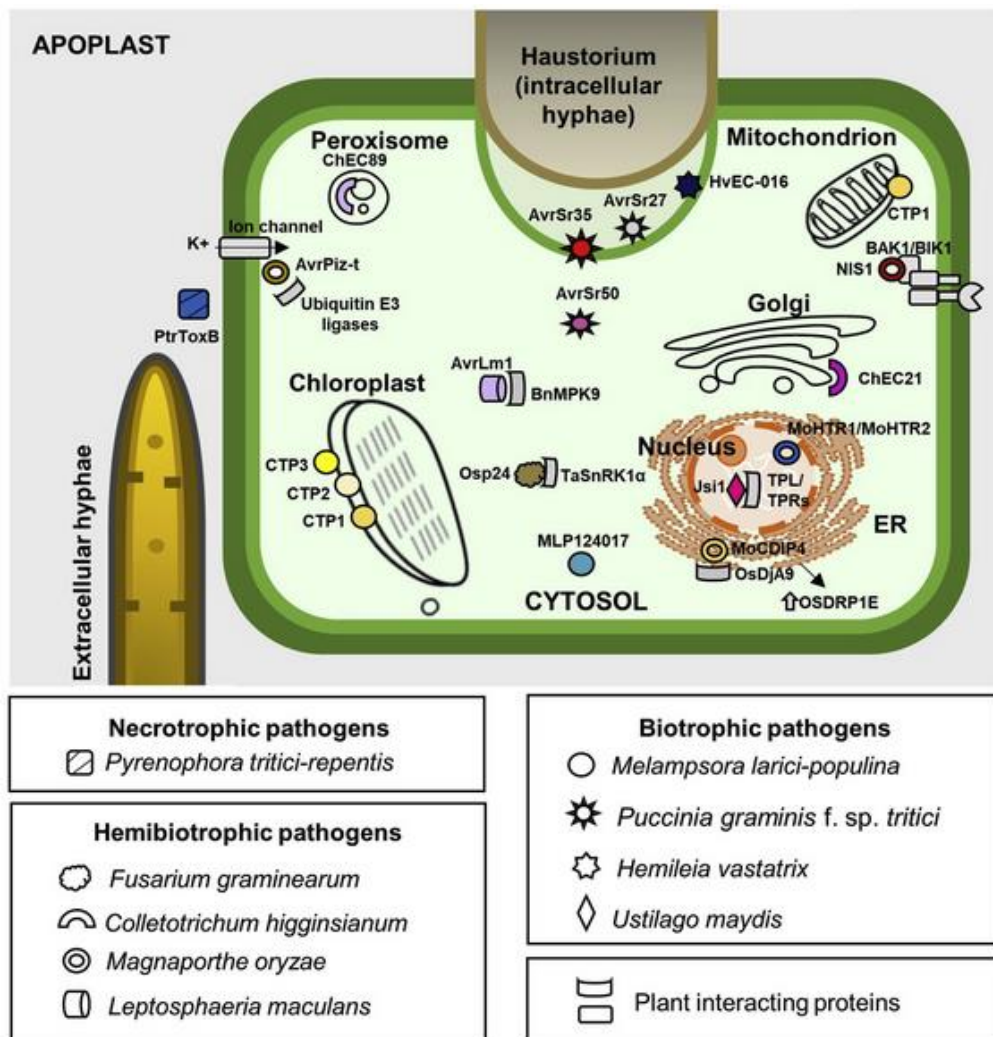


Figure 13. Exemples de localisation subcellulaire d'effecteurs fongiques.

Pendant l'infection, les champignons délivrent des protéines effectrices dans l'apoplasme et/ou la cellule hôte. Cette figure illustre des exemples d'effecteurs fongiques qui sont transportés dans l'espace intracellulaire et se localisent dans divers compartiments subcellulaires (c'est-à-dire le cytosol, l'appareil de Golgi, le chloroplaste, la mitochondrie, le peroxysome et le noyau) et de leurs cibles végétale (D'après Figueroa *et al.*, 2021).

L'établissement d'un lien entre la localisation et la fonction des effecteurs reste, néanmoins, une tâche difficile en raison de la difficulté à manipuler génétiquement certains champignons et du faible effet, voire de l'absence de phénotype, lié à la mutation d'effecteurs fongiques, suggérant une redondance fonctionnelle ou des effets mineurs sur l'infection (Selin *et al.*, 2016). Petre *et al.* (2015) ont déterminé que les trois protéines sécrétées, CTP1, CTP2 et CTP3 de *Melampsora larici-populina*, s'accumulent dans les chloroplastes et que cet adressage est dû à un clivage *in planta* d'une séquence signal N-terminale qui imite les séquences d'adressage aux chloroplastes des plantes. De même, le mimétisme des séquences d'adressage aux chloroplastes a été retrouvé pour plusieurs effecteurs de *Puccinia graminis f.*

sp. tritici qui montrent une localisation chloroplastique (Sperschneider *et al.*, 2017). L'effecteur Pst_12806 de *Puccinia striiformis f. sp. tritici* est impliqué dans la perturbation de la photosynthèse et contient également un peptide d'adressage chloroplastique (Xu *et al.*, 2019). Une relation localisation-cible n'est cependant pas toujours évidente à établir. C'est le cas de l'effecteur MoCDIP4 de *M. oryzae* qui se lie à la protéine chaperonne DnaJ OsDjA9 qui est responsable de la dégradation d'une autre protéine, OsDRP1E. Il a été montré que l'interaction entre MoCDIP4 et DnaJ OsDjA9 se fait au niveau du réticulum endoplasmique alors que la cible indirecte reste la mitochondrie puisque l'accumulation d'OsDRP1E dans les cellules de riz provoque une fission mitochondriale aberrante et une réduction de taille des mitochondries (Xu *et al.*, 2020) Les principales techniques utilisées pour identifier les cibles d'effecteurs sont le double-hybride dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* et le pull-down. Ainsi, des travaux de grande ampleur ont été réalisés par double-hybride en testant un réseau d'interactions potentielles entre 8000 ORF d'*A. thaliana* et des effecteurs de deux agents pathogènes, *P. syringae* (30 effecteurs) et *Hyaloperonospora arabidopsidis* (53 effecteurs ; Mukhtar *et al.*, 2011). Lors de ces expériences, il a été montré que des effecteurs de ces deux agents pathogènes phylogénétiquement éloignés (une bactérie et un oomycète) interagissaient avec un nombre réduit de cibles végétales, dont des cibles communes, chez *A. thaliana*. De cette étude a émergé le concept de « hub », selon lequel, suite à une convergence évolutive, les effecteurs de tous les organismes phytopathogènes cibleraient un nombre limité de protéines végétales.

c) Détermination de la structure tridimensionnelle des effecteurs

Les informations structurales sont très précieuses pour élucider les mécanismes moléculaires qui régissent les fonctions biologiques et biochimiques. Elles complètent les méthodes de génétique et de biologie moléculaire, en donnant une explication moléculaire aux observations faites dans ces études et en posant des hypothèses pour la poursuite de celles-ci. En outre, les connaissances fondamentales au niveau moléculaire aident à relier les informations sur le génome et la séquence à la fonction et à améliorer la prédiction du répertoire d'effecteur (Amoozadeh *et al.* 2021). D'une espèce à l'autre, les effecteurs ne présentent qu'une faible similarité de séquence, ce qui limite le pouvoir de l'analyse basée sur la séquence pour prédire des modèles fonctionnels et évolutifs. La conservation de structure des effecteurs peut donc aider à dépasser cette limite (Franceschetti *et al.*, 2017). Ainsi, grâce

au développement des techniques d'expression, de purification et de cristallisation des protéines, la structure et la fonction d'un certain nombre d'effecteurs d'agents phytopathogènes ont maintenant été déterminées. Les premières élucidations de structure 3D d'effecteurs d'agents pathogènes filamenteux ont été réalisées chez les oomycètes. Malgré la diversité de séquence des effecteurs de type RXLR, plusieurs de ces effecteurs présentent une organisation structurale conservée. À l'exception d'ATR13, les structures des effecteurs d'oomycètes déterminées à ce jour adoptent en effet un repliement à trois hélices, appelé domaine WY (Whisson *et al.*, 2007 ; Boutemy *et al.*, 2011). Les effecteurs contenant le domaine WY existent sous différentes formes, y compris des unités individuelles, des duplications, des dimères ou des répétitions en tandem.

Chez les champignons phytopathogènes, la structure de plusieurs effecteurs putatifs de *M. oryzae*, exprimés en phase biotrophe de l'infection, divergeant en terme de séquences, a été résolue, montrant une organisation structurale en sandwich β conservée, et des analogies structurales avec l'effecteur ToxB de l'agent pathogène du blé *P. tritici-repentis*. Ces effecteurs sont nommés effecteurs MAX pour *Magnaporthe* AVR et ToxB-like (de Guillen *et al.*, 2015). Les recherches d'homologues basées sur la structure et les motifs ont identifié de nombreux candidats effecteurs MAX dans différentes espèces fongiques (de Guillen *et al.*, 2015). La structure cristalline de l'effecteur Avr2 de *F. oxysporum* a révélé que la protéine présente des analogies structurales avec ToxA (une toxine hôte-spécifique de *P. tritici-repentis* ; Di *et al.*, 2017). La détermination de la structure d'Avr2 a permis de dissocier, grâce à des expériences de mutagenèse dirigée, les domaines impliqués dans la fonction effectrice de ceux impliqués dans sa reconnaissance par la protéine de résistance de la tomate I2 (Di *et al.*, 2017). D'autres effecteurs d'agents pathogènes filamenteux partagent une organisation structurale commune avec des protéines fonctionnellement similaires, telles que les protéines de liaison aux carbohydrates (Avr4), les protéines contenant un domaine LysM (Ecp6) et les protéines semblables à l'effecteurs Nep1 (necrosis- and ethylene-inducing peptide 1) (Giraldo et Valent, 2013 ; Lo Presti *et al.*, 2015). D'autres effecteurs appartiennent à des familles structurales telles que les RXLR-WY, MAX ou RALPH sans qu'une fonction commune ait pour le moment pu leur être associée (Mukhi *et al.*, 2020 ; Figure 14).

Tout comme pour la prédiction des répertoires d'effecteurs et la localisation de ces effecteurs, les progrès des outils bio-informatiques facilitent la prédiction de leur structure. Ces dernières années, la modélisation informatique est devenue l'un des domaines de recherche en biologie structurale qui évolue le plus rapidement. Expérimentalement, les

structures des protéines sont principalement étudiées par des méthodes telles que la cristallographie aux rayons X, la résonance magnétique nucléaire (RMN), la diffusion biologique de rayons X aux petits angles (la bio-SAXS) et la cryo-microscopie électronique (Cryo-EM). Bien qu'elles soient puissantes et présentent des atouts différents, ces méthodes ont chacune leurs limites et impliquent des investissements considérables en termes de ressources financières et de temps. Même dans ce cas, rien ne garantit qu'une structure puisse être résolue, notamment pour les protéines présentant un désordre intrinsèque ou celles résidant ou interagissant avec des membranes. Néanmoins, au cours des 50 dernières années, une grande quantité d'informations structurales ont été accumulées, et ont été déposées dans la base de données protéiques PDB (Protein Data Bank) (Burley *et al.*, 2021). Le développement d'outils d'analyse structurale permettent d'obtenir des informations complètes sur le repliement et les motifs protéiques, l'évolution et les relations structure/fonction, afin de comprendre les principales fonctions des protéines et leur rôle dans les processus biologiques (Anfinsen , 1973). Au cours de la dernière décennie, les scientifiques ont mis au point divers systèmes et algorithmes pour résoudre le problème de la prédiction de la structure 3D des protéines telles que I-TASSER, TrRosetta et alphaFold2 (Yang *et al.*, 2015, Yang *et al.*, 2020, Jumper *et al.*, 2021).

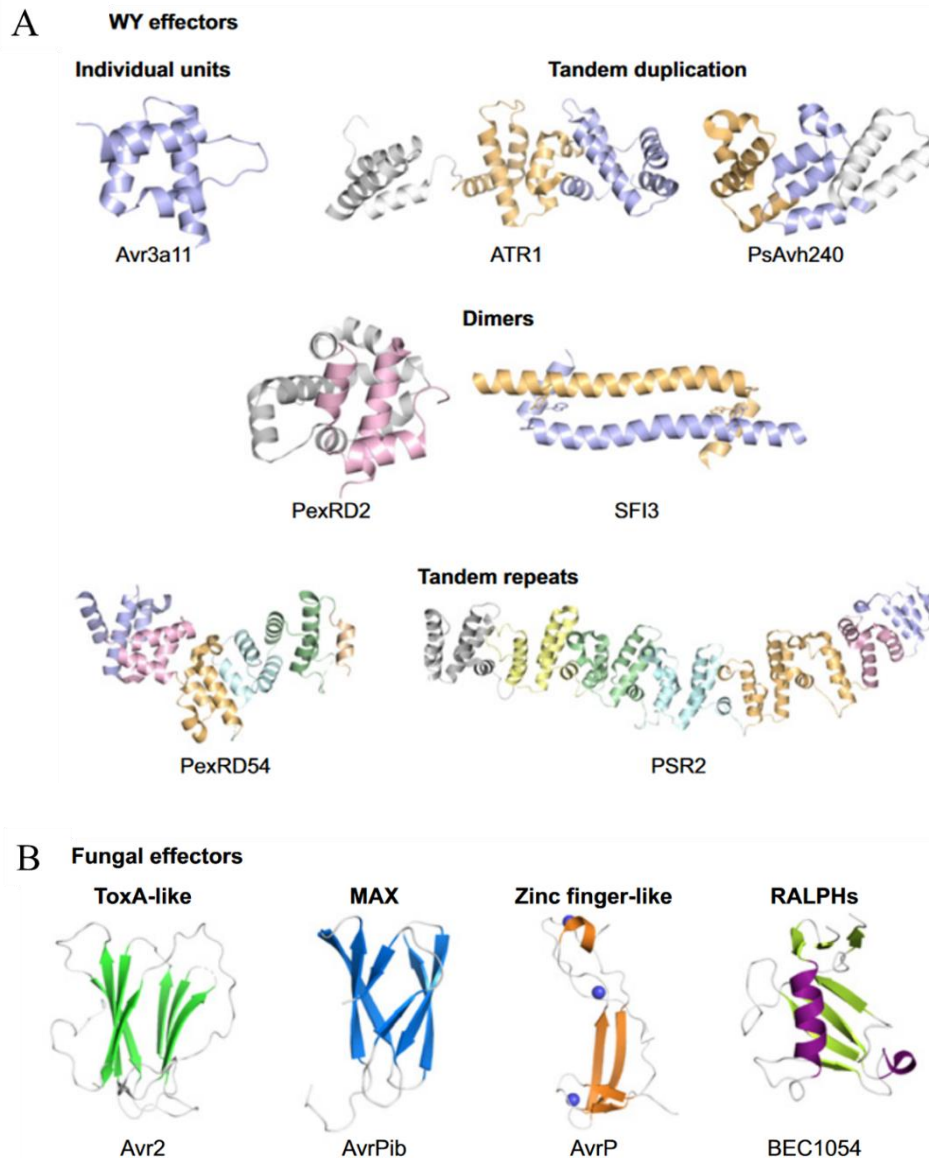


Figure 14. Structures d'effecteurs d'oomycètes et de champignons phytopathogènes.

(a) Les structures des effecteurs à domaine WY des oomycètes révèlent la flexibilité et l'adaptabilité du repliement WY. Les structures montrées sont définies comme des unités individuelles (Avr3a11), des duplications en tandem (ATR1, PsAvh240), des dimères (PexRD2, SFI3), et des répétitions en tandem (PexRD54, PSR2). (b) Les structures des effecteurs fongiques mettent en évidence la diversité des domaines/motifs. Les structures d'effecteurs fongiques récemment déterminées et présentant un repliement de type ToxA (Avr2), un repliement MAX (AvrPib), un motif de type doigt de zinc (AvrP) et RALPH (BEC105) sont présentées (modifié d'après Mukhi *et al.*, 2020)

d) Mode d'action des effecteurs : éviter l'alarme, activer ce qui sert et inhiber ce qui nuit.

La plupart des fonctions des effecteurs ont été déduites de l'identification de protéines ciblées lors de l'interaction avec l'hôte. Une restriction conceptuelle est que les effecteurs peuvent interagir avec les molécules de l'hôte, soit pour les cibler et les manipuler, soit pour les utiliser en tant qu'éléments de la machinerie cellulaire de l'hôte afin d'atteindre leur destination finale. Plusieurs études ont montré qu'une partie des effecteurs interagissaient avec les mêmes cibles végétales, appelées « hubs » (Mukhtar *et al.*, 2011 , González-Fuente *et al.*, 2020). Ainsi des souches de champignons délétées d'un ou plusieurs effecteurs peuvent ne présenter aucun défaut de pathogénie observable, suggérant une redondance fonctionnelle entre effecteurs (Kamper *et al.*, 2006). Parmi les fonctions effectrices identifiées jusqu'à présent, on peut distinguer différents modes d'action permettant une invasion réussie de l'hôte (Figure 15)

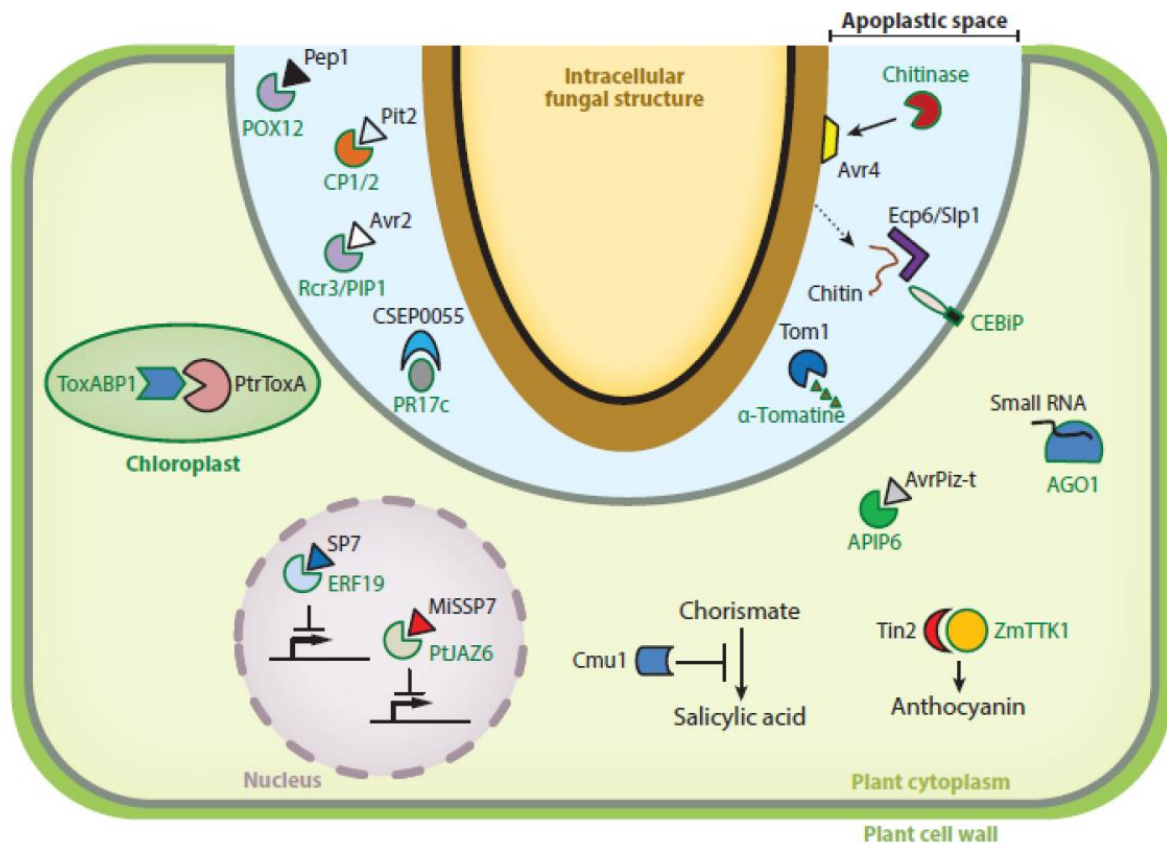


Figure 15. Exemples de mode et site d'action des effecteurs fongiques.

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

- Les effecteurs à rôle défensif

Les effecteurs ayant un mode d'action défensif séquestrent les motifs moléculaires associés aux micro-organismes ou modifient leur paroi cellulaire lors de la pénétration afin de minimiser la reconnaissance (PAMP). Plusieurs effecteurs fongiques possèdent un domaine LysM qui est impliqué dans la liaison à la chitine. Deux rôles distincts ont été mis en évidence pour ces effecteurs à domaine LysM : un rôle de protection de la chitine fongique contre les chitinases de la plante, et un rôle de masquage des fragments de chitine relargués suite à l'action des chitinases végétales. Les effecteurs LysM de *C. fulvum* Ecp6 et de *M. oryzae* Slp1 inhibent compétitivement le récepteur CERK1 et une chitin-elicitor binding protein (CEBiP)

par interaction directe (de Jonge *et al.*, 2010; Mentlak *et al.*, 2012). Cette interaction permet le masquage des fragments de chitine afin qu'ils ne soient pas reconnus par les PRR correspondants et ne déclenchent pas la PTI. 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).

- Les effecteurs inhibiteurs

De nombreux effecteurs ont des activités inhibitrices, par exemple contre les protéases, les glucanases ou les peroxydases liées aux défenses mises en place par la plante. Les effecteurs peuvent aussi interférer avec les voies de signalisation intracellulaires permettant la mise en place de réactions de défense (Rose *et al.*, 2002 ; Shabab *et al.*, 2008).

Inhibition de protéase

Certains effecteurs ciblent les protéines et protéases végétales, afin de les dégrader ou les inhiber. Ainsi, l'effecteur Avr2 de *C. fulvum* interagit avec de nombreuses protéases de tomate telles que Pip1 ou C14 (van Esse *et al.*, 2008). Chez l'oomycète *P. infestans*, Avrblb2 empêche la sécrétion de la protéase C14, protéase également ciblée par les effecteurs EPIC1 et EPIC2B de *C. fulvum*, ce qui fait d'elle une cible conservée (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).

Interférence avec les voies hormonales

Nombre d'effecteurs fongiques ciblent les voies de signalisation hormonales chez l'hôte, afin de favoriser l'infection ou la colonisation. La voie de signalisation de l'acide salicylique est particulièrement visée par plusieurs effecteurs. Chez *U. maydis*, l'effecteur Cmu1 perturbe la production d'acide salicylique (Djamei *et al.*, 2011). Ce champignon est également capable de sécréter une salicylate hydrolase Shy1 qui dégrade l'acide salicylique lors de l'infection (Rabe *et al.*, 2013). Pslsc1 et Vdlscl hydrolysent l'isochorismate, un précurseur de l'acide salicylique chez *P. sojae* et *V. dahliae* respectivement (Liu *et al.*, 2014b). AvrLm1 de *L. maculans* interfère indirectement avec la voie de signalisation de l'acide salicylique (Ma *et al.*, 2018). L'effecteur MiSSP7 de *Laccaria bicolor*, indispensable à la mise en place de la symbiose mycorhizienne dans les racines de peuplier, inhibe la dégradation de PtJAZ6 empêchant ainsi l'induction de la voie de l'acide jasmonique (Plett *et al.*, 2014).

- Les effecteurs activateurs

Seuls quelques effecteurs ont été identifiés comme appartenant clairement à la catégorie des activateurs. Certains effecteurs activateurs fonctionnent en interférant avec la désactivation ou la dégradation de leur protéine hôte d'interaction, agissant ainsi positivement, bien qu'ils soient fondamentalement un type d'effecteur inhibiteur. Un exemple est l'effecteur Tin2 d'*U. maydis* qui stabilise la kinase TKK1 du maïs en inhibant sa dégradation favorisant ainsi la biosynthèse d'anthocyanes au détriment de la biosynthèse de lignine qui limite l'accès des hyphes fongiques aux cellules végétales (Tanaka *et al.*, 2014).

II.2.2.3. Origine et évolution des effecteurs

a) Origine des effecteurs

La compréhension de l'origine des effecteurs chez les agents pathogènes a été largement déduite de l'analyse de la variation fonctionnelle d'un petit nombre de gènes codant des effecteurs. L'adaptation à un nouvel hôte et l'échappement à la reconnaissance peuvent nécessiter des changements dans le répertoire des effecteurs, mais les mécanismes par lesquels une espèce pathogène peut acquérir de nouveaux effecteurs restent largement inexplorés. L'exemple de gain de gènes codant des effecteurs le mieux caractérisé est le transfert de ToxA entre trois agents pathogènes du blé non apparentés mais appartenant tous à la famille des Dothidéomycètes, *P. nodorum*, *P. tritici-repentis*, et *Bipolaris sorokiniana* (Friesen *et al.*, 2006 ; McDonald *et al.*, 2019), les isolats porteurs de ToxA étant significativement plus virulents que les isolats dépourvus de l'effecteur. Par ailleurs, des auteurs ont fait l'hypothèse que l'effecteur Ave1 de *V. dahliae* était d'origine végétale (de Jonge *et al.*, 2010 ; Faino *et al.*, 2016). Également chez *V. dahliae*, dans une souche très virulente sur le coton, une région génomique provenant potentiellement de *F. oxysporum f. sp. vasinfectum* confère une virulence accrue sur le coton mais pas sur d'autres hôtes (Chen *et al.*, 2014). Chez *F. oxysporum*, des chromosomes entiers peuvent être transférés entre souches et rendre des souches réceptrices, normalement non pathogènes, pathogènes (Ma *et al.*, 2010).

Différents mécanismes sont responsables du gain de gènes codant des effecteurs. Outre le transfert horizontal de gènes illustré par le transfert parasexuel de chromosomes mobiles de pathogénie chez *Fusarium sp.* (Ma *et al.*, 2010), il a été montré que des duplications de gènes suivies de mutations généraient de nouveaux gènes codant des effecteurs chez *U. maydis* (Dutheil *et al.*, 2016). Les compartiments génomiques riches en éléments

répétés favorisent particulièrement les duplications de gènes et le regroupement de gènes de pathogénie par recombinaison non homologue (Figure16). Les effecteurs peuvent également émerger par des réarrangements qui conduisent au gain d'une séquence codant pour un peptide signal, comme cela a été constaté pour l'effecteur codé par Zt80707 chez *Z. tritici* (Poppe *et al.*, 2015). Malgré les preuves que les duplications de gènes et d'autres types de réarrangements de séquences créent de nouveaux effecteurs, les origines de la plupart des gènes codant des effecteurs sont difficiles à retracer (Gibriel *et al.*, 2016, Plissonneau *et al.*, 2017). Ainsi, le génome de *Z. tritici* contient des centaines de gènes codant des effecteurs sans que l'existence d'une séquence homologue chez des espèces phylogénétiquement apparentées puisse être identifiée (Grandaubert *et al.*, 2015), suggérant l'apparition de ces effecteurs après la spéciation des espèces « sœurs » étroitement apparentées *Z. pseudotritici* et *Z. ardabiliae*.

b) Evolution des effecteurs

L'évolution des effecteurs est un compromis entre le fait d'échapper à la détection et l'optimisation de la fonction de virulence. La capacité d'adaptation à long terme d'un agent pathogène peut en outre dépendre de l'émergence continue de nouveaux effecteurs afin de pouvoir remplacer un effecteur qui a 'perdu la course aux armements' ou d'interagir avec de nouvelles protéines cibles. Ces demandes impliquent une forte pression évolutive conduisant à une évolution accélérée du répertoire d'effecteurs. En accord avec cette idée, des analyses de génomes entiers de champignons phytopathogènes montrent un taux plus élevé de sélection positive dans les gènes codant des protéines sécrétées par rapport aux gènes codant des protéines non sécrétées (Hacquard *et al.*, 2013; Joly *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2014; Wicker *et al.*, 2013). Les polymorphismes de présence/absence d'effecteurs entre ou au sein des espèces sont également fréquents (Sharma *et al.*, 2014; Stergiopoulos *et al.*, 2009; Wicker *et al.*, 2013). De nombreux effecteurs appartiennent à des familles multigéniques et se sont donc diversifiés à partir d'un ancêtre commun (Martin *et al.*, 2010; Pendleton *et al.*, 2014; Stergiopoulos *et al.*, 2012; Zuccaro *et al.*, 2011). Ces familles peuvent être soit spécifiques à une lignée, soit répandues dans le règne fongique, subissant de multiples expansions et pertes (Stergiopoulos *et al.*, 2012). Un lien entre la diversification des familles de gènes codant des effecteurs et l'adaptation à l'hôte a été établi pour *P. infestans* et *P. mirabilis*, infectant respectivement les Solanacées et les Magnoliales. Il s'agit de la diversification d'un membre

de la famille des effecteurs cystatin-like induisant une modification de la spécificité vis-à-vis de la cystéine-protéase associée de la plante hôte, ce qui a probablement facilité cette adaptation à l'hôte (Dong *et al.*, 2014). Ainsi, il y a des preuves que les effecteurs des agents pathogènes peuvent évoluer en familles multigéniques qui se diversifient selon le modèle d'évolution « boom-and-bust » (Figures 16 et 17) (Nei *et al.*, 2005 ; Stergiopoulos *et al.*, 2012)

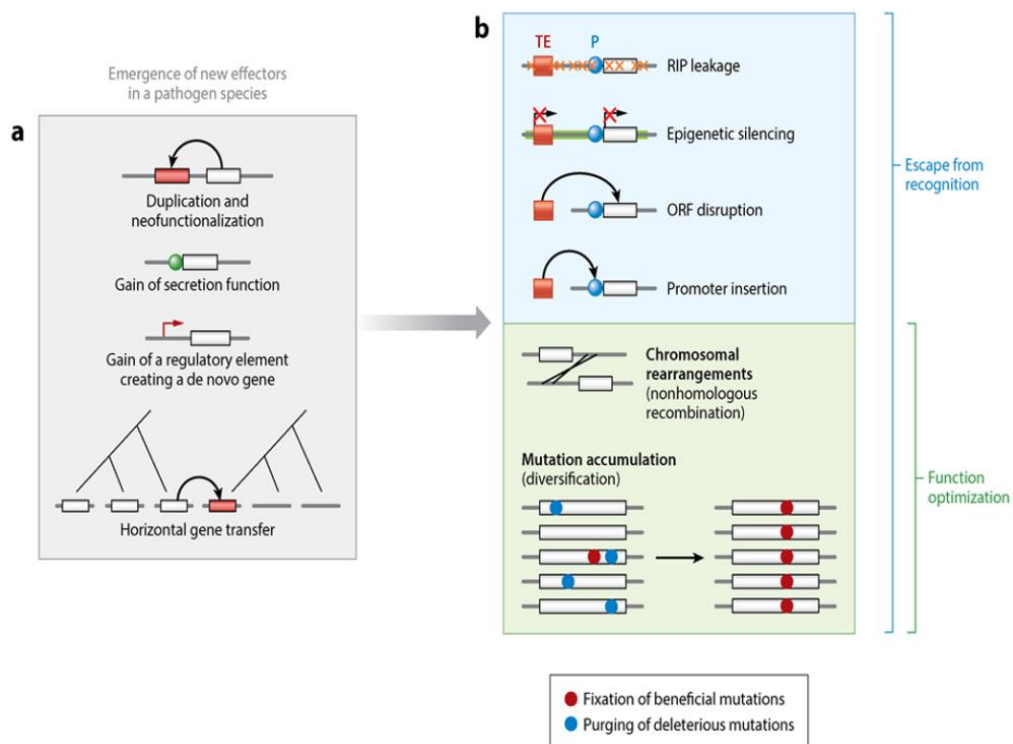


Figure 16. « Birth and death » : évolution des effecteurs.

De nouveaux effecteurs peuvent apparaître par duplication de gènes ou par l'acquisition d'une fonction de sécrétion. Les gènes codant des effecteurs peuvent également évoluer *de novo* à partir de séquences non codantes par le gain d'un élément régulateur ou être acquis horizontalement à partir d'une espèce pathogène différente. Les gènes codant des effecteurs peuvent subir une évolution rapide de leur séquence lors de la reconnaissance de l'effecteur par l'hôte. Le principal mécanisme conduisant à la perte d'un gène codant un effecteur est la présence et l'activité d'éléments transposables (ET) proches. Les effets des ETs peuvent inclure des mutations ponctuelles induites par le mécanisme de RIP (Repeat-Induced Point mutations), le 'silencing' épigénétique ou la perturbation de la séquence du gène. Echapper à la reconnaissance peut également être due à des réarrangements chromosomiques ou à la fixation de mutations bénéfiques. Les réarrangements et la sélection de mutations bénéfiques sont également des voies majeures entraînant une optimisation de la fonction des effecteurs. Abréviations : ORF, cadre ouvert de lecture ; P, région promotrice. (D'après Sanchez –Vallet *et al.*, 2018).

Bien que la reproduction sexuée soit l'un des principaux facteurs contribuant à la diversité génétique des organismes eucaryotes, une caractéristique des agents phytopathogènes, y compris la plupart des champignons, est leur taux limité de reproduction sexuée (Heitman *et al.*, 2006 ; Seidl *et al.*, 2014). La stratégie de propagation clonale permet la diffusion rapide d'allèles effecteurs favorables mais réduit, en même temps, l'échange de nouveau matériel génétique.

Les génomes de champignons phytopathogènes sont souvent caractérisés par des régions génomiques contrastées. On peut distinguer des structures en isochores, avec des régions riches en gènes, peu plastiques, et des régions riches en ET, plus dynamiques. Il peut également s'agir d'une structure distinguant le « core » génome ou génome principal, du génome « accessoire » ou génome dispensable. La compartimentation des génomes des agents pathogènes culmine dans les chromosomes accessoires qui sont dépourvus de gènes essentiels et abritent uniquement des gènes liés à la pathogénie (Ma *et al.*, 2010). L'activité des éléments transposables dans ces compartiments génomiques entraîne des duplications de gènes et la divergence ultérieure des gènes dupliqués (Raffaele *et al.*, 2012). Les transposons favorisent également le transfert horizontal de gènes, les pertes de gènes et la production de chimères, faisant de ce contexte génomique un terrain de jeu idéal pour l'évolution des caractères de virulence.

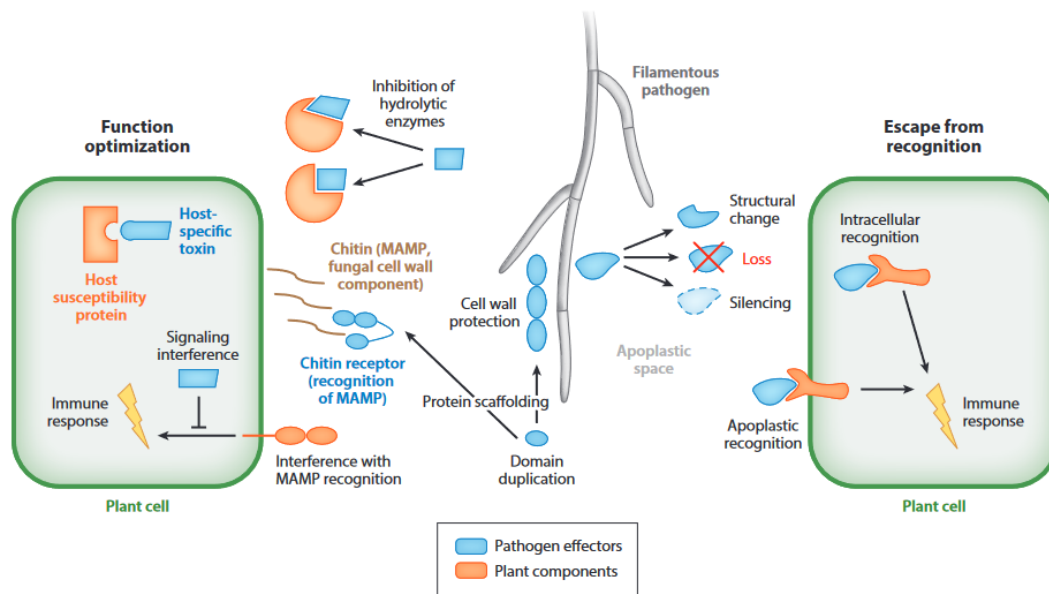


Figure 17. L'évolution des effecteurs permet d'optimiser leur fonction (à gauche) ou d'échapper à la reconnaissance (à droite).

Les changements de conformation structurale peuvent aider à acquérir de nouvelles cibles. Par exemple, les effecteurs de *Phytophthora infestans* et de l'espèce étroitement apparentée *Phytophthora mirabilis* ont évolué, permettant d'inhiber les enzymes hydrolytiques de nouveaux hôtes. Les effecteurs, tels que les effecteurs LysM, évoluent également par la duplication de domaines et des changements de structure. Ces effecteurs fongiques conservés interfèrent avec la reconnaissance de la chitine, qui est un composant essentiel de la paroi cellulaire fongique. Certaines toxines hôte-spécifique ciblent les protéines de sensibilité de l'hôte et induisent la nécrose. Les effecteurs peuvent manipuler les voies de signalisation et empêcher l'hôte de déclencher une forte réponse immunitaire. L'évolution des effecteurs permet également d'échapper à la reconnaissance de l'hôte. Certains changements dans la conformation des effecteurs peuvent maintenir des fonctions essentielles tout en permettant d'éviter la détection par une protéine de résistance. Abréviations : MAMP, Microbe-Associated Molecular Pattern (d'après Sanchez-Vallet *et al.*, 2018).

III. Facteurs impliqués dans l'immunité végétale

Comme cela a été précédemment abordé, le second niveau de résistance développé par les plantes (l'ETI) tel qu'il est décrit dans le modèle en zig-zag fait intervenir des acteurs importants de l'immunité de la plante, les gènes de résistance (R). Ainsi, dans le modèle gène-pour-gène défini par Flor, les protéines R de la plante « résistante » sont capables de reconnaître spécifiquement des effecteurs de l'agent pathogène. Cette reconnaissance entraîne tout un ensemble de réactions de défense dont le plus souvent une mort cellulaire localisée appelée HR et l'arrêt de la colonisation de la plante par l'agent pathogène. Contrairement à la PTI qui peut être commune à plusieurs plantes d'un même groupe phylogénétique, l'ETI est génotype-spécifique. De ce fait, de nouvelles terminologies s'imposent. Ainsi, les effecteurs qui sont reconnus par la plante via des gènes R spécifiques sont appelés protéines

d'avirulence (AVR), quant à la résistance totale déclenchée par cette reconnaissance, elle est qualifiée de résistance qualitative.

III.1. Les protéines de résistance

En fonction de leur localisation, on distingue deux catégories de protéines R : les récepteurs trans-membranaires et les récepteurs intracellulaire (ou protéines cytoplasmiques). Les récepteurs trans-membranaires TM-LRR (Transmembrane Leucine-Rich Repeat) sont ancrés dans la membrane des cellules végétales grâce à leur domaine transmembranaire. Ils sont soit de type RLP (Receptor-Like Protein) soit de type RLK (Receptor-Like Kinase). Ces derniers renferment des sous familles de récepteurs qui se distinguent par leurs caractéristiques structurales. Ainsi, parmi les RLK, on peut distinguer les LRR (Leucine-Rich Repeat), les motifs Lysine (LysM), les WAK (Wall-Associated Kinase) et les RLCK (Receptor-Like Cytoplasmic Kinase) (Figure 18). Les récepteurs intracellulaires, aussi appelé NBS-LRR ou NLR (Nucleotide-Binding Site Leucine-Rich-Repeat) reconnaissent les effecteurs localisés dans le cytoplasme végétal. Ils possèdent une architecture multi-domaines comprenant un domaine C-terminal de type Leucine-Rich Repeat (LRR), un domaine Nucleotide-Binding (NB) central, et un domaine N-terminal qui peut majoritairement être de deux types: Toll-Interleukin Receptor (TIR, très semblables aux protéines Toll-like impliquées dans l'immunité innée des mammifères) ou Coiled-Coil (CC). Les protéines TIR sont restreintes aux dicotylédones alors que les protéines CC se retrouvent également chez les monocotylédones. Ces domaines très polymorphes définissent la nature de leur fonction et ils sont ainsi organisés en larges familles multigéniques dans les génomes des plantes (Takken et Goverse 2012 ; Jacob *et al.* 2013). Selon le couple AVR/R, la reconnaissance ainsi que la transduction du signal entraînant les réactions de défense peuvent être assurées par différents domaines (Figure 18)

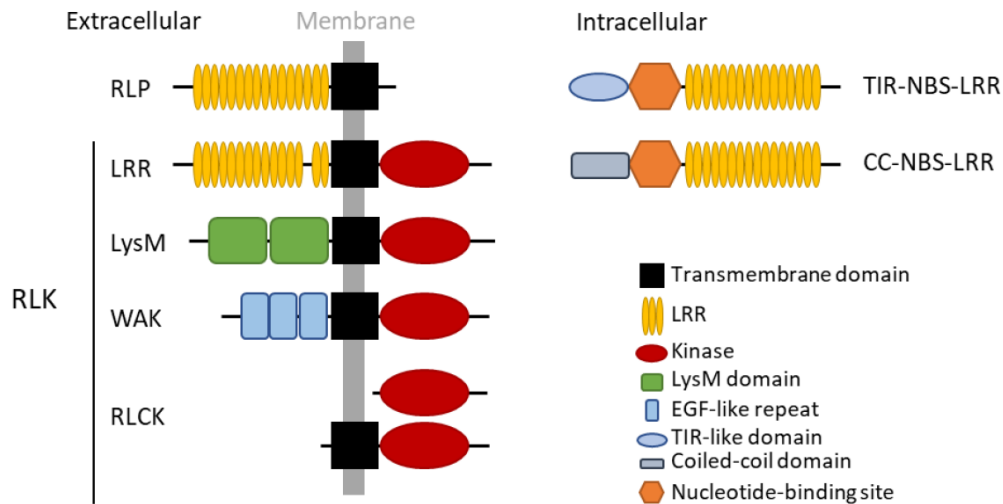


Figure 18. Principales classes de protéines de résistance.

Les RLP et RLK, sont des récepteurs transmembranaires qui reconnaissent, grâce à leur partie extracellulaire, les PAMP et les effecteurs agissant dans l'apoplasme. Les récepteurs intracellulaires dits NBS-LRR, quant à eux, reconnaissent les effecteurs adressés au cytoplasme. RLP: Receptor-like protein; RLK: Receptor-like kinase; LRR: Leucine-rich repeat; LysM: Lysine motif; WAK: Wall-associated kinase; NBS: Nucleotide-Binding site; TIR: Toll and interleukin; CC: Coiled-coil; EGF: Epidermal growth factor (D'après Tör *et al.*, 2009).

III.2. La reconnaissance des effecteurs par les protéines de résistance

Différentes stratégies sont utilisées par les protéines R pour reconnaître les effecteurs. A ce jour, il existe quatre modèles permettant d'expliquer la reconnaissance des effecteurs protéiques. Le premier modèle, directement inspiré de la relation « gène pour gène », est le modèle ligand-récepteur ou éliciteur-recepteur (Figure 19), dans lequel l'effecteur interagit directement avec la protéine de résistance (Catanzariti *et al.*, 2010; Dodds *et al.*, 2006; Jia *et al.*, 2000; Keen, 1990; Steinbrenner *et al.*, 2015). Pita/AvrPita de *M. oryzae* est le premier couple R-Avr dont l'interaction directe a été démontrée (Jia *et al.*, 2000). C'est aussi le cas de plusieurs couples R-Avr décrit chez *M. lini*, les effecteurs de *M. lini* AvrP1, AvrP2, AvrP3, AvrP4, AvrM et AvrL567 interagissant directement avec les protéines de résistance du lin P1, P2, P3, P, M, L5, L6 et L7 (Dodds *et al.*, 2006 ; Catanzariti *et al.*, 2010).

Afin d'expliquer comment, avec un répertoire de protéines R limité, les plantes peuvent détecter les effecteurs d'un si grand nombre d'agents pathogènes, d'autres modèles ont été proposés. Deux modèles expliquent comment les protéines R sont capables de détecter

les dommages causés par des effecteurs sur des protéines cibles de l'hôte. Il s'agit du modèle de garde et du modèle du leurre (ou « decoy ») (Figure 19). Ainsi, dans le modèle de garde, l'interaction de l'effecteur avec sa cible ou son altération est détectée par une protéine de résistance (Dangl et Jones, 2001). C'est le cas de RIN4 (RPM1 Interacting protein 4), ciblée par 3 effecteurs de *P. syringae* : AvrRpm1, AvrRpt2 et AvrB. RIN4 est constitutivement associée aux protéines R d'*A. thaliana* RPM1 et RPS2. Le clivage de RIN4 par AvrRpt2 active RPS2 (qui était précédemment maintenu dans un état inactif par RIN4 ; Kim *et al.*, 2002), et la phosphorylation de RIN4 par AvrRpm1 ou AvrB entraîne l'activation de RPM1 (Mackey *et al.*, 2003). Dans le modèle du leurre (ou « decoy »), la cible de l'effecteur n'est pas un vrai interactant mais un leurre inactif (van der Hoorn et Kamoun, 2008). Ainsi, chez *C. fulvum*, des travaux ont suggéré que Rcr3 serait un leurre pour Avr2 dont la véritable cible serait Pip1 (van der Hoorn et Kamoun, 2008).

Enfin, dans le modèle de leurre intégré ou « integrated decoy » (Figure 19), les NLR ont intégré dans leur architecture des domaines additionnels qui correspondent également à des leures mimant les cibles des effecteurs (Cesari *et al.*, 2014 ; Kroj *et al.*, 2016). C'est notamment le cas des protéines R RGA5 et Pik-1 qui possèdent un domaine HMA contenant un decoy intégré. Ce dernier concept de « leurre intégré » (NLR-ID) suggère un mécanisme évolutif de diversification des NLR par duplication de la cible de l'effecteur et fusion de ce domaine dans la protéine de résistance, ce qui permet aux plantes d'élargir leur capacité de reconnaissance des agents pathogènes (Grund *et al.* 2019).

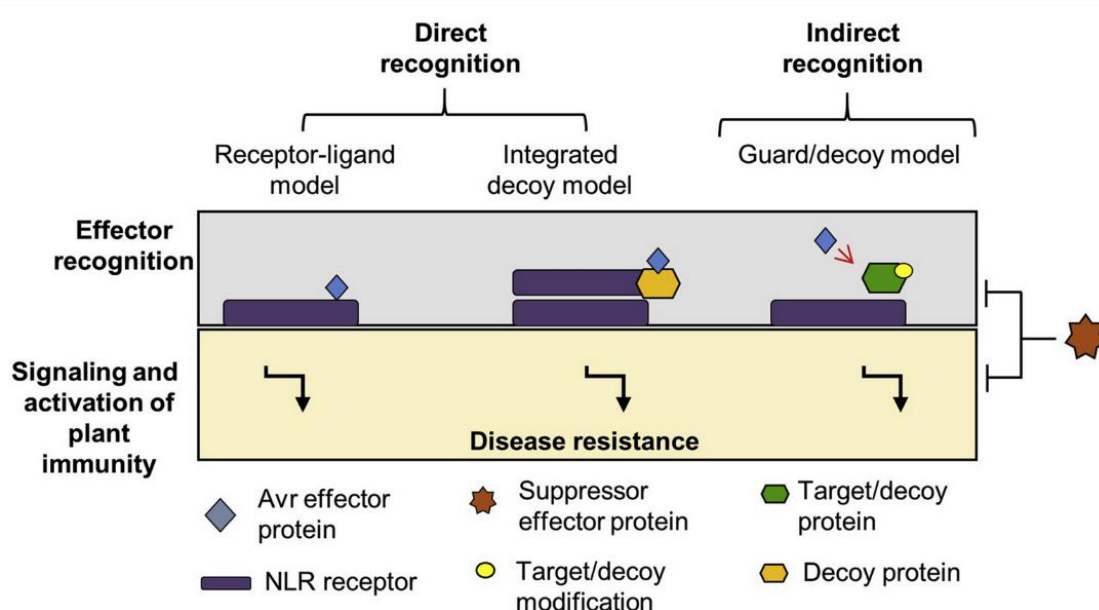


Figure 19. Les différents modèles de reconnaissance des effecteurs par les protéines de résistance.

Modèle ligand-récepteur (Receptor-ligand model) : la protéine de résistance reconnaît l'effecteur en interagissant physiquement avec lui. Modèle de garde (Guard model) : la protéine de résistance détecte une modification dans la cible d'un effecteur, ce qui déclenche les réactions de défense. Modèle du « leurre » (decoy model) : la protéine de résistance détecte des modifications dans une protéine leurre qui imite la cible de l'effecteur. Contrairement au modèle de garde, en l'absence de la protéine de résistance, la protéine leurre n'entraîne pas un gain de fitness pour l'agent pathogène puisqu'elle ne constitue pas un facteur de sensibilité de la plante. Modèle de leurre intégré (Integrated decoy) : le leurre est directement intégré dans la protéine de résistance qui interagit directement avec l'effecteur (d'après Figueroa *et al.*, 2021)

Ces modèles de reconnaissance mettent en avant des relations 'simples' entre les protéines AVR et les protéines R correspondantes, avec une reconnaissance d'un seul gène AVR par un seul gène R qu'elle soit directe ou indirecte. Seulement, à mesure que de plus en plus de gènes R et AVR sont clonés et que leurs interactions moléculaires sont caractérisées, un nombre croissant d'interactions complexes entre les gènes R et AVR ont été identifiées (voir pour revue Petit-Houdenot et Fudal, 2017). Ainsi, des protéines AVR peuvent être reconnues par plusieurs protéines R ou plusieurs formes alléliques du même gène R. Dans le pathosystème *L. maculans* / colza, c'est le cas de la protéine AVR AvrLm1 qui est reconnue par Rlm1 et LepR3, d'AvrLm4-7 reconnue par Rlm4 et Rlm7 et d'AvrLm5-9 reconnue par Rlm5 et Rlm9 (Larkan *et al.*, 2013; Parlange *et al.*, 2009; Ghanbarnia *et al.*, 2018). Dans certains cas, deux protéines R doivent coopérer pour la reconnaissance d'une protéine AVR. Ainsi, *M. oryzae* possède plusieurs protéines R qui coopèrent pour la reconnaissance d'une protéine AVR, parmi lesquelles Pik-1/Pik-2 et RGA4/RGA5 qui sont toutes deux nécessaires pour la reconnaissance d'AVR-Pik et AVR-Pia respectivement (Okuyama *et al.*, 2011 ;

Kanzaki *et al.*, 2012). Certaines protéines R peuvent reconnaître des AVR d'organismes distincts. C'est le cas de la protéine R de la tomate Cf4 qui est capable de reconnaître l'effecteur AVR4 de *C. fulvum*, mais aussi son orthologue chez *Mycosphaerella fijiensis* (Stergiopoulos *et al.*, 2010). D'autres interactions non conventionnelles ont été mises en évidence plus récemment, comme le cas de deux protéines AVR requises pour la reconnaissance par une protéine R : AvrLm10A et AvrLm10B de *L. maculans* (Petit-Houdenot *et al.*, 2019) et SIX5 et AVR2 de *Fusarium oxysporum* (Ma *et al.*, 2015) toutes deux nécessaires pour déclencher la reconnaissance médiée par Rlm10 et I-2 respectivement. Enfin, une protéine AVR peut supprimer la reconnaissance d'une autre AVR par sa propre protéine R. Ainsi, AvrLm4-7 de *L. maculans* empêche la reconnaissance d'AvrLm3 et AvrLm5-9 par Rlm3 et Rlm9 chez le colza, respectivement, et Avr1 supprime la reconnaissance d'Avr2 et Avr3 par I-2 et I-3 chez la tomate (Houterman *et al.*, 2008 ; Plissonneau *et al.*, 2016 ; Ghanbarnia *et al.*, 2018).

Suite à la reconnaissance des effecteurs, il a été montré que les NLR sont activés par des changements de conformation et/ou une oligomérisation *via* la perturbation de leurs domaines N-terminaux qu'ils soient de type CC ou TIR (Martin *et al.* 2020; Wang *et al.* 2019a, 2019b). Néanmoins, ces études récentes montrent des configurations différentes entre les deux types de NLR suite à leur activation ce qui permet d'activer de manière différente les réponses immunitaires. En effet, la résolution de structure de ZAR1 (*HOPZ-ACTIVATED RESISTANCE 1*), un récepteur NLR de type CC chez *A. thaliana*, montre une organisation pentamérique dans la cellule végétale suite à son activation. Cette structure active, appelée « résistosome », forme un canal calcique s'insérant au niveau de la membrane plasmique des cellules végétales et perturbant l'intégrité cellulaire (Bi *et al.* 2021). Roq1, un récepteur de type TIR-NLR de *N. benthamiana*, forme un résistosome en forme de tétramère après activation. Cette structure entraîne l'ouverture du site actif du domaine TIR pour se lier et hydrolyser NAD⁺ (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide*) ce qui conduit à la mort cellulaire (Martin *et al.* 2020; Bayless et Nishimura 2020).

De récentes études indiquent que la plupart des NLR fonctionnent en paires ou en réseaux intégrant des récepteurs interconnectés et fonctionnellement spécialisés. Dans un premier temps, les NLR capteurs détectent l'agent pathogène, puis les NLR exécuteurs initient le signal immunitaire et enfin les NLR auxiliaires sont responsables de la transduction des réponses immunitaires (Adachi *et al.* 2019; Jubic *et al.* 2019). Les NLR auxiliaires (ou

NKR helpers) tels que les NRC (NLR Required for Cell-death) semblent avoir évolué à partir d'une paire de NLR agissant en tandem. Ainsi les NLR capteurs (les protéines de résistance) auraient rapidement évolué et se seraient diversifiés de manière significative au cours de l'évolution, alors que quelques NLR auxiliaires auraient été conservés pour contribuer au déclenchement de la HR associée à ces différentes protéines de résistance (Wu *et al.*, 2017). Cette évolution des NLR est un vrai atout pour les plantes puisque cela leur permet de bénéficier d'une résistance à large spectre en s'appuyant sur un nombre limité de NLR (Wu *et al.* 2017).

D'une manière générale, l'activité des protéines NLR est très finement régulée via leur activation, leur repliement et leur adressage sélectif afin de déclencher au mieux les réactions de défense sans pour autant provoquer une suractivation délétère pour la plante. Ainsi, les processus cellulaires fréquemment associés à l'ETI sont, tout comme pour la PTI, un influx de calcium, un burst oxydatif, l'activation de voies MAP kinase, la biosynthèse d'hormones et des reprogrammations transcriptionnelles. Cependant, la réaction la plus caractéristique de l'ETI reste le déclenchement de la HR (Jones et Dangl, 2006).

III.3. La suppression de l'ETI, résultat de la coévolution plante / agent pathogène

Comme nous l'avons vu auparavant, il existe une coévolution permanente entre un agent pathogène et son hôte. Pour de nombreux agents phytopathogènes, la colonisation de l'hôte est vitale pour la survie ou la réalisation du cycle de vie. Ainsi, le système immunitaire de l'hôte exerce une forte pression de sélection sur les agents pathogènes qui vont alors modifier leur répertoire d'effecteurs, échappant ainsi à la reconnaissance de l'hôte. Cette évolution est accentuée par le déploiement non raisonné de plantes résistantes dans les paysages cultureux engendrant de fortes pressions de sélection sur les populations d'agents pathogènes ayant de grandes capacités adaptatives (McDonald et Linde 2002) En effet, selon le type et surtout la vitesse de l'évolution liée à l'environnement dans lequel évolue le pathosystème, on peut distinguer deux scénarios évolutifs : la « course aux armements » et la « guerre des tranchées ».

Dans le modèle de « course aux armements », l'agent pathogène et l'hôte développent en cycles continus de nouveaux allèles d'effecteurs et de cibles végétales qui deviennent temporairement fixés dans la population (Dawkins *et al.*, 1979). Le polymorphisme est transitoire dans le temps et est soumis à une forte pression de sélection, conduisant à des

cycles de coévolution de forte amplitude. Dans cette théorie, il y a une nécessité pour l'agent pathogène ou pour la plante de fixer rapidement son (ou ses) allèle(s) de virulence/de résistance et, à l'inverse, de perdre cette (ou ces) dernière(s).

Dans le modèle de « guerre des tranchées », les cycles de coévolution de faible amplitude diminuent la probabilité de perdre des allèles. Les allèles d'effecteurs et de cibles végétales sont ainsi maintenus dans les populations, mais leurs fréquences oscillent dans le temps (Stahl *et al.*, 1999) (Figure 20). Bien que « la guerre des tranchées » puisse être courante dans les systèmes naturels, les systèmes agricoles suivent probablement le modèle de la « course aux armements » en raison des perturbations constantes que provoquent les agriculteurs sur les cultivars de plantes présents dans les champs (Brown *et al.*, 2001). En effet, plusieurs études des pathosystèmes fongiques en milieu agricole soutiennent le scénario de la course aux armements (Dodds *et al.*, 2006, Kanzaki *et al.*, 2012). 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, l'émergence d'un seul allèle de virulence est suffisante pour qu'il soit fortement sélectionné et que la population virulente envahisse le paysage agricole. On parle alors de « contournement de résistance » (« Bust »). Le contournement des gènes de résistance est plus ou moins rapide selon le patho-système et le gène de résistance en question.

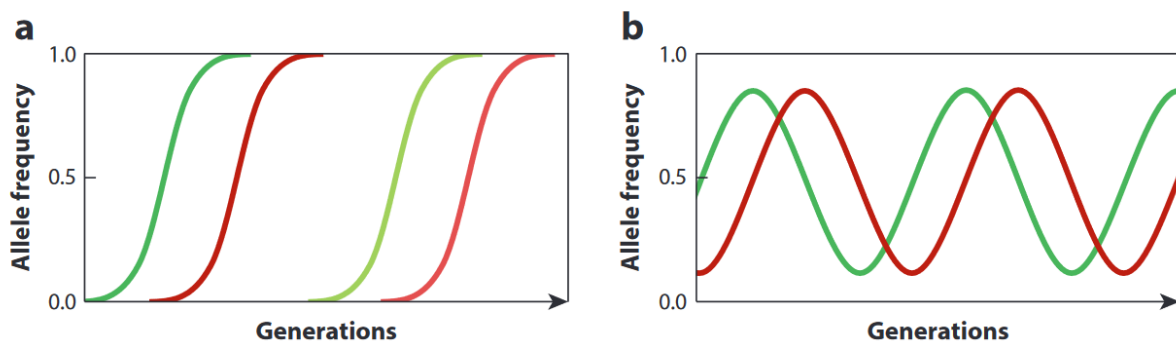


Figure 20. Scénarios expliquant l'évolution des interactions hôte-pathogène.

Représentation schématique des cycles de variations dans le modèle de la guerre des tranchées (A) et de la course aux armements (B). Les lignes rouges représentent la fréquence allélique d'un effecteur à l'échelle de la population d'un agent pathogène et les lignes vertes les fréquences alléliques d'un interactant associé chez l'hôte. La fixation des allèles (balayages sélectifs) et l'apparence récurrente de nouveaux allèles (indiqués par des lignes de couleur claire) dans le modèle de la course aux armements contrastent avec la fluctuation des fréquences alléliques dans le modèle de la guerre des tranchées. (D'après Lo Presti *et al.*, 2015).

Lorsqu'un gène de résistance permet à une plante de reconnaître un agent pathogène, plusieurs types d'évènements moléculaires peuvent permettre le contournement de cette résistance par l'agent pathogène. Quel que soit le mécanisme par lequel se fait cette évolution, le contournement de résistance peut se faire à trois niveaux : une modification de protéine AVR ou de son expression, la suppression de sa reconnaissance par la protéine R, une modification des réponses induites par sa reconnaissance.

III.3.1. Perte, modification ou dérégulation du gène d'avirulence

L'inactivation du gène Avr est le mécanisme le plus commun expliquant le contournement d'une résistance. L'altération de la protéine Avr conduit à la perte de la reconnaissance par la protéine de résistance R (Cesari, 2018). Différents mécanismes ont été rapportés comme étant responsables de perte de reconnaissance, incluant: une (des) mutation(s) non-synonyme(s) induites ou non par le mécanisme de RIP, des délétions partielles ou complètes du gène AVR, ou encore des insertions d'ETs (Frantzeskakis *et al.*, 2020 ; Fouché *et al.*, 2018; Rouxel et Balesdent 2017 ; Sánchez-Vallet *et al.*, 2018). Par exemple, le gain de virulence chez *P. graminis* f. sp. *tritici* est induit par de larges insertions d'ETs dans les gènes AVR *AvrSr35* et *AvrSr50* (57 et 26 kb, respectivement ; Salcedo *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2017). Chez *L. maculans*, les gènes AVR sont localisés dans des régions riches en éléments répétés inactivés par le RIP. Or, le RIP affecte ces gènes localisés à proximité des éléments répétés ce qui a conduit à l'inactivation des gènes AVR *AvrLm6* et *AvrLm4-7* (Daverdin *et al.*, 2012; Fudal *et al.*, 2009). Enfin, des mécanismes épigénétiques peuvent également être à l'origine de la perte de reconnaissance d'un gène AVR par dérégulation de son expression (Kasuga et Gijzen, 2013). *Avr3a* de *P. infestans* peut ainsi échapper à la reconnaissance par le gène de résistance *Rps3a*, sans altération de sa séquence codante, via l'action de petits ARN non codants (Qutob *et al.*, 2013).

III.3.2. Suppression de la reconnaissance du gène d'avirulence

Une suppression de la reconnaissance d'un gène AVR peut être observée, sans que ce dernier ne soit inactivé. En effet, plusieurs cas où un effecteur empêche la reconnaissance d'un autre effecteur ont été mis en évidence sans que le mécanisme induisant cette suppression ne soit connu. Ainsi, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* possède deux effecteurs, *Avr2* et *Avr3*, respectivement reconnus par les protéines de résistance I2 et I3. Cette reconnaissance est supprimée lorsqu'AVR1, un autre effecteur est présent (Houterman *et al.*, 2008). AVR1 est

lui-même reconnu par la protéine de résistance II. De même, l'effecteur *AvrLm4-7* de *L. maculans* permet de masquer la reconnaissance d'autres effecteurs, *AvrLm3* et *AvrLm5-9*, par leurs protéines de résistance correspondantes *Rlm3* et *Rlm9* (Plissonneau *et al.*, 2016 ; Ghanbarnia *et al.*, 2018) (Figure 21).

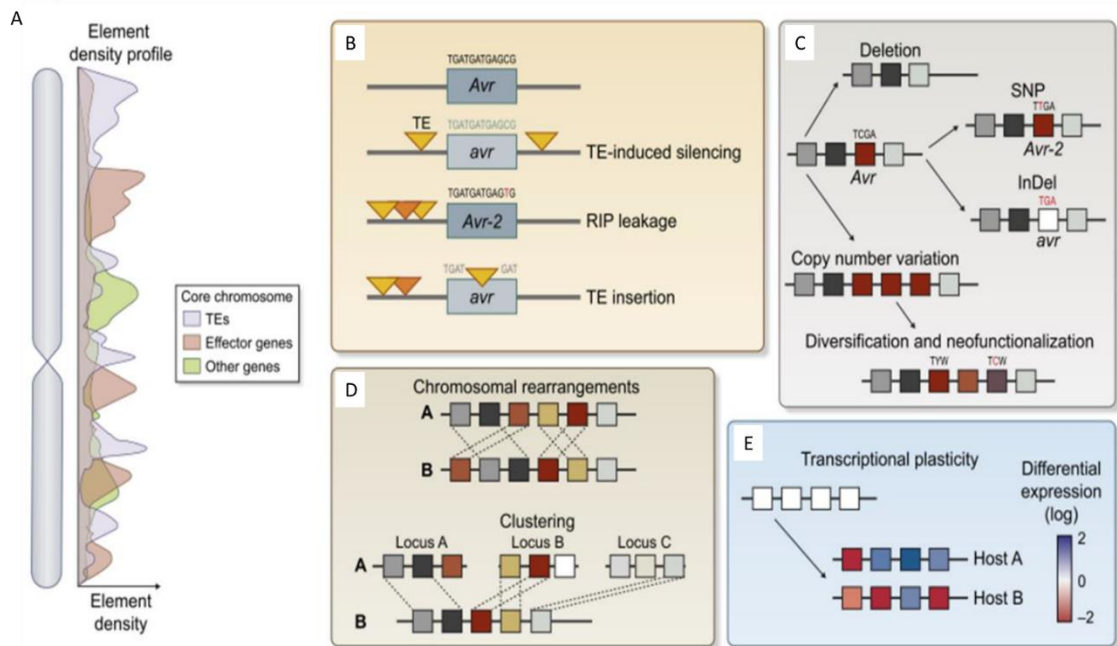


Figure 21. Différents mécanismes responsables de l'évolution des agents pathogènes vers la virulence.

A. Profils de densité en éléments transposables (TE), en gènes codant des effecteurs et en gènes non associés à la virulence (« *other genes* ») représentés selon leur densité le long d'un chromosome et mettant en évidence les compartiments génomiques riches en gènes et pauvres en TE (et l'inverse), ainsi que la compartimentation des gènes codant des effecteurs ; **B.** Des gènes d'avirulence (AVR) sous l'influence des TE (triangles jaune et orange) par différents mécanismes. Le gène AVR peut subir une méthylation de l'ADN réprimant l'expression du gène (« *TE-induced silencing* »). Le gène AVR peut subir des mutations ponctuelles induites par le RIP qui donnent lieu à un allèle différent (Avr-2) (« *RIP leakage* ») ; Un TE peut s'insérer dans le gène AVR (« *TE insertion* ») ; **C.** le gène AVR (carré rouge) peut évoluer, indépendamment de l'activité des TE, et être désactivé suite à des mutations de type « *InDel* » (insertion/délétion), complètement délété, dupliqué puis néo-fonctionnalisé par divergence de certaines copies ; **D.** réarrangements chromosomiques entre deux isolats (ou espèces) étroitement apparentés, A et B, peuvent entraîner soit la rupture de la synténie (en haut), soit le regroupement de gènes (en bas) ; **E.** régulation fine de l'expression des effecteurs en fonction du changement d'hôte.

III.3.3. Suppression des réponses induites lors de l'ETI

Faisant intervenir également des effecteurs, le contournement de la résistance par l'agent pathogène peut se faire en supprimant les réponses induites lors de l'ETI. Plusieurs effecteurs de *P. sojae* ont été rapportés comme étant des supprimeurs des réponses induites lors de l'ETI (Wang *et al.*, 2011, Jing *et al.*, 2016). L'effecteur HopD1 de *P. syringae* est capable de supprimer l'ETI chez *A. thaliana*. Cette suppression se fait par interaction directe avec le facteur de transcription NTL9 impliqué dans le contrôle de l'expression de gènes impliqués dans les réponses immunitaires au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (Mukhtar *et al.*, 2011, Block *et al.*, 2014). Chez *L. maculans*, AvrLm4-7 serait impliquée dans perturbation de défenses dépendant des ROS et/ou liées à l'inhibition de la voie de l'acide salicylique et de l'éthylène (Nováková *et al.*, 2016).

III.4 Stratégies de gestion des résistances pour augmenter leur durabilité

Plusieurs stratégies peuvent être utilisées pour optimiser la gestion de ces résistances et limiter leur contournement. En fonction de la dynamique d'émergence des isolats virulents et de leur fréquence dans les populations, des recommandations de combinaisons ou d'alternances de résistances sur le terrain peuvent être proposées. Un moyen efficace d'augmenter la durabilité d'une résistance spécifique est de la combiner avec une résistance quantitative. En effet, Brun *et al.* (2010) ont montré que, dans le pathosystème *L. maculans* / colza, une résistance qualitative était moins fréquemment contournée lorsqu'elle était exprimée dans des cultivars ayant un fond génétique de résistance quantitative. La durabilité d'une résistance dépend fortement de la protéine AVR qu'elle cible, et de son implication dans la pathogénie. Il a été postulé que les résistances ciblant les effecteurs les plus conservés dans les populations pathogènes (appelés "core effecteurs"), qui sont supposés être fortement impliqués dans la pathogénèse, seraient potentiellement plus difficiles à contourner, car le passage à la virulence serait associé à un coût de fitness élevé pour l'agent pathogène (Depotter et Doehlemann, 2019). Ceci est par exemple illustré par l'effecteur NIS1 (necrosis-inducing secreted protein 1), qui est largement conservé chez les Ascomycètes et Basidiomycètes (Irieda *et al.*, 2019). NIS1 agit sur les kinases conservées BAK1 et BIK1, empêchant l'explosion oxydative, une réponse immunitaire primaire. De même, Pep1 est un effecteur conservé chez les agents pathogènes responsables du charbon qui empêche également l'explosion oxydative. Contrairement à NIS1, pep1 inhibe des peroxydases apoplastiques (Hemetsberger *et al.*, 2015). Les mutants pep1 d'*U. maydis* sont incapables de

pénétrer dans l'épiderme de l'hôte. De même, l'inactivation de NIS1 chez *M. oryzae* entraîne une forte baisse de pathogénie sur l'orge et le riz.

Les protéines effectrices conservées semblent être les cibles parfaites pour la sélection en vue d'une résistance durable, car leur nature probablement indispensable rend plus difficile pour l'agent pathogène de contourner la résistance. En outre, les protéines de résistance reconnaissant des « core effecteurs » pourraient aussi être en mesure de conférer une résistance à un large éventail d'agents pathogènes (**Figure 22**). C'est notamment le cas du gène de résistance de la tomate *Cf4* qui est capable de reconnaître l'effecteur *AVR4* de *F. fulvum* mais aussi son orthologue chez *Mycosphaerella fijiensis*, ou *Cf2* qui confère une résistance à la fois à *F. fulvum* et au nématode *Globodera rostochiensis* via leurs gènes *AVR* respectifs, *AVR2* et *Gr-VAP1*, ciblant la même protéase de la tomate gardée par *Cf2* (Rooney *et al.*, 2005 ; Lozano-Torres *et al.*, 2012 ; Stergiopoulos *et al.*, 2012).

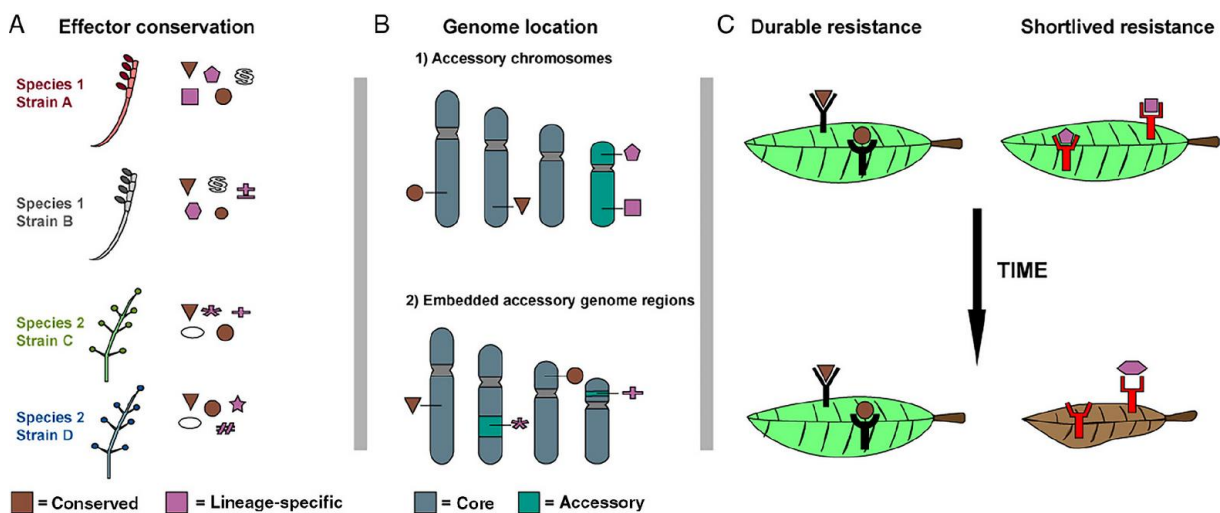


Figure 22. Résistance durable grâce au ciblage de gènes codant des effecteurs conservés localisés dans le génome central.

(A) Les effecteurs présentent différents degrés de conservation. Certains effecteurs sont conservés chez différentes espèces d'agents pathogènes, tandis que d'autres ne sont présents que dans des lignées spécifiques d'agents pathogènes. (B) Les génomes des agents phytopathogènes filamenteux contiennent souvent des régions accessoires, riches en répétitions, où les mutations semblent se fixer plus facilement que dans les régions centrales du génome. Ces régions génomiques accessoires peuvent (1) comprendre des chromosomes complets ou (2) être intégrées dans le génome central. (C). Représentation comparative entre une résistance durable et une résistance contournée dans le temps (D'après Depotter et Doehlemann, 2020)

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

IV.1 *Brassica napus*

Le colza (*Brassica napus*) est une allo-tétraploïde ($2n = 38$, AACC) issu de croisements interspécifiques, qui se sont produits au cours de ces 10 000 dernières années entre les ancêtres diploïdes de *B. rapa* ($2n = 20$, AA) et *B. oleracea* ($2n = 18$, CC) appartenant au triangle de U (Figure 23) (U, 1935). On estime la date de la première hybridation à environ 7500 ans (Allender et King, 2010). Certaines études indiquent que *B. napus* pourrait avoir plusieurs origines indépendantes, y compris une origine européenne généralement spéculée (Chalhoub *et al.*, 2014) et une origine possible en Asie (Liu, 2000). Il est néanmoins difficile de déterminer ses origines précises sans avoir à disposition de *B. napus* sauvage. Des études ont montré que le génome A de *B. napus* pourrait avoir évolué à partir d'un ancêtre européen du navet (*B. rapa ssp. rapa*) (Lu *et al.*, 2019 ; Yang *et al.*, 2016) et que le génome C pourrait avoir été apporté par l'espèce sauvage de Brassica *B. montana* ($2n = 18$) (Song *et al.*, 1997) ou par l'ancêtre commun du chou-rave, du chou-fleur, du brocoli et du chou chinois (Lu *et al.*, 2019). L'origine européenne a été soutenue par une analyse récente de l'évolution des populations basée sur des séquences génomiques et transcriptomiques (An *et al.*, 2019 ; Lu *et al.*, 2019). Le génome de *B. napus* a été séquencé, révélant une séquence génomique de 1130 Mb répartie sur 9 chromosomes issus du génome C (*B. oleracea*) et 10 chromosomes issus du génome A (*B. rapa*), et comportant plus de 100 000 gènes prédits (Chalhoub *et al.*, 2014)

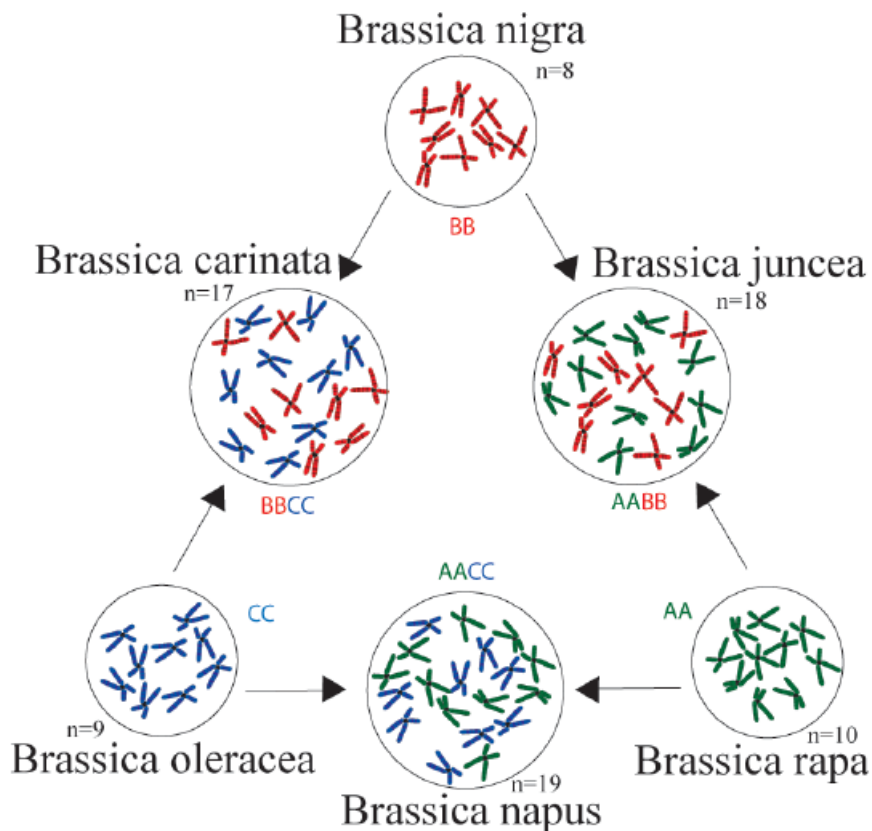


Figure 23. Croisements interspécifiques entre espèces de *Brassicaceae*.

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

B. napus est une jeune espèce allo-tétraploïde ayant une assez courte histoire culturelle (Allender et King, 2010). *B. napus* était initialement cultivé comme légume, y compris *B. napus ssp. rapifera* (rutabaga) et *B. napus ssp. pabularia* (colza fourrager et chou frisé de Sibérie) pour la consommation humaine et le fourrage animal, puis a été progressivement domestiqué en tant que culture oléagineuse (*B. napus ssp. oleifera*) après la révolution industrielle (Allender et King, 2010 ; An *et al.*, 2019 ; Applequist et Ohlson, 1972 ; Damania *et al.*, 1997). La sélection " double-low " ayant pour but la diminution de la teneur en glucosinolates et en acide érucique dans les graines, réalisée depuis les années 1950 (Stefansson et Kondra, 1975 ; Krzymanski *et al.*, 1999) et les améliorations génétiques locales pour une maturité précoce et l'hétérosis, comme celles réalisées en Chine (Fu *et al.*, 1989 ; Liu, 2000 ; Song *et al.*, 2020 ; Zou *et al.*, 2019), ont rapidement établi le colza comme une culture oléagineuse mondiale majeure et ont considérablement amélioré sa valeur industrielle et son statut.

Les variétés de *B. napus* peuvent être divisées en trois types : les variétés de printemps (pas d'exigence de vernalisation ; cultivées principalement en Amérique du Nord, en Scandinavie, en Europe de l'Est et en Australie), les variétés semi-hivernales (exigence de vernalisation faible à modérée ; cultivées en Chine et en Europe) et les variétés hivernales (exigence de vernalisation stricte ; cultivées principalement en Europe) (Liu, 2000). Le colza d'hiver est le type original qui a été cultivé pour la première fois en Europe à la fin du Moyen Âge (Fussell, 1955). Ensuite, le colza de printemps a été différencié vers 1700 (Bonnema, 2012) et s'est répandu en Angleterre à la fin du 18^e siècle, puis au Canada dans les années 1940 et en Australie dans les années 1970 (Cowling, 2007). Le colza semi-hivernal chinois est originaire de Pologne et a fait son chemin vers la Chine en passant par le Japon (Wu *et al.*, 2018).

Parmi les espèces de grande culture, le colza se classe septième en termes de surfaces récoltées dans le monde en 2018. 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). En tant que culture oléagineuse, le colza figure en seconde position, avant le tournesol, mais loin derrière le soja. 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. En parallèle, l'amélioration des variétés et des pratiques culturales a permis de multiplier par 1,75 le rendement des cultures.

Le cycle de culture du colza d'hiver s'étend de septembre à juillet de l'année suivante, laissant place à plusieurs bioagresseurs qui peuvent s'attaquer à différents stades de développement et organes. Les insectes ravageurs peuvent causer des pertes importantes à différentes étapes du cycle de culture du colza, tels que les grosses altises (*Psylliodes chrysocephala*) et les altises des crucifères (*Phyllotreta sp.*), les charançons du bourgeon terminal (*Ceutorhynchus pycitarsis*), les charançons de la tige de colza (*Ceutorhynchus napi*) ou les méligèthes (*Meligethes aeneus*).

Plusieurs agents phytopathogènes comme *Erysiphe cruciferarum* (responsable de l'oïdium), *Cylindrosporium concentricum* (responsable de la cylindrosporiose), *Mycosphaerella capsellae* et *Pseudocercospora capsellae* (responsables de la maladie des taches blanches), *Alternaria brassicae* (responsable de la maladie des tâches noires) ou encore *Plasmodiophora brassicae* (responsable de la hernie des crucifères) s'attaquent aux cultures de colza. Toutefois, les deux champignons phytopathogènes les plus dommageables sont *S.*

sclerotiorum (responsable de la pourriture blanche) et *L. maculans* (responsable du phoma du colza). Si l'utilisation de fongicides semble être efficace pour contrôler *S. sclerotiorum*, l'utilisation de variétés génétiquement résistantes au phoma est la seule méthode efficace pour contrôler *L. maculans* (Source : Terres Inovia).

IV.2. *Leptosphaeria maculans*

a) Phylogénie

L. maculans est un ascomycète hémibiotrophe de la classe des Dothideomycètes et de l'ordre des Pléosporales qui regroupe un nombre important d'espèces phytopathogènes, dont plusieurs champignons pathogènes de grandes cultures, tels qu'*A. brassicicola*, *Cochliobolus heterostrophus* (responsable de l'helminthosporiose du maïs), *P. tritici-repentis* (responsable de la maladie des tâches bronzées du blé), *Z. tritici* (agent de la septoriose du blé) ou encore *M. fijiensis*, anciennement *Pseudocercospora fijiensis* (agent de la cercosporiose noire du bananier), ainsi que *L. maculans* et *L. biglobosa*. La classe des Dothidéomycètes regroupe environ 19000 espèces, réparties en 249 genres (Hyde *et al.*, 2013) et renferme une large diversité de modes de vie. En effet, les Dothidéomycètes comprennent des espèces saprophytes, des espèces associées aux plantes de façon pathogène, endophyte et symbiotique, ainsi que des espèces lichénisées (Schoch *et al.*, 2009).

L. maculans fait partie d'un complexe d'espèces, incluant une espèce proche, *L. 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 associées dans toutes les régions de production du colza, et retrouvées dans tous les organes de la plante (Fitt *et al.*, 2006; Liu Z. *et al.*, 2014a). Néanmoins, l'impact de *L. biglobosa* est considéré comme négligeable par rapport à celui de *L. maculans*.

b) Cycle de vie

L. maculans présente un cycle de vie complexe qui alterne plusieurs modes de nutrition (**Figure 24**). En Europe, il se développe vers la fin de l'été de façon saprophyte sur les résidus de tiges de colza où il accomplit sa reproduction sexuée et produit des ascospores qui représentent la principale forme de dispersion du champignon. Ces ascospores infectent les jeunes feuilles de colza et germent. Le champignon pénètre dans la plante via les stomates ou des blessures et se développe de façon hémibiotrophe, provoquant des nécroses foliaires et

la production de pycnides renfermant des pycnidiospores (spores asexuées) qui assurent une infection secondaire à courte distance. Le cycle infectieux se poursuit pendant l'hiver par une longue phase de croissance asymptomatique au cours de laquelle *L. maculans* agit comme un endophyte et colonise la base de la tige. Enfin, à la fin de la saison culturale, une nouvelle phase nécrotrophe reprend, au début de l'été, conduisant à la nécrose des tissus du collet pouvant entraîner une verse parasitaire (Rouxel et Balesdent, 2005).

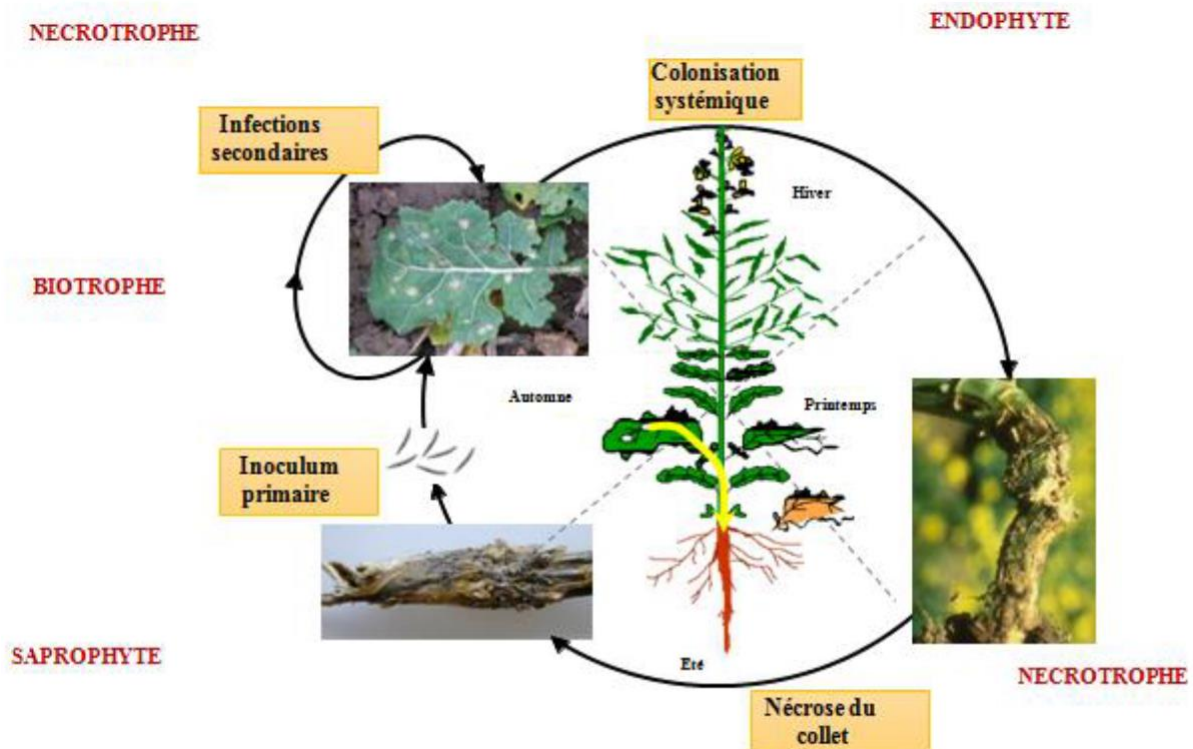


Figure 24. Cycle de vie de *Leptosphaeria maculans*.

Le champignon débute son cycle par une phase de vie saprophyte sur les débris de culture. Il se comporte par la suite comme un biotrophe lorsqu'il pénètre dans la feuille, puis comme un nécrotrophe lorsqu'il provoque l'apparition de lésions. *L. maculans* colonise par la suite la tige de façon endophyte, et termine son cycle de vie en redevenant nécrotrophe et en provoquant une nécrose au niveau du collet (D'après Rouxel et Balesdent, 2005).

b) Génome

Le premier séquençage du génome de *L. maculans* en 2011, par méthode « Sanger » avait permis d'avoir un génome de 45,1 Mb qui renfermait 12469 gènes prédit. Ce premier séquençage 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 (Rouxel *et al.*, 2011). 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 ETs et en gènes codant des effecteurs.

Un re-séquençage du génome ainsi que l'acquisition de données transcriptomiques a permis d'améliorer l'assemblage du génome et l'annotation des gènes de *L. maculans* 'brassicae' (Dutreux *et al.*, 2018). La nouvelle version du génome de *L. maculans* a été générée grâce à la technologie de séquençage long-read Nanopore. Grâce à cette technologie, le séquençage de fragments supérieurs à 10 kb a permis de réduire drastiquement le nombre de super-contigs et d'améliorer, ainsi, l'assemblage et notamment celui des régions riches en AT et en ETs (Figure 25). Ainsi, la nouvelle version du génome de *L. maculans* révèle une taille de 45,9 Mb répartie sur 19 chromosomes dans lesquels on détecte 13 047 gènes. 36,9% du génome de *L. maculans* est composé de régions riches en AT qui sont riches en ETs (Figure 25) et pauvres en gènes (319 gènes présents au sein de ces régions). Les rares gènes identifiés dans ces régions riches en AT sont généralement impliqués dans la pathogénie, incluant des gènes codant des PPS, dont tous les gènes AVR clonés jusqu'à présent chez *L. maculans*. Ces isochores AT sont constitués d'une mosaïque d'éléments répétés dégénérés par le mécanisme de RIP, ce qui explique le plus fort taux de bases A et T dans ces isochores, le RIP induisant des mutations C→T et G→A (Galagan et Selker, 2004).

A l'inverse, les régions GC contiennent 97% des gènes prédits chez *L. maculans* (Dutreux *et al.*, 2018) et sont pauvres en ETs. Le génome de *L. maculans* présente également un chromosome dispensable, dans lequel se situe notamment le gène d'avirulence AvrLm11 (Balesdent *et al.*, 2013).

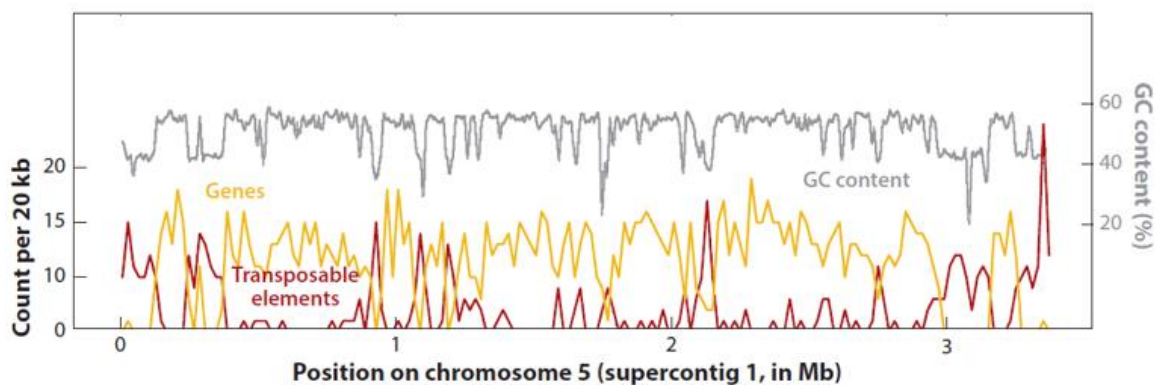


Figure 25. Exemple de structure en isochores du génome de *L. maculans*.

Les isochores GC constituent le « core genome », représentant 67% du génome et contenant 97% des gènes prédits. A l’opposé, les isochores AT représentent une partie accessoire et très plastique du génome, enrichie en gènes codant des Petites Protéines Sécrétées et en éléments transposables (adapté de Sanchez-Vallet *et al.*, 2018)

c) Lutte contre le phoma du colza

L’inefficacité de l’utilisation des fongicides pour lutter contre la nécrose du collet du colza est due en grande partie au cycle de vie du champignon et à l’épidémiologie de la maladie. En effet, l’inoculum primaire provient des ascospores produites sur les résidus de culture et libérées régulièrement après les pluies, c’est à dire de septembre à avril (West *et al.*, 2001). Ainsi, pour une protection efficace, il faudrait appliquer régulièrement des fongicides et réussir à faire coïncider les applications avec les pics de libération des ascospores. L’enfouissement des résidus de culture après la récolte est une bonne alternative au traitement chimique, mais semble être de moins en moins utilisée, principalement à cause de l’impact environnemental qu’engendre le labour profond (dépense énergétique, érosion des sols, perte de biodiversité ; Nilsson, 2010; Rusch *et al.*, 2011). Ainsi, la culture de génotypes résistants reste le meilleur moyen de contrôler le phoma du colza.

Ainsi, des cultivars de colza possédant deux types de résistance sont déployés : une résistance qualitative – totale et monogénique – basée sur des gènes de résistance majeurs (*Rlm*) et une résistance quantitative – partielle et polygénique – permettant de tolérer la maladie et de limiter la propagation du champignon dans la tige et le développement de la nécrose au collet en fin de cycle cultural. Les résistances qualitatives, même si elles présentent l’avantage d’obtenir un arrêt total de l’infection, sont fréquemment contournées par

des populations d'agents pathogènes adaptés. C'est notamment le cas de *Rlm1*, déployée dans les années 1990, et qui a été contournée seulement après 3 saisons culturales (Rouxel *et al.*, 2003). Il a été montré que les résistances qualitatives du colza étaient moins fréquemment contournées par *L. maculans* lorsqu'elles étaient exprimées dans des cultivars présentant un fond génétique de résistance quantitative (Brun *et al.*, 2010). C'est le cas de *Rlm7* qui a été efficace durant dix ans après son déploiement au champ, sans doute en partie grâce à son introduction dans un fond génétique présentant une résistance quantitative (Balesdent *et al.*, 2015).

d) Gènes d'avirulence

Le nouveau séquençage du génome de *L. maculans* permet de mettre en évidence 1070 gènes codant des PPS. Certains de ces gènes, spécifiquement exprimés pendant les phases biotrophes de l'infection du colza, correspondent à des gènes AVR. Ainsi, actuellement, 14 gènes AVR ont été identifiés, dont 13 sont maintenant clonés (Tableau 1) (Balesdent *et al.*, 2002 ; Gout *et al.*, 2006 ; Fudal *et al.*, 2007 ; Parlange *et al.*, 2009 ; Balesdent *et al.*, 2013 ; van de Wouw *et al.*, 2014 ; Ghanbarnia *et al.*, 2015 ; Plissonneau *et al.*, 2016 ; Ghanbarnia *et al.*, 2018 ; Petit-Houdenot *et al.*, 2019 ; Degrave *et al.*, 2021 ; Jiquel *et al.*, 2021 ; Neik *et al.*, 2022). Tous les gènes AVR de *L. maculans* identifiés jusqu'à présent se trouvent dans des isochores AT, donc dans des régions riches en éléments répétés, 'non-essentielle' et pouvant donc être facilement délétées. Les gènes AVR étant localisés à proximité d'éléments répétés, ils peuvent également être affectés par le mécanisme de RIP engendrant de la diversité allélique ou même de l'inactivation génique (Daverdin *et al.*, 2012 ; Fudal *et al.*, 2009 ; Rouxel *et al.*, 2011). Ainsi, la perte, l'inactivation ou la mutation d'un gène peut permettre d'échapper à la reconnaissance de l'effecteur par la plante.

Le clonage et la caractérisation des protéines AVR de *L. maculans* a permis de mettre en évidence plusieurs relations non conventionnelles avec le gène de résistance correspondant (Petit-Houdenot et Fudal, 2017 ; Ghanbarnia *et al.*, 2018 ; Petit-Houdenot *et al.*, 2019). On peut retrouver des gènes AVR reconnus par deux gènes de résistance (*AvrLm1* reconnu par les gènes de résistance *Rlm1* et *LepR3*; *AvrLm4-7* reconnu par *Rlm4* et *Rlm7* ; *AvrLm5-9* reconnu par *Rlm5* et *Rlm9*), un gène AVR qui empêche la reconnaissance d'un autre gène AVR par un gène de résistance (*AvrLm4-7* qui empêche la reconnaissance d'*AvrLm3* par *Rlm3* et d'*AvrLm5-9* par *Rlm9*) et deux gènes AVR nécessaires pour induire une reconnaissance par un gène R (*AvrLm10A* et *AvrLm10B* reconnus par *Rlm10*).

Les travaux de Gay *et al.* (2021), exploitant un très grand jeu de données RNAseq couvrant l'ensemble du cycle de vie de *L. maculans*, ont mis en évidence une expression concertée de gènes codant des effecteurs putatifs répartie en huit clusters d'expression durant la colonisation du colza (figure 26). Les gènes AVR sont tous regroupés dans le cluster d'expression qui contient les gènes surexprimés à toutes les phases biotrophes de l'infection (cluster 2, Figure 26).

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

Gènes AvrLm de <i>L. maculans</i>	Références	Gènes de résistance associés	Espèces de Brassica	Références
<i>AvrLm1</i>	Gout <i>et al.</i> (2006)	<i>Rlm1</i> <i>LepR3</i>	<i>B. napus</i> <i>B. rapa ssp. sylvestris</i>	Ansan-Melayah <i>et al.</i> (1998) Yu <i>et al.</i> (2008), Larkan <i>et al.</i> (2013)
<i>AvrLm2</i>	Ghanbarnia <i>et al.</i> (2015)	<i>Rlm2</i>	<i>B. napus</i>	Ansan-Melayah <i>et al.</i> (1998) ; Larkan <i>et al.</i> (2015)
<i>AvrLm3</i>	Plissonneau <i>et al.</i> (2016)	<i>Rlm3</i>	<i>B. napus</i>	Balesdent <i>et al.</i> (2002) ; Delourme <i>et al.</i> (2004)
<i>AvrLm4-7</i>	Parlange <i>et al.</i> (2009)	<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)
<i>AvrLm5-9</i>	Ghanbarnia <i>et al.</i> (2018)	<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)
<i>AvrLm6</i>	Fudal <i>et al.</i> (2007)	<i>Rlm6</i>	<i>B. juncea</i>	Chèvre <i>et al.</i> (1996) ; Balesdent <i>et al.</i> (2002)
<i>AvrLm8</i>	Balesdent <i>et al.</i> (2002)	<i>Rlm8</i>	<i>B. rapa</i>	Balesdent <i>et al.</i> (2002)
<i>AvrLm10A</i> <i>AvrLm10B</i> <i>AvrLm11</i>	Petit-Houdenot <i>et al.</i> (2019) Balesdent <i>et al.</i> (2013)	<i>Rlm10</i> <i>Rlm11</i>	<i>B. nigra</i> <i>B. rapa</i>	Chèvre <i>et al.</i> (1996) Balesdent <i>et al.</i> (2013)
<i>AvrLmS-Lep2</i>	Neik <i>et al.</i> (2022)	<i>RlmS</i> <i>LepR2</i>	<i>B. napus</i> <i>B. rapa ssp. sylvestris</i>	Van de Wouw <i>et al.</i> (2009) Yu <i>et al.</i> (2005)
<i>AvrLm14</i>	Degrave <i>et al.</i> (2021)	<i>Rlm13</i>	<i>B. oleracea</i>	Degrave <i>et al.</i> (2021)
<i>LmStee98</i>	Jiquel <i>et al.</i> (2021)	<i>RLmStee98</i>	<i>B. napus</i>	Jiquel <i>et al.</i> (2021)

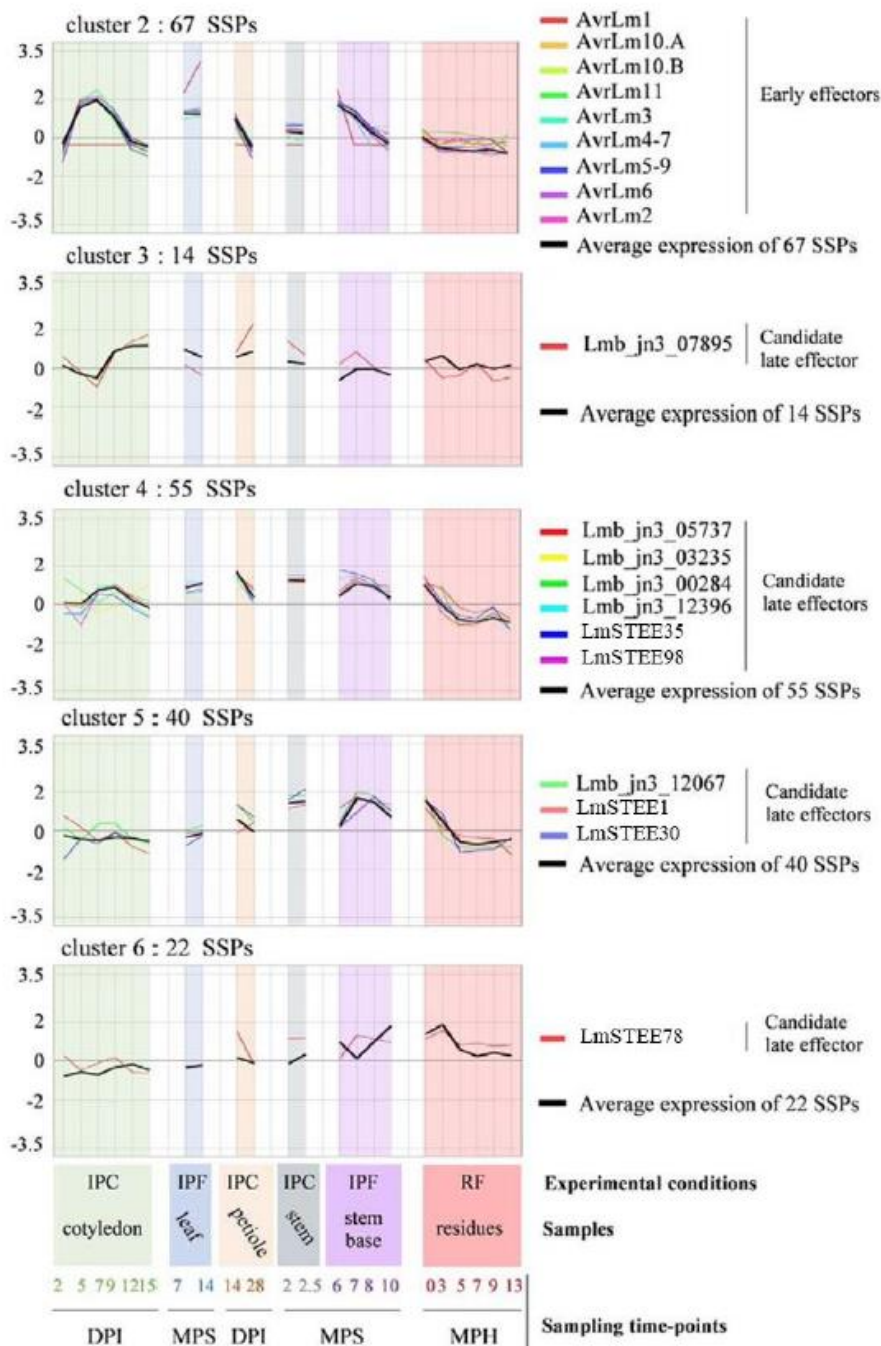


Figure 26. Profils d'expression des gènes codant des effecteurs connus ou putatifs de *L. maculans* lors de la colonisation du colza.

Les valeurs d'expression en $\text{Log}_2(\text{FPKM} + 1)$ de 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 indiquées différentes conditions d'infection : 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).

Alors que de nombreux effecteurs AVR ont été identifiés chez *L. maculans*, leur mode d'action et leur rôle dans le pouvoir pathogène du champignon restent méconnus. Ainsi, seuls quelques effecteurs AVR ont été étudiés pour leur rôle dans la pathogénie. Une implication dans la fitness fongique a pu être démontrée pour *AvrLm4-7* et, dans une moindre mesure, pour *AvrLm1*. En effet, l'absence de ces deux gènes a un effet mesurable en terme de nombre et de taille de lésions foliaires, ainsi qu'en distance parcourue par le champignon le long de la tige en condition contrôlée. Lors d'expérimentations au champ en l'absence de *Rlm4*, il a été observé que des souches possédant *AvrLm4-7* étaient retrouvées à une plus grande fréquence que des souches en étant dépourvues. Enfin, la croissance systémique de *L. maculans* de la feuille à la tige, au champ, est plus efficace en présence d'*AvrLm4-7* et *AvrLm1* (Huang *et al.*, 2006, 2010). *AvrLm1* interfère indirectement avec la voie de signalisation de l'acide salicylique (Ma *et al.*, 2018). Il interagit avec la 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.

V. Objectifs de la thèse

Le principal moyen de lutte contre le phoma du colza est la lutte génétique avec l'utilisation de cultivars de colza présentant d'une part une résistance qualitative, basée sur des gènes de résistance majeurs (*Rlm*), et d'autre part une résistance quantitative, permettant de tolérer la maladie, de limiter la propagation du champignon dans la tige et le développement de la nécrose au collet en fin de cycle cultural (Brun *et al.*, 2006). Les gènes de résistance majeurs *Rlm* permettent une reconnaissance des gènes AVR de *L. maculans* (appelés *AvrLm*) qui conduit à une interaction incompatible et, de ce fait, à une résistance de la plante. Toutefois les sources de résistance spécifiques sont rares chez le colza et des études visent soit à l'identification et à l'introgression de résistances provenant d'autres Brassica pour diversifier les ressources disponibles, soit à l'optimisation de la durabilité des résistances disponibles en mettant en place des stratégies d'alternance et/ou de pyramidage pour contrôler durablement la maladie. L'importance agro-économique de la maladie est telle qu'il existe un investissement aussi bien des acteurs du secteur des semences que de la recherche publique dans l'amélioration de la résistance du colza et la caractérisation de l'agent pathogène. Vingt-quatre gènes de résistance spécifiques *Rlm* contre *L. maculans* ont été génétiquement identifiés (Cantila *et al.*, 2021 ; Degrave *et al.*, 2021 ; Jiquel *et al.*, 2021) et cinq d'entre eux ont été clonés : *LepR3* (Larkan *et al.*, 2013) et *Rlm2* (Larkan *et al.*, 2015), qui sont deux variants alléliques codant des RLP, ainsi que *Rlm9*, *Rlm4* et *Rm7* (Larkan *et al.*, 2020 ; Haddadi *et al.*, 2021) qui sont également des variants alléliques codant des WAK-L (Wall-Associated Kinase-Like proteins). Parmi ces gènes *Rlm*, plusieurs ont déjà été introduits dans des variétés commerciales et contournés, plus ou moins rapidement, montrant une remarquable capacité de *L. maculans* à devenir virulent vis-à-vis d'une résistance donnée en utilisant une grande diversité de mécanismes (Rouxel et Balesdent, 2017).

La gestion durable des gènes de résistance spécifiques chez le colza et l'identification de nouvelles sources de résistance est donc un enjeu majeur pour développer le contrôle génétique comme un moyen efficace de limiter la maladie et d'éviter l'émergence rapide de souches virulentes. La durabilité d'une résistance dépend en partie de la protéine effectrice qu'elle cible, et de l'implication de celle-ci dans la pathogénie du champignon, mais aussi des interactions complexes mises en place entre protéines AVR et protéines R. Ainsi, 13 gènes *AvrLm* ont été clonés et caractérisés chez *L. maculans* (Tableau 1) permettant notamment de mettre en évidence des interactions non-conventionnelles avec les gènes de résistance du colza (Petit-Houdenot et Fudal, 2017 ; Ghanbarnia *et al.*, 2018 ; Petit-Houdenot *et al.*, 2019)

et une évolution rapide de ces gènes *AvrLm* sous pression de sélection (Rouxel et Balesdent, 2017).

Les effecteurs fongiques ont longtemps été décrits comme présentant peu ou pas d'homologies dans les bases de données et comme étant spécifiques d'une espèce ou de quelques isolats. Cependant, avec la disponibilité croissante de génomes fongiques de haute qualité, des répertoires d'effecteurs et parfois de la structure tridimensionnelle de ces effecteurs, des familles d'effecteurs conservées entre les espèces fongiques ont pu être identifiées. Or, il a été postulé que les résistances ciblant des effecteurs conservés dans les populations pathogènes (appelés "core effecteurs"), et qui sont donc supposés être fortement impliqués dans la pathogenèse, seraient potentiellement plus difficiles à contourner, car le passage à la virulence serait associé à un coût de fitness élevé pour l'agent pathogène (Depotter et Doehlemann, 2019). En outre, les gènes de résistance reconnaissant des 'core effecteurs' pourraient conférer une résistance à un large spectre d'agents phytopathogènes. Ainsi, plusieurs protéines AVR de *L. maculans* présentent également des homologues chez d'autres champignons phytopathogènes. C'est notamment le cas d'AvrLm10A et AvrLm10B, deux protéines AVR capables d'interagir physiquement et toutes deux nécessaires pour induire une reconnaissance par la protéine de résistance Rlm10 (Petit-Houdenot *et al.*, 2019). AvrLm10A et AvrLm10B possèdent quatre couples d'homologues au sein du protéome de *L. maculans* ainsi que plusieurs homologues chez d'autres champignons phytopathogènes. De même, AvrLm3 et AvrLm5-9, dont la reconnaissance par leurs protéines de résistance respectives Rlm3 et Rlm9 est supprimée par AvrLm4-7, présentent des homologies de séquences entre elles et ont également des homologues chez plusieurs champignons phytopathogènes. Sur ces bases, l'objectif de ma thèse était de caractériser fonctionnellement ces deux familles multigéniques d'effecteurs.

Les quatre homologues du couple AvrLm10A/AvrLm10B identifiés chez *L. maculans* sont codés par des gènes retrouvés dans différents environnements génomiques mais présentant tous une même organisation: deux gènes voisins en orientation inverse. Dans un premier temps, j'ai caractérisé les membres de la famille *AvrLm10* présents chez *L. maculans* et tenté de reconstruire leur histoire évolutive en étudiant : (i) leur cinétique d'expression au cours du cycle infectieux de *L. maculans* sur colza, (ii) leur conservation et leur polymorphisme dans les populations de *L. maculans*, (iii) la localisation *in planta* des protéines correspondantes et en testant leur interaction physique, (iv) leur conservation chez d'autres espèces fongiques phytopathogènes. Les résultats obtenus lors de cette caractérisation

de la famille *AvrLm10* sont présentés dans le chapitre 1 sous la forme d'un article de recherche déposé dans *bioRxiv* dont je suis première auteure.

AvrLm10A est homologue de l'effecteur SIX5 de *F. oxysporum* f.sp. lycopersici. SIX5 interagit physiquement avec un autre effecteur de *F. oxysporum* f.sp. lycopersici, AVR2, les deux protéines étant nécessaires pour qu'il ait reconnaissance par la protéine de résistance I2 chez la tomate (Ma *et al.*, 2015). Il a été montré que SIX5 avait la capacité de transporter AVR2 de cellule à cellule via les plasmodesmes et que la fonction d'AVR2 était de supprimer les réponses immunitaires induites lors de la PTI et de faciliter ainsi l'infection (Di *et al.*, 2017 ; Cao *et al.*, 2018). Sur la base de ces données, j'ai décidé d'approfondir la caractérisation fonctionnelle de trois membres de la famille *AvrLm10* en réalisant des expérimentations croisées entre *L. maculans* et *F. oxysporum* (en collaboration avec l'équipe de F. Takken, Université d'Amsterdam, Pays-Bas). J'ai déterminé l'implication des membres de la famille *AvrLm10* dans l'agressivité de *L. maculans*, leur capacité à supprimer la PTI, et également la capacité d'*AvrLm10A* et de ses homologues à faciliter le transport de leurs protéines partenaires de cellule à cellule via les plasmodesmes, ainsi que leur capacité à transporter d'autres partenaires comme AVR2. L'ensemble de ces résultats sont présentés dans le chapitre 2.

AvrLm3 présente des homologies de séquence avec *AvrLm5-9* et également avec *Ecp11-1*, une protéine AVR de *F. fulva*, l'agent de la cladosporiose de la tomate, qui est reconnu par le gène de résistance *CfECP11-1*. *AvrLm4-7* est impliqué dans une interaction non conventionnelle avec *AvrLm3* et *AvrLm5-9*, puisque la présence d'*AvrLm4-7* supprime la reconnaissance d'*AvrLm3* par *Rlm3* mais également celle d'*AvrLm5-9* par *Rlm9*. Les structures cristallines d'*AvrLm5-9* et d'*Ecp11-1* (ainsi qu'un modèle 3D d'*AvrLm3* basé sur la structure d'*Ecp11-1*) ont été obtenus au début de ma thèse. Alors qu'elles ne présentent que très peu d'homologies de séquence, *AvrLm5-9* et *AvrLm3* sont en fait des analogues structuraux d'*AvrLm4-7* (dont la structure avait précédemment été caractérisée ; Blondeau *et al.*, 2015). Sur ces bases, j'ai testé la capacité d'*ECP11-1* à induire une reconnaissance par *Rlm3* chez le colza et la capacité d'*AvrLm4-7* à supprimer cette reconnaissance. Ces résultats ont été intégrés à un article, dont je suis co-auteure, décrivant la découverte de la famille structurale comprenant *AvrLm3*, *AvrLm5-9*, *AvrLm4-7* et *Ecp11-1*, ainsi que d'autres effecteurs fongiques (Lazar *et al.*, 2020). Par la suite, j'ai poursuivi la caractérisation structurale et fonctionnelle des interactions entre *AvrLm3*, *Ecp11-1* (et leurs homologues) et *Rlm3* en : (i) en recherchant d'autres homologues chez des champignons phytopathogènes et en testant leur

capacité à induire la reconnaissance par *Rlm3*, (ii) en déterminant la capacité d'*AvrLm4-7* à supprimer la reconnaissance des différents homologues d'*AvrLm3* et *Ecp11-1* chez le colza, (iii) en caractérisant plus finement pour *Ecp11-1* et *AvrLm3* ce qui dans ces deux protéines AVR induit la reconnaissance par *Rlm3*. Ces résultats ont fait l'objet d'un article en préparation dont je suis première auteure. L'ensemble de ces travaux sont présentés dans le Chapitre 3.

Les effecteurs de *L. maculans* ainsi que d'autres agents pathogènes ont été initialement considérés comme des protéines sans homologues dans les bases de données. Cependant disponibilité croissante de génomes fongiques et la prédiction des répertoires d'effecteurs associés, ainsi que le développement d'outils efficaces de prédiction de structures 3D permettent de retrouver de plus en plus d'homologies de séquence ou d'analogies structurales entre effecteurs et/ou protéines AVR chez des espèces fongique phylogénétiquement éloignées.

Les résultats obtenus au cours de ma thèse vont, également, dans ce sens puisque nous avons mis en évidence d'une part une nouvelle grande famille d'effecteurs partageant potentiellement une fonction commune de transport d'effecteurs de cellule à cellule chez un grand nombre d'espèces fongiques phytopathogènes, et, d'autre part, identifié une famille structurale dans différentes espèces fongiques phytopathogènes, dont certains membres peuvent être reconnus par une même protéine de résistance. Je discuterai dans une dernière partie de mon manuscrit de (i) la façon dont ces résultats questionnent la notion de « core effecteurs » et de famille d'effecteurs et renforcent l'importance d'élargir les études à plusieurs modèles d'agents pathogènes, (ii) ce que peuvent apporter les outils de prédiction de structure à l'identification de famille d'effecteur et à la caractérisation fonctionnelle, (iii) comment utiliser la conservation des effecteurs et/ ou de leur fonction pour une meilleure gestion des résistances contre les agents pathogènes.

Chapitre I

Caractérisation de la famille multigénique AvrLm10

Introduction

Au cours de sa longue interaction avec le colza, *L. maculans* secrète un arsenal d'effecteurs, éléments clés de la pathogénèse, correspondant principalement à des protéines sécrétées, qui modulent l'immunité de la plante et facilitent l'infection (Lo Presti *et al.*, 2015 ; Rocafort *et al.*, 2020). Ces effecteurs ont récemment été répartis en huit vagues d'expression lors de l'infection, souvent spécifiques d'un mode de vie (biotrophie, transition de la biotrophie à la nécrotrophie, nécrotrophie) ou à un tissu (cotylédon, pétiole, tige, résidu de culture ; Gay *et al.*, 2021). Certains effecteurs sont reconnus par des protéines de résistance et sont alors appelés protéines AVR. Au total, douze gènes AVR, appelés *AvrLm*, ont été identifiés jusqu'à présent chez *L. maculans* (Gout *et al.*, 2006 ; Fudal *et al.*, 2007 ; Parlange *et al.*, 2009 ; Balesdent *et al.*, 2013 ; Ghanbarnia *et al.*, 2015 ; Plissonneau *et al.*, 2016 ; Ghanbarnia *et al.*, 2018 ; Petit-Houdenot *et al.*, 2019 ; Degrave *et al.*, 2021 ; Jiquel *et al.*, 2021 ; Neik *et al.*, 2022). Les douze gènes AVR se regroupent dans la vague 2 d'expression qui comprend des gènes codant des effecteurs exprimés pendant les stades asymptomatiques / biotrophes de la colonisation des cotylédons, pétioles et tiges (effecteurs de la biotrophie). Parmi ces gènes AVR, on retrouve *AvrLm10A* et *AvrLm10B*, codés par deux gènes voisins, organisés en orientation inverse, séparés par une grande région intergénique de 7,6 kb et localisés dans une région sub-télomérique. Les deux gènes, ainsi que leur région intergénique, sont nécessaires pour déclencher la résistance associée au gène *Rlm10* de la moutarde noire (Petit-Houdenot *et al.*, 2019).

Durant ses travaux de thèse, Yohann Petit-Houdenot avait entamé la caractérisation fonctionnelle d'*AvrLm10A/AvrLm10B* afin d'élucider leur possible interaction physique, de définir les compartiments cellulaires ciblés par *AvrLm10A* et *AvrLm10B*, et d'identifier les protéines végétales et les processus cellulaires ciblés par ces effecteurs. Ces travaux ont pu démontrer une interaction physique entre *AvrLm10A* et *AvrLm10B*, qu'elles présentaient toutes deux une localisation nucléocytoplasmique lorsqu'elles étaient exprimées sans leur peptide signal dans *N. benthamiana*. De plus, une cible potentielle, une pathogenesis-related protein 1-like (PR1-like), avait été identifiée grâce à un crible double hybride réalisé en exprimant le couple *AvrLm10A/AvrLm10B*. Enfin, *AvrLm10A* avec son peptide signal était capable de supprimer la mort cellulaire provoquée par trois inducteurs de la mort cellulaire : BAX (un facteur pro-apoptotique murin, inducteur général de mort cellulaire), NEP1 (un effecteur nécrotique de *C. higginsianum*, inducteur général de mort cellulaire) et *AvrPto* (un effecteur de *P. syringae* reconnu par un gène de résistance de *N. benthamiana*, marqueur de

l'ETI). Ce dernier a également été supprimé par AvrLm10B lorsqu'il était exprimé avec son peptide signal, et par la co-expression d'AvrLm10A et AvrLm10B avec ou sans leur peptide signal. Mais surtout, Y. Petit-Houdenot avait constaté qu'alors que les effecteurs AVR de *L. maculans* n'ont habituellement aucun homologue dans les bases de données, AvrLm10A et AvrLm10B ont des homologues chez plusieurs Dothideomycètes et Sordariomycètes phytopathogènes (Petit-Houdenot *et al.*, 2019). De plus, des gènes paralogues d'*AvrLm10A* et *AvrLm10B* ont été retrouvés dans d'autres régions du génome de *L. maculans*. Ainsi la souche de référence v23.1.3 possède 4 paires de paralogues à *AvrLm10A* et *AvrLm10B*, tous également organisés en orientation inverse.

C'est dans ce contexte, que j'ai entamé une étude de la conservation fonctionnelle et évolutive de ces paires de gènes. J'ai caractérisé les membres de la famille *AvrLm10* présents chez *L. maculans* et tenté de reconstruire leur histoire évolutive en étudiant : (i) leur cinétique d'expression au cours du cycle infectieux de *L. maculans* sur colza, (ii) leur conservation et leur polymorphisme dans les populations de *L. maculans*, (iii) la localisation *in planta* des protéines correspondantes et leur capacité à interagir physiquement, iv) leur conservation chez d'autres espèces fongiques phytopathogènes. Les résultats obtenus lors de cette caractérisation de la famille *AvrLm10* sont présentés sous la forme d'un article de recherche déposé dans *bioRxiv* qui sera prochainement soumis.

Article 1

*The neighboring genes AvrLm10A and AvrLm10B are
part of a large multigene family of cooperating
effector genes conserved in Dothideomycetes and
Sordariomycetes*

The neighboring genes *AvrLm10A* and *AvrLm10B* are part of a large multigene family of cooperating effector genes conserved in Dothideomycetes and Sordariomycetes

Nacera Talbi¹, Like Fokkens², Corinne Audran³, Yohann Petit-Houdenot¹, Cécile Pouzet⁴, Françoise Blaise¹, Elise Gay¹, Angélique Gautier¹, Thierry Rouxel¹, Marie-Hélène Balesdent¹, Martijn Rep² and Isabelle Fudal^{1*}

¹UR BIOGER, INRAE, Université Paris-Saclay, Thiverval-Grignon, France

²Molecular Plant Pathology, University of Amsterdam, Amsterdam, Netherlands

³UMR LIPME, Université de Toulouse, INRAE, CNRS, Castanet-Tolosan, France.

⁴FRAIB-TRI Imaging Platform Facilities, FR AIB, Université de Toulouse, CNRS, Castanet-Tolosan, France.

* Corresponding author: Isabelle Fudal (Isabelle.Fudal@inrae.fr)

Abstract:

With only a few exceptions, fungal effectors (small secreted proteins) have long been considered as species- or even isolate-specific. With the increasing availability of high-quality fungal genomes and annotations, trans-species or trans-genera families of effectors are being uncovered. Two avirulence effectors, *AvrLm10A* and *AvrLm10B*, of *Leptosphaeria maculans*, the fungus responsible for stem canker of oilseed rape, are members of such a large family of effectors. *AvrLm10A* and *AvrLm10B* are neighboring genes, organized in divergent transcriptional orientation. Sequence searches within the *L. maculans* genome show that *AvrLm10A/AvrLm10B* belong to a multigene family comprising five pairs of genes with a similar tail-to-tail organization. The two genes in a pair always had the same expression pattern and two expression profiles were distinguished, associated with the biotrophic colonization of cotyledons and / or petioles and stems. Of the two protein pairs further investigated Lmb_jn3_08094/Lmb_jn3_08095 and Lmb_jn3_09745 / Lmb_jn3_09746, one (Lmb_jn3_09745 / Lmb_jn3_09746) had the ability to physically interact, similarly to what was previously described for the *AvrLm10A/AvrLm10B* pair. *AvrLm10A* homologues are present in more than 30 Dothideomycete and Sordariomycete plant-pathogenic fungi whereas fewer *AvrLm10B* homologues were identified. One of the *AvrLm10A* homologues, SIX5, is

an effector from *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* physically interacting with the avirulence effector Avr2. We found that AvrLm10A homologues were associated with at least eight distinct putative effector families, suggesting an ability of AvrLm10A/SIX5 to cooperate with diverse effectors. These results point to a general role of the AvrLm10A/SIX5 protein as a “cooperator protein”, able to interact with diverse families of effectors whose encoding gene is co-regulated with the neighboring *AvrLm10A* homologue.

Introduction

Phytopathogenic fungi have a major impact on crops, and as such on economy, human health and environment (Fisher *et al.*, 2018). To achieve sustainable food production for a growing human population, we have to drastically reduce these pathogen impacts. The main management strategies are chemical control with fungicides and the use of naturally resistant crop cultivars. However, fungal plant pathogens can overcome these management strategies, sometimes even within a few years. A better understanding of the molecular bases of plant-pathogen interactions is a prerequisite to make progress towards innovative strategies of disease management.

Host plant invasion by phytopathogenic fungi relies on effectors, key elements of pathogenesis, mainly corresponding to secreted proteins, which modulate plant immunity and facilitate infection (Lo Presti *et al.*, 2015; Rocafort *et al.* 2020). Some effectors are recognized by resistance proteins (R) and then also termed avirulence (AVR) proteins. Recognition of a pathogen AVR protein triggers a set of immune responses grouped under the term Effector-Triggered Immunity (ETI; Jones and Dangl, 2006). Pathogens typically escape recognition and overcome resistance through ETI by altering the effector protein, by ceasing expression of the effector gene, or by deleting the effector gene (Jones and Dangl, 2006; Guttman *et al.*, 2014; Sánchez-Vallet *et al.*, 2018). This evolutionary pressure leads to rapid diversification and turnover of effector genes. As a result, fungal effector proteins often have few recognizable homologues. This impairs reconstructions of effector evolution, e.g. whether new effectors have been acquired through horizontal transfer or duplication and divergence.

L. maculans is a Dothideomycete that infects Brassica species, notably oilseed rape (*Brassica napus*), causing the stem canker disease (also called blackleg). It has a long and complex hemibiotrophic lifecycle on its host, including two alternating biotrophic and necrotrophic phases on leaves and stems. During its lengthy interaction with the plant, *L. maculans* expresses putative pathogenicity genes in eight waves. These are enriched in effector genes that are often specific to a lifestyle (biotrophy; transition from biotrophy to necrotrophy, stem necrotrophy) or tissue (Gay *et al.*, 2021). One of these waves, Wave2, includes effector genes expressed during the asymptomatic stages of leaf, petiole and stem colonization ('biotrophy'-effectors). These include the twelve AVR genes which have been identified so far in *L. maculans*, referred to hereafter as *AvrLm* genes (Balesdent *et al.*, 2002; Gout *et al.*, 2006; Fudal *et al.*, 2007; Parlange *et al.*, 2009; Balesdent *et al.*, 2013; Ghanbarnia *et al.*, 2015; Plissonneau *et al.*, 2016; Ghanbarnia *et al.*, 2018; Petit-Houdenot *et al.*, 2019;

Neik *et al.*, 2020; Degrave *et al.*, 2021). The genes in this wave display a peak of expression at 7 days post inoculation (DPI) on cotyledons, and are also strongly expressed during petiole and then stem colonization, being switched on and off multiple times during plant colonization (Gay *et al.* 2021). The main strategy to control *L. maculans* is genetic control using a combination of specific and quantitative resistance (Delourme *et al.*, 2006; Brun *et al.*, 2009). Specific resistance is based on the use of R genes (called *Rlm*) from *Brassica napus* or other Brassica species, encoding immune receptors that are able to recognize AvrLm proteins during cotyledon or leaf infection.

The genome of *L. maculans* has a well-defined bipartite structure composed of gene-rich, GC-equilibrated regions and large AT-rich regions poor in genes but enriched in transposable elements (TE) that are truncated and degenerated by Repeat-Induced Point mutation (RIP) (Rouxel *et al.*, 2011; Dutreux *et al.*, 2018). Effector genes in AT-rich regions have been shown to experience deletions, SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) and can accumulate mutations induced by RIP, which contributes to *L. maculans* escaping recognition by its hosts resistance genes (Daverdin *et al.*, 2012; Fudal *et al.*, 2009; Grandaubert *et al.*, 2014). Effector genes of Wave2, including the twelve *AvrLm* genes, are typically associated with AT-rich regions. Other expression waves contain effectors only expressed during the late asymptomatic colonization of petioles and stems and are not specifically associated to AT-rich regions (Gay *et al.*, 2021). These effector genes are more conserved in *L. maculans* populations and infrequently prone to accelerated mutation rate compared to those in AT-rich regions (Gervais *et al.*, 2016; Jiquel *et al.*, 2021).

Several AVR protein of *L. maculans* were found to display limited sequence identity with those of other plant pathogenic fungi: homologues of AvrLm6 were identified in two *Venturia species*, *V. inaequalis* and *V. pirina* (Shiller *et al.*, 2015), AvrLm3 was shown to have sequence homology with Ecp11-1, an AVR protein of *F. fulva* (Mesarich *et al.*, 2018) and a structural family, including, AvrLm4-7, AvrLm5-9, AvrLm3 and AvrLmS-Lep2 was identified in *L. maculans* and other plant pathogenic fungi (Lazar *et al.*, 2020). The most striking example of conserved AVR genes is the case of *AvrLm10A* and *AvrLm10B*, two neighboring genes localized in an AT-rich subtelomeric isochore and organized in divergent transcriptional orientation. Preliminary analyses suggested that *AvrLm10A* and *AvrLm10B* (and their genome organization) were conserved in several Dothideomycetes and Sordariomycetes species (and one Leotiomycete). They are coexpressed (Gay *et al.*, 2021) and their encoded proteins were found to physically interact *in vitro* and *in planta* (Petit-Houdenot *et al.*, 2019). Recently, it was shown that *AvrLm10A* and *AvrLm10B* are both

necessary to trigger *Rlm10*-mediated resistance (Petit-Houdenot *et al.*, 2019). Together, these findings strongly indicate that these effectors closely collaborate during infection. AvrLm10A showed a stronger level of conservation compared to AvrLm10B and a higher number of orthologues (Petit-Houdenot *et al.*, 2019). Among these was SIX5, an effector previously described in *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (*Fol*). The protein sequence is 37% identical to AvrLm10A and its gene is organized in a gene pair with another effector, AVR2 that is not homologous to *AvrLm10B*. Like AvrLm10A and AvrLm10B, Six5 and Avr2 physically interact and collaborate during infection (Ma *et al.*, 2015; Cao *et al.*, 2018), indicating that functional relations can be conserved over longer evolutionary distances and with different proteins.

Here we investigated the functional and evolutionary conservation of this small module of gene pair. We searched for homologous protein pairs of AvrLm10A/AvrLm10B in *L. maculans*, and identified four pairs of paralogues. We first studied the conservation of these pairs in different *L. maculans* populations and compared their expression dynamics during oilseed rape infection. Then, we tested the ability of some of the corresponding proteins to physically interact. Finally, we studied conservation of AvrLm10A/AvrLm10B over longer evolutionary distances and found that AvrLm10A is conserved in more than 30 Dothideomycetes and Sordariomycetes and one Eurotiomycete, while fewer AvrLm10B homologues were identified. Interestingly, multiple distant homologues of *AvrLm10A* are, like SIX5 and Avr2, paired with a neighboring gene that is not homologous to *AvrLm10B*, suggesting multiple cases of non-orthologous replacement of the *AvrLm10B* component of this infection module. These results point to a general role of the AvrLm10A/SIX5 proteins as cooperating proteins, able to physically interact with diverse families of effectors and to potentially share a conserved function during plant infection. These findings suggest potential functional interactions between these proteins in different species and highlights this gene pair as an interesting evolutionary model.

Results

Multiple gene pairs that are homologous to *AvrLm10A* / *AvrLm10B* are dispersed in the *L. maculans* ‘brassicae’ genome.

To determine whether homologues of the *AvrLm10A/AvrLm10B* gene pair occur in the genome of *L. maculans* ‘brassicae’ JN3 (v23.1.3), we used blastp to search for proteins with similar sequences.

Table 1. Characteristics of AvrLm10A and AvrLm10B homologous proteins identified in *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’.

Protein	Size (aa)	Cysteine number ^a	Identity with AvrLm10A	Signal peptide ^c	Protein	Size (aa)	Cysteine number ^a	Identity with AvrLm10B	Signal peptide ^b	Localisation in the genome ^c	Size of the intergenic region (bp)
AvrLm10A	120	7	-	yes	AvrLm10B	178	1	-	yes	AT-isochores (Sub-telomeric region; end of SC8)	7600
Lmb_jn3_08094	123	7	40%	yes	Lmb_jn3_08095	171	1	27%	yes	GC-isochores (SC09, island of 7 genes in AT-isochores)	699
Lmb_jn3_09745	120	7	36%	yes	Lmb_jn3_09746	166	2	25%	yes	AT-isochores (Sub-telomeric region (end SC11))	692
Lmb_jn3_04095	124	7	36%	yes	Lmb_jn3_04096	180	1	32%	yes	GC-isochores border (Sub-telomeric region; end of SC4)	1200
Lmb_jn3_02612	123	7	51%	yes	Lema_P017580.1	179	1	34%	yes	GC-isochores (SC02)	719

^a Cysteine number is calculated based on the mature protein, without signal peptide.

^b Prediction using SignalP 3.0 software (Bendtsen *et al.*, 2004).

^cSC: Supercontig. The localization of the different genes is based on the Dutreux *et al.* (2018) *L. maculans* genome assembly

We identified four homologues for AvrLm10A (Lmb_jn3_07875) in the proteome of *L. maculans* ‘brassicae’ JN3: Lmb_jn3_08094, Lmb_jn3_09745, Lmb_jn3_04095 and Lmb_jn3_02612. Amino acid (aa) sequences of these homologues ranged in size from 120 to 124 aa, are 36% to 51% identical to AvrLm10A and have a conserved number of cysteines (7 cysteines in the mature protein; Table 1). The highest sequence identity (54%) was found between Lmb_jn3_09745 and Lmb_jn3_04095 (Table 2).

Table 2. Percentage of identity (similarity) between members of the AvrLm10 family in *L. maculans* ‘brassicae’

	Lmb_jn3_08094	Lmb_jn3_09745	Lmb_jn3_04095	Lmb_jn3_02612
<i>AvrLm10A</i>	40% (56.0%)	36% (54%)	36% (50%)	51% (64%)
<i>Lmb_jn3_08094</i>		50% (62%)	54% (65%)	40% (55%)
<i>Lmb_jn3_09745</i>			54% (67%)	37% (50%)
<i>Lmb_jn3_04095</i>				38% (49%)

	Lmb_jn3_08095	Lmb_jn3_09746	Lmb_jn3_04096	LemaP017580.1
<i>AvrLm10B</i>	27% (38%)	25% (41%)	32% (39%)	34% (47%)
<i>Lmb_jn3_08095</i>		32% (45%)	35% (47%)	28% (50%)
<i>Lmb_jn3_09746</i>			34% (44%)	28% (43%)
<i>Lmb_jn3_04096</i>				24% (38%)

The identity (similarity) matrix was obtained by performing a reciprocal blastp using the BioEdit sequence alignment editor (matrix: BLOSUM62, E-value = 1)

The corresponding genes, like *AvrLm10A*, all have three introns, located at the same relative positions. For *AvrLm10B* (Lmb_jn3_07874) we also identified four homologs: Lmb_jn3_08095, Lmb_jn3_09746, Lmb_jn3_04096 and Lema_P017580.1. This latter gene was predicted in the first version of the *L. maculans* genome annotation, but is absent from the latest annotation due to lack of transcriptomic support (Rouxel *et al.*, 2011; Dutreux *et al.* 2018). These homologues range in size between 166 to 180 aa. They have diverged more in sequence than homologues of *AvrLm10A*: they share between 25 and 34% identity. Also in contrast to *AvrLm10A* homologues, these sequences contain only one cysteine, except for Lmb_jn3_09746 that contains two. The corresponding genes share one intron either located at the end of the coding sequence or in the 3'UTR. The highest level of identity between *AvrLm10B* homologues was found between *AvrLm10B* and Lema_P017580.1 (34 %, Table 2). For all proteins that belong to the *AvrLm10A* or *AvrLm10B* families, a secretion signal peptide was predicted, indicating that these proteins are secreted by the fungus.

Interestingly, like *AvrLm10A* and *AvrLm10B*, all these homologues were organized as neighboring gene pairs in diverging orientation: *Lmb_jn3_09745* is adjacent to *Lmb_jn3_09746*, *Lmb_jn3_08094* to *Lmb_jn3_08095*, *Lmb_jn3_02612* to *LemaP017580.1*, and *Lmb_jn3_04095* to *Lmb_jn3_04096*. While *AvrLm10A* and *AvrLm10B* are separated by a large (7213 bp) repeat-rich intergenic region, the other gene pairs were separated by smaller intergenic regions, ranging between 692 bp and 1.2 kb (Table 1). All gene pairs are located on different scaffolds, suggesting that if they had originated from tandem duplications, some were subsequently moved to different genomic locations. As mentioned previously *AvrLm10A* and *AvrLm10B* are located in an AT-rich subtelomere. This region is very repeat-rich and gene-poor: the nearest gene is 162443 bp downstream of *AvrLm10A*. Two out of four pairs, *Lmb_jn3_09745* / *Lmb_jn3_09746* and *Lmb_jn3_04095* / *Lmb_jn3_04096*, are also located in subtelomeric AT-isochores. *Lmb_jn3_09745/Lmb_jn3_09746* are in a similarly repeat-rich and gene-poor region as *AvrLm10A/AvrLm10B*: the nearest gene is 67412 bp downstream of *Lmb_jn3_09745*. *Lmb_jn3_04095/Lmb_jn3_04096* is located at the border of the AT-isochores adjacent to a gene-rich region and the nearest gene is 545 bp upstream of *Lmb_jn3_04095* (Table 1). The *Lmb_jn3_08094/Lmb_jn3_08095* gene-pair is located in a gene cluster on an AT-isochores that is not subtelomeric. The cluster consists of *Lmb_jn3_08094/Lmb_jn3_08095* and four other genes, the closest of which is located 1360 bp downstream of *Lmb_jn3_08095*. Finally, the *Lmb_jn3_02612* / *LemaP017580.1* gene pair is located in an GC-isochores, with the nearest gene at 110 bp downstream of *LemaP017580.1* (Table 1).

In summary, the four homologues of *AvrLm10A* and *AvrLm10B* share similar characteristics in their amino acid sequence (size, cysteine number, prediction of a signal peptide) and the corresponding genes share the same organization (genes pairs in diverging orientation, same number of introns). This ‘*AvrLm10* family’ is found in different genomic environments, of which the environments of *AvrLm10A/AvrLm10B* and *Lmb_jn3_09745/Lmb_jn3_09746* are most similar: gene-poor, repeat-rich AT-isochores in subtelomeric regions.

Table 3. Allelic variants identified within the *AvrLm10* family in natural isolates of *L. maculans* and influence of RIP on sequence variation

Allele	G+C content (%)	Nucleotide change	Localisation (Intron /Exon)	Amino acid change	Number of isolates (%)	CpA occurrence ^a (O/E)	TpG occurrence ^a (O/E)	TpA occurrence ^a (O/E)	TpA/A pT ^b	CpA+TpG /ApC+GpT ^b
<i>AvrLm10-A_0</i>	45.98	-	-	-	21/30 (53.49%)	-	-	-	0.91	1.33
<i>AvrLm10-A_1</i>	45.59	G ⁴¹ A C ³²⁷ A	Intron 1 Intron 3	no no	18/39 (46.51%)	1	0.97	0.97	0.94	1.34
<i>AvrLm10-B_0</i>	47.43	-	-	-	17/34 (50%)	-	-	-	0.8	1.23
<i>AvrLm10-B_1</i>	47.43	A ²⁷³ G G ²⁷⁶ A	Exon Exon	no M ⁹² I	17/34 (50%)	1	0.97	0.97	0.8	1.23
<i>Lmb_jn3_08094_0</i>	44.65	-	-	-	45/46 (97.83%)	-	-	-	1.10	1.27
<i>Lmb_jn3_08094_1</i>	44.55	C ⁶⁹ T	Intron 1	no	1/46 (2.17%)	1	1	0.98	1.05	1.29
<i>Lmb_jn3_08095_0</i>	44.65	-	-	-	47/47 (100%)	-	-	-	1.10	1.27
<i>Lmb_jn3_09745_0</i>	39.23	-	-	-	37/44 (84.09%)	-	-	-	1.24	1.24
<i>Lmb_jn3_09745_1</i>	39.42	T ²⁰² C	Exon 2	no	2/44 (4.54%)	1	0.97	1	1.24	1.23
<i>Lmb_jn3_09745_2</i>	39.05	T ⁵⁵ A G ¹⁵⁹ T C ⁷³ T C ⁸² T G ¹¹⁵ A	Intron 1 Exon 2 Intron 1 Intron 1 Intron 1	no R ²⁷ M no no no	1/44 (2.27%)	1	1.03	0.98	1.22	1.26
<i>Lmb_jn3_09745_3</i>	37.59	C ²⁹¹ T C ²⁹⁸ T G ³¹³ A C ⁴⁵⁴ T C ⁵⁴⁹ T	Exon 3 Exon 3 Exon 3 Exon 4 Exon 4	Q ²¹ Stop Q ⁵³ L S ⁵⁴ Stop W ⁵⁹ Stop S ⁸⁹ L S ¹²⁰ L	1/44 (2.27%)	0.85	0.97	1.12	1.37	1.15
<i>Lmb_jn3_09745_4</i>	39.23	C ³⁴⁶ G	Exon 3	no	3/44 (6.81%)	0.97	1	1	1.24	1.23

<i>Lmb_jn3_09746_0</i>	46.51	-	-	-	29/45 (64.44%)	-	-	-	0.67	1.39
<i>Lmb_jn3_09746_1</i>	46.51	T ⁴⁷⁸ A	Exon	S ¹⁶⁰ T	6/45 (13.3%)	1	1	1.03	0.7	1.37
<i>Lmb_jn3_09746_2</i>	46.51	G ³²⁸ A T ⁴⁷⁸ G	Exon Exon	G ¹¹⁰ S S ¹⁶⁰ A	1/45 (2.22%)	1	0.96	1	0.67	1.42
		G ⁸⁶ A	Exon	R ²⁹ Q						
		G ¹⁵⁷ A	Exon	no						
		G ¹⁶⁸ A	Exon	M ⁵⁶ I						
		G ²³² A	Exon	G ⁷⁸ R						
<i>Lmb_jn3_09746_3</i>	44.51	G ²⁷⁴ A G ²⁸⁰ A	Exon Exon	E ⁹² K no	1/45 (2.22%)	1.05	0.69	1.28	0.84	1.3
		G ³¹⁸ A	Exon	M ¹⁰⁶ I						
		G ³⁷⁹ A	Exon	E ¹²⁷ K						
		G ⁴⁵¹ A	Exon	no						
		G ⁴⁸⁸ A	Exon	W ¹⁶³ Stop						
<i>Lmb_jn3_09746_4</i>	46.51	T ⁴⁷⁸ G G ⁴⁸⁴ T	Exon Exon	S ¹⁶⁰ A A ¹⁶² S	7/45 (15.55%)	1	1.04	1	0.67	1.39
<i>Lmb_jn3_09746_5</i>	46.71	G ³⁴⁷ C T ⁴⁷⁸ G	Exon Exon	no S ¹⁶⁰ A	1/45 (2.22%)	1.02	1.04	1	0.67	1.44
<i>Lmb_jn3_04095_0</i>	45.64	-	-	-	35/35 (100%)	-	-	-	1.46	1.21
<i>Lmb_jn3_04096_0</i>	43.62	-	-	-	39/40 (97.5)	-	-	-	1	1.14
<i>Lmb_jn3_04096_1</i>	43.79	A ⁵³³ C	Exon	D ¹⁷⁸ A	1/40 (2.5%)	1	31	1	1.02	1.14
<i>Lmb_jn3_02612_0</i>	48	-	-	-	44/44 (100%)	-	-	-	0.88	1.37
<i>Lema_P017580.1_0</i>	49,9	-	-	-	44/44 (100%)	-	-	-	0.62	1.40

^a Dinucleotide frequencies : expressed as the observed occurrence over the expected number (O/E)

^b TpA/ApT > 2.0 or CpA+TpG /ApC+GpT < 0.7 corresponds to regions predicted as repeat-induced point-mutated in *Neurospora crassa*, according to Galagan *et al.* (2003)

Country	Isolate	Gene ID and their genomic localization									
		Repeat-rich region		Gene cluster in a repeat-rich region		Repeat-rich region		GC-isochores border		Repeat-rich region	
		AvrLm10A	AvrLm10B	Lmb_jn3_08094	Lmb_jn3_08095	Lmb_jn3_09745	Lmb_jn3_09746	Lmb_jn3_04095	Lmb_jn3_04096	Lmb_jn3_02612	Lema_P017580.1
USA	AD2										
	AD4										
	AD46										
	AD66										
	AD79										
	AD87										
	AD134										
AD109											
AD126											
AD105											
Chile	AD184	100%	100%	90%	90%	90%	90%	90%	90%	100%	100%
	AD190										
	AD217										
	AD219										
	AD258										
Canada	AD323										
	AD336										
	AD372										
	AD379										
	AD420										
	AD1294										
	AD1366										
	AD752										
	AD466										
	AD717										
	AD917										
	AD879										
	AD887										
	AD1120										
	AD951										
	AD478										
	AD539										
AD1018											
AD847											
AD1198											
AD671											
AD462											
Australia	WT3										
	WT30										
	WT50										
	WT1										
	WT78										
	WT92										
	WT12										
	WT 47										
	WT57										
	WT91										
	WT15										
	WT51										
	WT64										
	WT31										
	WT 86										
WT101											
WT33											
WT5											
WT32											
WT08											
IBCNI4											
IBCNI18											
Mexico	OMR186										
	OMR192										
	OMR199										
	OMR203										
	OMR211										
	OMR213										
	OMR222										
	OMR238										
	OMR 243										
	OMR249										
	OMR45										
	OMR48										
	OMR51										
	OMR56										
	OMR61										
	OMR75										
	OMR79										
	OMR87										
	OMR92										
	OMR98										
OMR167											
OMR166											
OMR180											
OMR131											
OMR134											
OMR139											
OMR142											
OMR105											
OMR110											
OMR111											
OMR113											
OMR119											
OMR124											
France	INV.13.94										
	INV.13.95										
	INV.13.96										
	INV.13.97										
	INV.13.98										
	INV.13.99										
	INV.13.100										
	INV.13.101										
	INV.13.102										
	G13.501										
	G13.515										
	G13.100										
	G13.222										
	INV.13.565										
	INV.13.566										
	INV.13.567										
	INV.13.569										
	INV.13.570										
	INV.13.571										
	INV.13.572										
	INV.13.573										
	INV.13.661										
	INV.13.662										
	INV.13.663										
	INV.13.664										
	INV.13.665										
	INV.13.666										
	INV.13.667										
	INV.13.668										
	INV.13.669										
	INV.13.469										
	INV.13.470										
	INV.13.471										
	INV.13.472										
	INV.13.473										
	INV.13.474										
	INV.13.475										
	INV.13.734										
	INV.13.736										
	INV.13.737										
INV.13.738											
INV.13.739											
INV.13.740											
INV.13.741											
INV.13.476											
INV.13.477											
INV.13.387											
INV.13.389											
INV.13.390											
INV.13.391											
INV.13.392											
INV.13.393											
INV.13.394											
INV.13.395											
INV.13.290											
INV.13.305											
INV.13.307											
INV.13.334											
Total world		98%	99%	97%	97%	65%	66%	95%	99%	92%	96%

Figure 1. Presence of the AvrLm10 family in natural populations of *L. maculans* 'brassicae'
Presence of the genes was evaluated by PCR using 5' and 3'UTR specific primers (see Table S1)
Absence of a gene amplification is represented by a white box.
Repeat-rich regions: AT-rich regions which are enriched in repeated elements and poor in genes

Gene-rich regions: GC- equilibrated, gene-rich regions

Close to gene-rich regions: Genes located in AT-rich regions but at a border of a GC-isochores

Most members of the *AvrLm10* family are highly conserved in *L. maculans* field populations

To compare the conservation of *AvrLm10A*, *AvrLm10B* and their homologues in different *L. maculans* populations, we determined their presence and absence by polymerase chain reaction (PCR), on a worldwide collection of 150 *L. maculans* isolates (Table S1). We included isolates from most of the rapeseed-producing regions where *L. maculans* is present: 58 from France, 22 from Australia, 22 from Canada, 10 from USA, 5 from Chile and 33 from Mexico (Dilmaghani *et al.*, 2009; Dilmaghani *et al.*, 2013; Stachowiak *et al.*, 2006; Table S2). Except for Mexican isolates that were collected from *B. oleracea*, all isolates were collected from *B. napus*. In general, presence/absence polymorphisms are identical for the two genes forming a pair (Figure 1; Table S3). Four pairs, *AvrLm10A/AvrLm10B*, *Lmb_jn3_08094/Lmb_jn3_08095*, *Lmb_jn3_04095/Lmb_jn3_04096* and *Lmb_jn3_02612/Lema_P017580.1* were present in the vast majority of isolates (between 92% and 99%). In contrast, the *Lmb_jn3_09745/Lmb_jn3_09746* pair was absent in most isolates from Mexico (absent in 94% of isolates) and Australia (absent in 59% of isolates).

We also analyzed sequence polymorphism in a subset of isolates (between 34 and 44) for polymorphisms in the DNA sequences (Tables 3 and S3). Sequence polymorphisms were rare for most pairs: *Lmb_jn3_08094/Lmb_jn3_08095*, and *Lmb_jn3_02612/Lema_P017580.1* displayed no sequence variation except for one mutation detected in an intron of *Lmb_jn3_08094* in a single isolate. *Lmb_jn3_04095/Lmb_jn3_04096* showed a single non-synonymous point mutation in *Lmb_jn3_04096* for an Australian isolate, leading to a D¹⁷⁸N change (Table 3). *AvrLm10A* and *AvrLm10B* displayed 2 SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), in respectively 46.51% and 50%, of the analyzed isolates. While for *AvrLm10A* both SNPs were located in introns, in *AvrLm10B* the two SNPs were located in exons, one of which was synonymous, while the other led to a M⁹²I change (Table 3). In contrast to these four gene pairs, *Lmb_jn3_09745/Lmb_jn3_09746* displayed high sequence variation with four alleles including thirteen polymorphic sites and five alleles including 17 polymorphic sites, respectively. These polymorphisms were detected in only 15.55 % of the isolates due to numerous presence/absence polymorphisms (Table 3). Importantly, most SNPs were located in exons and resulted in amino acid changes. In an Australian isolate (WT75), both genes displayed many G to A and C to T mutations suggesting that RIP contributed to mutation accumulation in this isolate. We calculated RIP indexes as defined by Galagan *et al.*

(2003) and indeed observed an increase of the TpA/ApT index for the alleles of *Lmb_jn3_09745* and *Lmb_jn3_09746* present in WT75 albeit below the threshold commonly used to identify RIP (Table 3). We did not observe such an increase in the other gene pairs nor in other isolates. In WT75, the mutations resulted in the generation of a premature Stop at position 21 in *Lmb_jn3_09745* and in seven amino acid changes scattered along the protein in *Lmb_jn3_09746*, suggesting that even though this gene pair is present in this isolate, it may not be functional.

In conclusion, members of the *AvrLm10* family are highly conserved in *L. maculans* field populations, with the exception of *Lmb_jn3_09745/Lmb_jn3_09746* that are frequently absent together and show sequence polymorphism.

Gene pairs within the *AvrLm10* family are co-expressed during oilseed rape infection by *L. maculans* in two distinct expression clusters

To determine to what extent the two components of a pair function together, and to assess to whether they may have a similar function to AvrLm10A and AvrLm10B, we studied their expression profiles using RNA-seq data previously generated by Gay *et al.* (2021). These data included cotyledon, petiole and stem colonization by *L. maculans* under controlled conditions (Figure 2A). No expression of *Lmb_jn3_02612* and *Lema_P017580.1* could be detected in any of the conditions tested (data not shown). To check whether these two genes could be expressed at other stages of the *L. maculans* infection cycle, RNA-seq data corresponding to plant field conditions were analyzed but also here no expression could be detected for these genes. In contrast, expression was detected for all the other gene pairs and components of the AvrLm10 pairs were clearly co-expressed (Figure 2A). All the genes were overexpressed during infection at biotrophic stages of colonization on cotyledons, and / or petioles and stem compared to axenic growth on V8 medium.

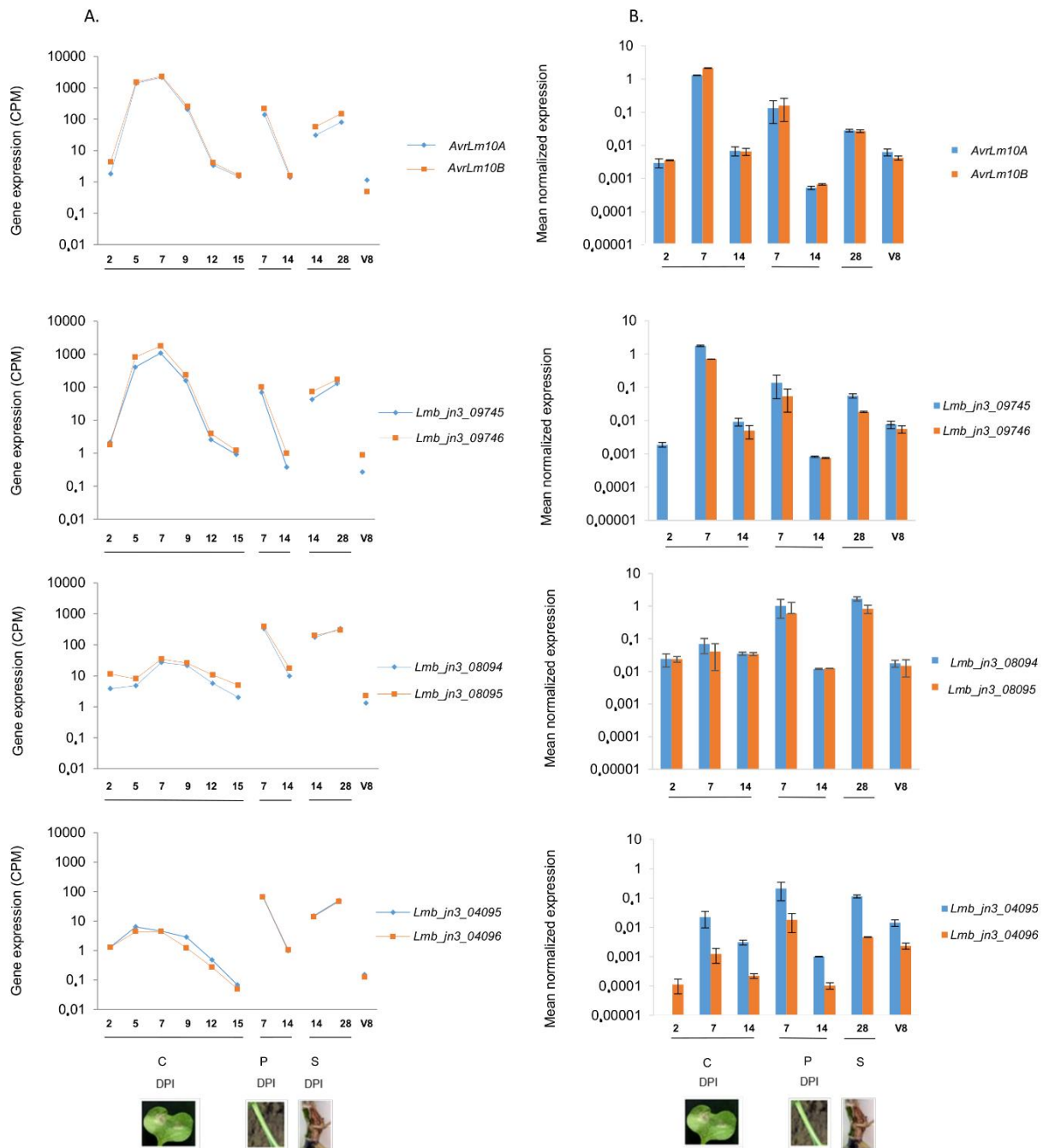


Figure 2. Expression of the *AvrLm10* family during oilseed rape infection by *L. maculans* ‘brassicae’ and during axenic growth.

A. Expression pattern of the *AvrLm10* gene family using RNAseq data generated by Gay *et al.* (2021) and normalized by the total number of sequences per condition (count per million, CPM). RNA extractions were performed on cotyledons, petioles and stems of oilseed rape (Darmor-bzh) inoculated under controlled conditions with pycnidiospores of the reference isolate v23.1.2. Samples were recovered at different dates post inoculation (2, 5, 7, 9, 12 and 15 DPI on cotyledons (C), 7 and 14 DPI on petioles (P), 14 and 28 DPI on stems (S)). Each data point is the average of two independent biological replicates.

B. Expression pattern of the *AvrLm10* gene family analyzed in the isolate v23.1.2 by quantitative RT-PCR. RNA extractions were performed on oilseed rape Darmor-bzh cotyledons (2, 7 and 14 DPI), petioles (7 and 14 DPI) and stem (28 DPI) inoculated by v23.1.2. Gene expression levels are relative to *EF1alpha*, a constitutive gene, according to Muller *et al.* (2002). Each data point is the average of two biological replicates and two technical replicates. Standard error of the mean normalized expression level is indicated by error bars.

However, two patterns could be distinguished: *Lmb_jn3_09745/Lmb_jn3_09746* and *AvrLm10A/AvrLm10B* both showed a typical expression profile of the ‘biotrophy’ wave (Wave2) with overexpression at all the stages of biotrophic colonization, while *Lmb_jn3_08094/Lmb_jn3_08095* and *Lmb_jn3_04095/Lmb_jn3_04096* where only overexpressed during biotrophic colonization of petioles and stems.

The expression of the *AvrLm10* family was then validated by qRT-PCR (Figure 2B). This confirmed co-expression of the gene pairs *AvrLm10A/AvrLm10B*, *Lmb_jn3_08094/Lmb_jn3_08095*, and *Lmb_jn3_09745/Lmb_jn3_09746*, consistent with the expression patterns observed using RNAseq data. In the case of *Lmb_jn3_04095* and *Lmb_jn3_04096*, the qRT-PCR experiments suggested that *Lmb_jn3_04096* was expressed ten times less than *Lmb_jn3_04095*. In summary, four gene pairs are co-expressed during oilseed rape infection by *L. maculans* in two distinct expression clusters: two gene pairs during all the biotrophic stages of infection, and two others only during biotrophic colonization of petioles and stems. One gene pair, *Lmb_jn3_02612* and *Lema_P017580.1*, is not expressed in the conditions analyzed.

***Lmb_jn3_09745*, *Lmb_jn3_09746*, *Lmb_jn3_08094* and *Lema_jn3_08095* co-localize in the nucleus and cytoplasm of *N. benthamiana* cells when transiently expressed**

It was previously shown that both *AvrLm10A* and *AvrLm10B* exhibited nucleo-cytoplasmic localization when transiently expressed in leaves of *N. benthamiana* (Petit-Houdenot *et al.*, 2019). We tested whether the same holds true for the pairs that were shown to be co-expressed. *Lmb_jn3_09745/Lmb_jn3_08094* and *Lmb_jn3_09746/Lmb_jn3_08095* fused to GFP and RFP, respectively, at the C- or N -terminal position were transiently expressed in leaf epidermal cells of *N. benthaminana* without their secretion signal peptide. The proteins were either expressed alone or co-expressed in pairs through co-infiltration of *A. tumefaciens*. For the four proteins, a fluorescent signal was detected in both the cytoplasm and the nucleus of *N. benthamiana* cells (Figure 3A), indicating that these proteins diffuse freely between the nucleus and the cytoplasm in accordance with their low molecular weight. When *Lmb_jn3_08094/Lmb_jn3_08095* and *Lmb_jn3_09745/Lmb_jn3_09746* proteins were co-expressed in *N. benthamiana*, they co-localized in the cytoplasm and nucleus (Figure 3A). Immunoblot analysis with anti-GFP and anti-RFP antibodies confirmed the presence of the intact recombinant proteins (Figure 3B and Figure S1).

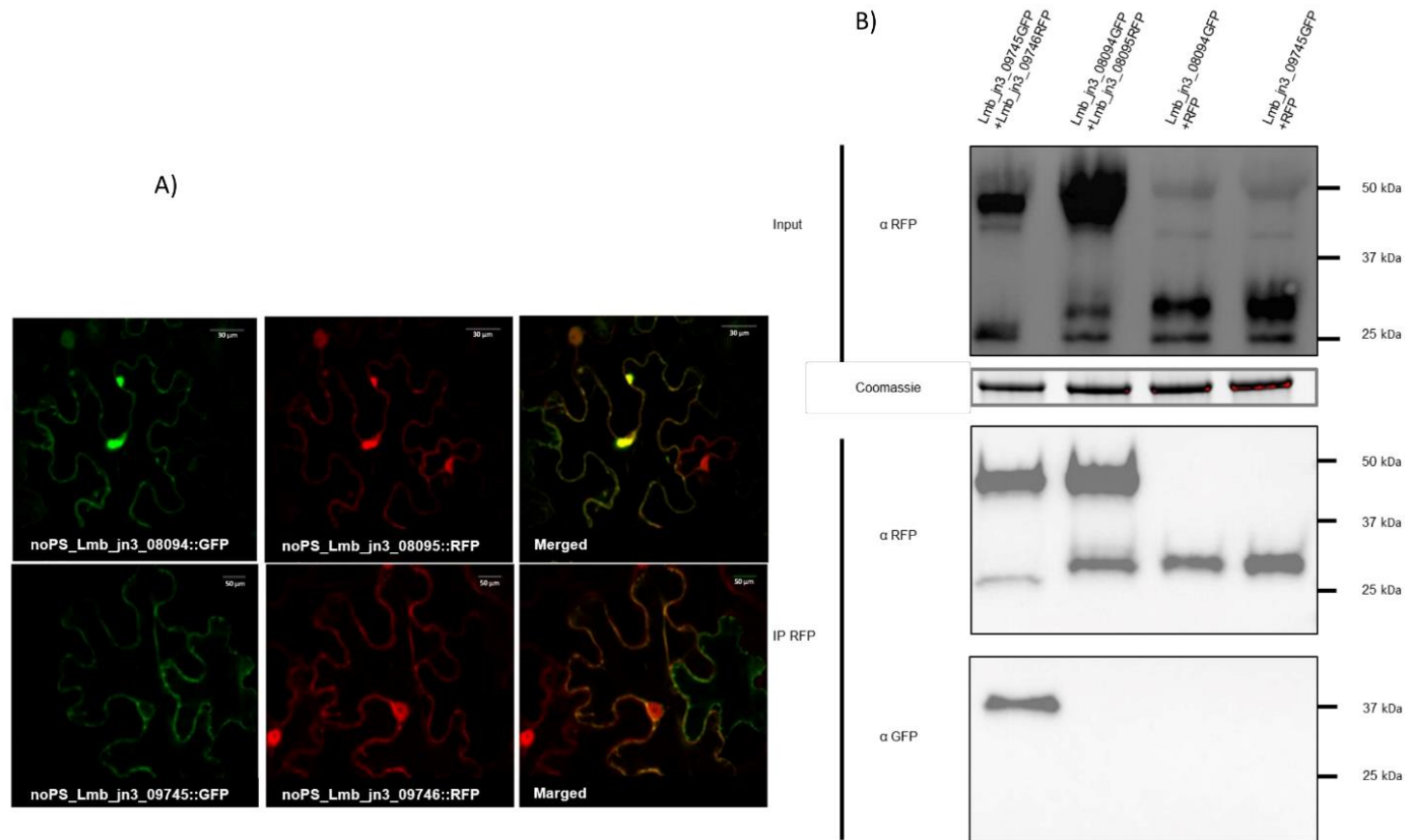


Figure 3. Lmb_jn3_09745, Lmb_jn3_09746, Lmb_jn3_08094 and Lema008095 co-localize in *N. benthamiana* cells, but only Lmb_jn3_09745 and Lmb_jn3_09746 physically interact.

A. Single-plane confocal images of *N. benthamiana* epidermal leaf cells expressing Lmb_jn3_09745-GFP, Lmb_jn3_09746-RFP, Lmb_jn3_08094-GFP, and Lmb_jn3_08095-RFP at 48h post infiltration of *A. tumefaciens*. The four proteins were detected in both the cytoplasm and the nucleus of *N. benthamiana* epidermal cells.

B. Proteins were extracted 48h after infiltration and analyzed by immunoblotting with anti-RFP (α -RFP) antibodies (Input). Immunoprecipitation was performed with anti-RFP beads (IP RFP) and analyzed by immunoblotting with anti-RFP antibodies to detect Lmb_jn3_09746-RFP, Lmb_jn3_08095-RFP and RFP, and with anti-GFP (α -GFP) antibodies for the detection of co-immunoprecipitated proteins.

Lmb_jn3_09745 physically interacts with Lmb_jn3_09746 in planta

Having established that Lmb_jn3_08094/Lmb_jn3_08095 and Lmb_jn3_09745/Lmb_jn3_09746, like AvrLm10A/AvrLm10B colocalize in the nucleus and cytoplasm of *N. benthamiana* cells, we examined whether these pairs physically interact *in planta*. To assess this, an *in planta* fluorescence resonance energy transfer–fluorescence lifetime imaging microscopy (FRET-FLIM) analysis was performed. Lmb_jn3_09745 / Lmb_jn3_08094 and Lmb_jn3_09746 / Lmb_jn3_08095, fused to GFP and RFP, respectively, were expressed in leaf epidermal cells of *N. benthamiana*. FRET-FLIM experiments were performed on the cytoplasm of co-transformed cells. LmStee98 fused to RFP that was previously also detected in both the cytoplasm and the nucleus of *N. benthamiana* cells (Jiquel, 2021), was used as a negative control. The lifetime of GFP fluorescence was highly reduced in cells co-expressing Lmb_jn3_09745-GFP and Lmb_jn3_09746-RFP compared with cells expressing Lmb_jn3_09745-GFP alone or co-expressing Lmb_jn3_09745-GFP and LmStee98-RFP (Table 4). This is indicative of interaction between Lmb_jn3_09745 and Lmb_jn3_09746 *in planta*. In contrast, co-expression of Lmb_jn3_08094-GFP and Lmb_jn3_08095-RFP (or RFP-Lmb_jn3_08095) did not result in significant reduction of the GFP fluorescence lifetime despite the same subcellular co-localization of both proteins (Table 4).

Table 4. FRET-FLIM analysis showing a strong physical interaction between Lmb_jn3_09745 and Lmb_jn3_09746

Donor	Acceptor	τ ^(a)	SEM ^(b)	Δt ^(c)	n ^(d)	E ^(e)	P-value ^(f)
Lmb_jn3_08094-GFP	-	2.96	0.009	-	88	-	-
Lmb_jn3_08094-GFP	RFP-Lmb_jn3_08095	2.87	0.012	0.09	78	3.145	1.52 x 10 ⁻⁰⁹
Lmb_jn3_08094-GFP	Lmb_jn3_08095-RFP	2.90	0.012	0.07	72	2.253	7.93 x 10 ⁻⁰⁶
Lmb_jn3_09745-GFP	-	2.79	0.011	-	100	-	-
Lmb_jn3_09745-GFP	Lmb_jn3_09746-RFP	1.89	0.029	0.90	90	32.126	4.37x 10 ⁻⁷³
Lmb_jn3_09745-GFP	LmStee98-RFP	2.77	0.016	0.02	66	0.721	0.282

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

^bStandard error of the mean

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

^dTotal number of measured cells

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

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

Co-immunoprecipitation (coIP) experiments were also performed to confirm physical interactions between Lmb_jn3_09745 and Lmb_jn3_09746, and between Lmb_jn3_08094 and Lmb_jn3_08095 *in planta*. Immunoblotting using anti-RFP antibody indicated that all constructs were highly expressed (Figure 3B). Immunoprecipitation of proteins using anti-RFP beads revealed, after immunoblot with anti GFP antibodies, that Lmb_jn3_09745 was co-precipitated with Lmb_jn3_09746, but not with RFP. In contrast, Lmb_jn3_08094 did not co-precipitate with either Lmb_jn3_08095 or RFP (Figure 3B).

Taken together, these results suggest that Lmb_jn3_09745 and Lmb_jn3_09746 physically interact *in planta*, while Lmb_jn3_08094 and Lmb_jn3_08095 do not.

The AvrLm10A/Six5 family is conserved in several phytopathogenic fungi and can be divided into three clades with specific cysteine patterns

, we wondered whether this module is also conserved in other species. Previous analyses have shown that AvrLm10A is homologous to SIX5, an effector protein in *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Therefore we used not only AvrLm10A and its four homologues in *L. maculans* 'brassicae', but also SIX5 as a query in blastp searches against NCBI's nr database. We identified a total of 65 additional homologues, most of which in *Colletotrichum* or *Fusarium* species, bringing the total size of the AvrLm10A/SIX5 family members to 71. We exclusively found homologues in Dothideomycete, Sordariomycete and Leotiomycete phytopathogenic fungi (Table S4), with one exception: *Penicillium polonicum*, a Eurotiomycete that is not phytopathogenic but known to spoil stored plant products. The sequences of these homologues were between 93 to 141 aa long, were enriched in cysteines (4 to 9 cysteines) and included a putative secretion signal peptide. Some species carry several members of the AvrLm10A/SIX5 family with a maximum of three homologues within a genome (Figure S2).

We generated a multiple sequence alignment for the 71 members of the AvrLm10A/Six5 family. Although the protein sequences have diverged a lot, we could identify a few residues that were conserved in all members. These include 'CACQ', a cysteine at alignment position 157 and 'DSTCF' near the C-terminus.

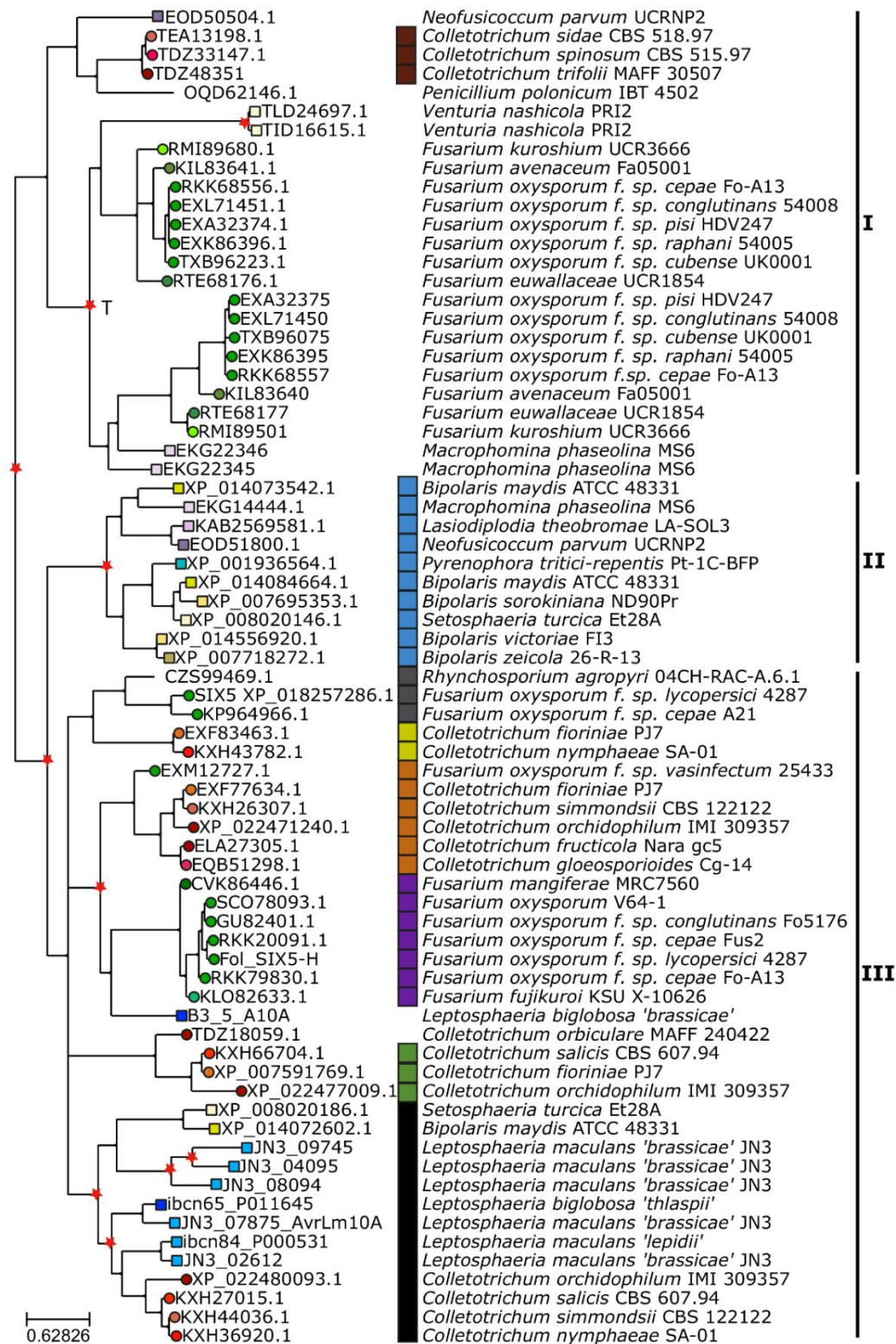


Figure 4. Eight different families of neighboring genes cluster in the phylogenetic tree of AvrLm10A / SIX5 homologues

Maximum likelihood phylogeny of AvrLm10A/SIX5 homologues listed in Table S4. The shape of terminal nodes indicates whether the protein is from a Sordariomycete (circle) or Dothideomycete (square) or other (no shape), nodes are colored according to species and labeled with the protein identifier. Putative duplications are indicated with red stars. One tandem duplication is indicated with a 'T': all *Fusarium* genes under that node are either adjacent to each other or at the end of separate contigs. The different families of neighboring genes are indicated with colored squares at the right side of the tree, together with species and strain names. The tree is divided into three main clades according to similarities in position of cysteines (Figure 5).

We then used this alignment to infer a phylogenetic tree (Figure 4). Based on the alignment and the tree, we distinguished three clades, each with a distinct pattern of cysteines. The first clade consists of 25 proteins, mostly from Sordariomycetes (*Fusarium* and *Colletotrichum* species), but also Dothideomycetes and the Eurotiomycete *Penicillium polonicum*. Proteins in this clade are characterized by relatively short protein sequences (97.12 aa on average), that typically have two cysteines at alignment position 85 and 96, one at alignment position 131, and two at alignment positions 156 and 157 (Figure 5A). A major part of this clade consists of tandemly duplicated genes in *F. oxysporum* (T, in Figure 4)

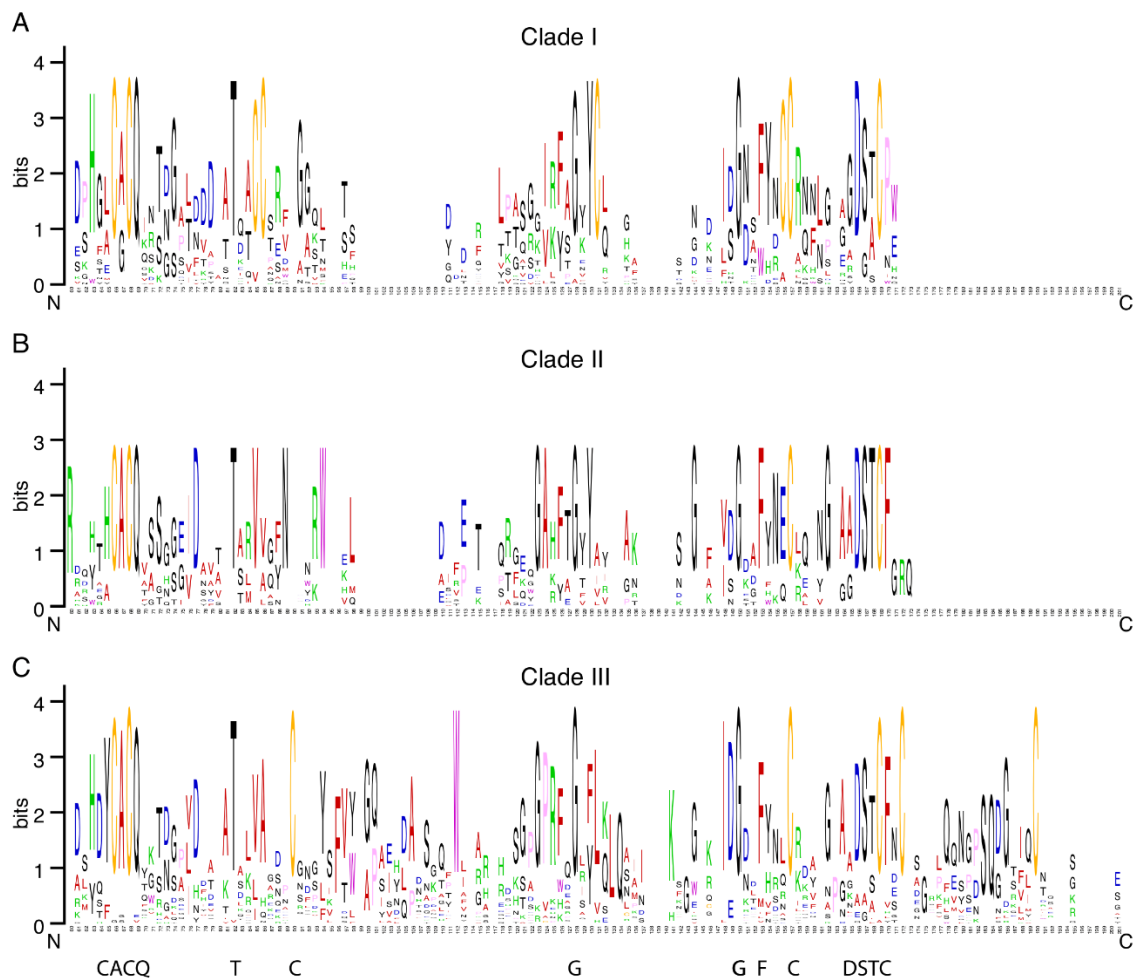


Figure 5. Sequence logos of three different subfamilies of AvrLm10A/SIX5 homologues.

A. Sequence logo of amino acid sequences of the 25 proteins that belong to Clade I shows two cysteines at alignment positions 85 and 96, one at alignment position 131, and one at alignment positions 156, all of which being unique for this group. B. Sequence logo of amino acid sequences of the ten proteins that belong to Clade II shows that this group has no clade-specific conserved cysteines, but does have e.g. a conserved tryptophan at position 94 in the multiple sequence alignment. C. Sequence logo of amino acid sequences of the 36 proteins that belong to Clade III shows that protein sequences in this clade are longer than those in the other two clades, and highlights the clade-specific conserved cysteine near the C-terminus of the protein. All sequence logos are based on position 60 to 201 in the multiple sequence alignment of AvrLm10A/SIX5 homologues and thus exclude the signal peptide. Conserved motifs in all clades are indicated at the bottom.

The second clade consists of 10 proteins, all from Dothideomycetes, that are also relatively short compared to AvrLm10A and SIX5: 119 aa on average. These proteins have no clade-specific conserved cysteines, but do have 11-28 aa extra between the signal peptide and the conserved ‘CACQ’ motif (Figure 5B). Finally, the third clade consists of 36 proteins including the sequences of AvrLm10A, all its homologues in *Leptosphaeria* species, and SIX5. The clade contains proteins from Sordariomycetes, Dothideomycetes and the Leotiomycete *Rhynchosporium agropyri*. Proteins in this group are on average 124,91 aa long and are characterized by cysteines on alignment positions 90, 157 and 190 and a tryptophan on alignment position 112 (Figure 5C).

We conservatively annotated the gene tree and designated all internal nodes for which we find the same strain in both descending branches, as duplications (red stars in Figure 4). We found a few recent expansions, e.g within the second clade in Dothideomycetes, and species-specific duplications in *Venturia nashicola* and *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’. Most duplications however, seem to have occurred before the split of Dothideomycetes and Sordariomycetes or even before. These expansions have been succeeded by losses of one or both copies in most lineages, resulting in a ‘patchy’ presence absence pattern of subfamilies in different species.

Eight different families of putative effector genes are associated with AvrLm10A/Six5 subclades.

Next, we wondered to what extent AvrLm10B is also conserved in other species. We used blastp with AvrLm10B and its four *L. maculans* ‘brassicae’ homologues as queries. We identified eleven proteins in plant pathogenic fungal species belonging to the Dothideomycetes and Sordariomycetes (only in *Colletotrichum* sp.; Table S5). Interestingly, all homologues of AvrLm10B were encoded by genes adjacent to a gene encoding a homologue of AvrLm10A, in the opposite orientation as for the *AvrLm10A/AvrLm10B* gene pair. Moreover, all the AvrLm10A-homologues associated with an AvrLm10B homologue belong to the same subclade of clade III (Figure 4, black squares) and all members of this clade are thus associated with an AvrLm10B homologue.

The fact that the AvrLm10A/SIX5 family is present in a lot more species than the AvrLm10B family suggests that members of the AvrLm10A/SIX5 may function on their own or together with another protein that is not homologous to AvrLm10B, as already found for the effector pair SIX5/Avr2 (Ma *et al.*, 2015; Cao *et al.*, 2018). To identify putative non-

orthologous replacements of AvrLm10B in the species for which we found a member of the AvrLm10A/SIX5 family, we mined for neighboring genes of AvrLm10A/SIX5 homologues in diverging transcriptional orientation. We determined whether they encoded a small protein that has a predicted secretion signal peptide. Using that strategy, 36 neighboring genes were found, separated by 633 to 7600 bp from AvrLm10A/SIX5 homologues and encoding small proteins with a putative secretion signal peptide. These proteins were variable in size, ranging from 111 to 295 aa, and cysteine number (between 0 and 12).

These neighboring genes cluster into eight families, each of which is associated with a specific subfamily of AvrLm10A (Figure 4). Most of these genes were found adjacent to homologues of AvrLm10A/SIX5 that belong to the second and third clade in the AvrLm10A/SIX5 phylogeny and encode hypothetical proteins, with the exception of TEA13204, TDZ48352 and TDZ32965 that are predicted to encode acetyltransferases (that annotation being questionable, as discussed in Petit-Houdenot *et al.*, 2019). The conservation of local genome organization suggests functional interactions between AvrLm10A/SIX5 homologs and their neighboring genes, even if these neighbors belong to different families.

Discussion

In this study, we characterized a family of fungal effectors that are conserved in several fungal species, of which at least some have the peculiar capacity to form heterodimers with the protein encoded by neighboring gene in opposite orientation. This work raises several questions: (i) What are the evolutionary/functional constraints that maintain this family of effectors and their organization as genes in opposite orientation? (ii) Are all the AvrLm10/SIX5 effector proteins functioning in pairs with other effectors? (iii) Can we postulate functional redundancy or relays between different effectors during the colonization of the plants? (iv) Is the conservation of homologues of AvrLm10A/SIX5 indicative of a conserved function and/or plant target?

While fungal effectors have long been suggested to be species- or even isolate-specific, the availability of an increasing number of fungal genomic sequences, the prediction of fungal effector repertoires within these genomes and resolution of their 3D structure, has allowed the identification of homologous proteins and structural analogues among fungal effectors (Wirthmueller *et al.*, 2013; de Guillen *et al.*, 2015; Petit-Houdenot *et al.*, 2019; Lazar *et al.*, 2020). Protein sequence homologies, while at a low level (typically less than 50% identity) have been detected for different effectors in plant-pathogenic fungi, thus illustrating possible

conserved functions between species. This is for instance the case for the Avr4 effector which protects fungal hyphae against the hydrolytic activity of plant chitinases, and the LysM effector Ecp6 which prevents chitin-triggered plant immunity. These effectors were first described in *Fulvia fulva* but are conserved in many Ascomycetes (van den Burg *et al.*, 2006; de Jonge *et al.*, 2010; Rocafort *et al.*, 2020). NIS1 (necrosis-inducing secreted protein 1), which was first identified in the cucumber anthracnose fungus *Colletotrichum orbiculare* (CoNIS1), has been found in a broad range of fungi belonging to both Ascomycota and Basidiomycota, including numerous pathogenic fungi (Irieda, *et al.*, 2019). Cce1 (Cysteine-rich core effector 1) which is essential for virulence of *Ustilago maydis* is highly conserved among smut fungi (Seitner *et al.*, 2018). Structural prediction methods also allowed the identification of effector families or enriched the number of their members. This was the case for the RALPH effectors (for RNase-Like Proteins Associated with Haustoria; Pedersen *et al.*, 2012) identified in the downy mildew *Blumeria graminis*. Resolution of 3D structures allowed the identification of structural families of effectors where no sequence identity could be evidenced, for the oomycete effectors ATR1, PexRD2, AVR3a4, and AVR3a11 and the basidiomycete effector AvrM (Boutemy *et al.*, 2011; Ve *et al.*, 2013), and the MAX effectors (for *Magnaporthe* Avrs and ToxB like) identified in *Magnaporthe oryzae* and also present in other ascomycetes (de Guillen *et al.*, 2015). Recently, a family of structural analogues named LARS (for Leptosphaeria AviRulence and Suppressing) has been identified in *L. maculans* and found to be conserved in other Dothideomycetes and also Sordariomycetes species (Lazar *et al.*, 2020). In this study, we characterized the AvrLm10 effector family of *L. maculans* that contains five pairs of homologues, including the AvrLm10A/AvrLm10B AVR proteins both necessary to trigger recognition by Rlm10 (Petit-Houdenot *et al.*, 2019). We found that AvrLm10A homologues are widely conserved in Dothideomycete and Sordariomycete species and are associated to effectors belonging to a limited number of putative families. The conservation of AvrLm10A between unrelated plant pathogenic fungi suggests AvrLm10A and its homologues could play similar function in distinct fungal species.

The 71 AvrLm10A homologues were found following Blast analyses with AvrLm10A and each of its paralogues, as well as with SIX5, while only ten homologues had been previously identified using AvrLm10A alone (Petit-Houdenot *et al.*, 2019), illustrating how limited sequence conservation could restrict homologue identification when using only one protein to mine the databases. The homologues were found in 33 species of Dothideomycetes and Sordariomycetes, plus one Eurotiomycete. Current phylogenomic analyses indicate shared

ancestry between Sordariomycetes and Leotiomycetes and possible shared ancestry between Dothideomycetes, Eurotiomycetes and Lecanoromycetes, but with less support and shorter internodes (Li *et al.*, 2021). That would mean neither Leotiomycetes nor Sordariomycetes are any closer to Dothideomycetes, and could mean the AvrLm10A/SIX5 homologues arose in an ancient shared Sordariomycetes/ Dothideomycetes ancestor (the node informally referred to as the superclass Leotiomyceta by Li *et al.*, 2021), with multiple subsequent losses in several classes. From this perspective, the conservation of AvrLm10A/SIX5 in so many distinct species could be due to a function linked to their lifestyle. With only one exception, all fungal species having maintained AvrLm10A/SIX5 homologues are phytopathogenic fungi classified as hemibiotrophs (*P. tritici-repentis* shares essentially the same mode of life while being classified as a necrotroph or a hemi-necrotroph), i.e., fungi having a relatively long biotrophic/asymptomatic life within plant tissues before inducing symptoms. These pathogens, along with pure biotrophs, are believed to mainly use effectors to compromise plant defense responses during their asymptomatic life (Figueroa *et al.*, 2021). The AvrLm10A/SIX5 family could, therefore, have an important role in the hemibiotrophic fungal lifestyle, possibly by favoring the biotrophic stage of infection before necrosis development. Indeed, suppression of *AvrLm10A* through silencing revealed a role of *AvrLm10A* in restricting leaf lesion development (Petit-Houdenot *et al.*, 2019), thus favoring the biotrophic stage of infection before the fungus switches to necrotrophy. Moreover, except for the *Lmb_jn3_02612* / *Lema_P017580.1* pair, all *AvrLm10* family gene pairs are specifically and highly expressed during asymptomatic stages of plant colonization, suggesting they play roles of biotrophic effectors during plant infection. In accordance with their genome environment, *AvrLm10-A/AvrLm10-B* and *Lmb_jn3_09745/ Lmb_jn3_09746* are overexpressed during all the biotrophic stages of plant colonization in cotyledons, petioles and stems, while the two other gene pairs, *Lmb_jn3_08094/ Lmb_jn3_08095* and *Lmb_jn3_04095/ Lmb_jn3_04096*, are highly expressed during the late biotrophic stages of oilseed rape colonization on petiole and stem. These two distinct expression patterns suggest a potential relay between members of the AvrLm10 family during the long colonization of oilseed rape or distinct roles played during cotyledon and petiole / stem colonization.

The *AvrLm10A/SIX5* genes are often organized tail-to-tail with another putative effector-encoding gene, and formation of heterodimers between the two effectors may be required for function (see below). The AvrLm10B member of the pair is also conserved in a few species of Dothideomycetes and Sordariomycetes, but the remarkable feature of the AvrLm10A/SIX5

homologues is that they are organized as pairs of genes in inverse orientation with eight distinct families of effectors with no recognizable sequence identity between families, including AvrLm10B and Avr2. These families comprise between three and 15 members scattered between different species. Some are specific to the Sordariomycetes (such as the Avr2 family), while others such as the AvrLm10B family are found in Dothideomycetes and a few Sordariomycetes of the *Colletotricum* genus. This variability can even be found within a genome with species such as *Bipolaris maydis* and a few *Colletotrichum* species for which the AvrLm10A/SIX5 homologues are paired with representative of two distinct putative effector-encoding gene families. In contrast, in *L. maculans* ‘brassicae’, the five paralogues of AvrLm10A are all associated to a homologue of AvrLm10B. In another species, *M. oryzae*, generation of paralogues of the avirulence effector gene *Avr-Pita* had been suggested to originate from a conserved copy in the essential genome (but deprived of avirulence activity) and duplicated multiple times via transpositions to other compartments of the genome such as sub-telomeres (Chuma *et al.*, 2011). From our data, it is tempting to speculate that the *Lm_JN3_02612-Lema_P017580.1* couple, located in the essential genome, but seemingly inactive, is the initial couple from which translocation/diversification in other genome compartments occurred. This would be consistent with its sequence proximity to an orthologue in the species most closely related to *L. maculans* ‘brassicae’, *L. maculans* ‘lepidii’ (Grandaubert *et al.* 2014; Soyer *et al.*, 2020).

In *L. maculans*, identification of an effector family is very unusual, since very few paralogues are present in the genome of this fungus. Indeed, the only *L. maculans* ‘brassicae’ effector family described to-date had no recognizable sequence identity, though sharing the same 3-D structure (Lazar *et al.*, 2020). This is due to RIP that is active in *L. maculans* ‘brassicae’ during sexual mating occurring every year (Rouxel *et al.*, 2011). We can hypothesize that the duplications that led to the presence of five pairs of paralogues in *L. maculans* genome occurred a long time ago, at a moment when RIP was not active, as suggested for the expansion of TE in the genome of *L. maculans* compared to closely related species (Grandaubert *et al.*, 2014). While having possibly been protected from RIP a long time ago, it can be noticed that the *Lm_JN3_09745- Lm_JN3_09746* couple, the paralogue pair located in an AT-rich region has typical inactivation signatures (RIP mutations and deletions) with a presence in only ca. 65% of isolates. This is typical of AVR genes having been submitted to selection by a matching resistance gene (Rouxel and Balesdent, 2017). In particular, both genes are absent in almost all the Mexican and more than 50% the Australian isolates. Since

the *Rlm10* resistance gene has been identified in *B. nigra* (Chèvre *et al.*, 1996) but not introduced yet in *B. napus*, it does not exert a selection pressure on *L. maculans* populations present on oilseed rape. In contrast, *Lmb_jn3_09745-Lmb_jn3_09746* have possibly been submitted to a selection pressure by a still unknown resistance gene present in oilseed rape (and/or *B. oleracea*) grown in Australia and Mexico.

The fact that we find the same or closely related species in different clades suggests that the AvrLm10A/SIX5 family experienced several rounds of duplication. However, horizontal transfer events, rather than duplication and independent losses, could also explain the patchy distribution we observe and the ‘unlikely’ grouping of evolutionary distant species. For example, the grouping of *Colletotrichum* species with *Penicillium polonicum* in clade III, the grouping of *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum* species with *Rhynchosporium agropyri* and possibly the grouping of four *Colletotrichum* species in a clade with only *Dothideomycetes*, including *Leptosphaeria*, are probably best explained by introgressions or horizontal transfer. However, for most cases the extent of sequence divergence between the proteins in different subclades in the tree, suggests a long period of diversification consistent with ancestral duplications.

Petit-Houdenot *et al.* (2019) showed that AvrLm10A and AvrLm10B physically interact. Using two different approaches (FRET-FLIM and CoIP), we also found a clear physical interaction between *Lmb_jn3_09745* and *Lmb_jn3_09746*. In contrast, even though *Lmb_jn3_08094* and *Lmb_jn3_08095* showed the same nucleo-cytoplasmic localization in epidermal cells of *N. benthamiana* leaves, we did not detect any interaction between these two proteins. As mentioned before, AvrLm10A and its homologues share sequence homology with SIX5 from *Fol*, including conservation of cysteine number and spacing indicating potential structural conservation. SIX5 functions in pair with Avr2, the two effectors being also able to interact physically. Like *AvrLm10A/AvrLm10B*, which are both required to trigger Rlm10-mediated resistance, the *AVR2-SIX5* gene pair is required for *I-2* mediated resistance in tomato (Ma *et al.*, 2015). Avr2 was found to contribute to virulence on susceptible tomatoes and recently demonstrated to target an evolutionarily conserved immune pathway (likely an early component of the PAMP-triggered immunity (PTI) signaling) acting as an adaptor protein to modulate cell-signaling cascades, Six5 playing a role of mediating movement of Avr2 from cell to cell via plasmodesmata (Di *et al.*, 2017; Cao *et al.*, 2018). This may suggest that AvrLm10A and *Lmb_jn3_09745* could also have the ability of

transporting their partner proteins from cell to cell during early infection of *L. maculans* leaves. By contrast, Lmb_jn3_0809 could have lost that ability or, since Lmb_jn3_08094/Lmb_jn3_08095 pair is produced specifically in petioles and stem, Lmb_jn3_08095 would not require anymore to be transmitted from cell to cell via plasmodesmata. Lmb_jn3_08094 could have acquired a distinct function in these tissues, as previously found for See1 (Seedling efficient effector1) from *Ustilago maydis*, which is required for the reactivation of plant DNA synthesis and affects tumor progression in leaf cells but does not affect tumor formation in immature tassel floral tissues (Redkar *et al.*, 2015). This would indicate neo-functionalization and at least partly non-redundant functions of the four gene pairs.

All in all, conservation of AvrLm10A/SIX5 suggests a general function of these effector proteins in cooperating with a limited number of other effectors. Moreover, the finding that most effectors belong to more or less conserved families suggests resistance genes targeting these families may exist or may be engineered to allow recognition of more than one pathogen, and thus usable for development of broad-spectrum resistances controlling fungal plant diseases.

Experimental procedures

Fungal isolates and culture conditions

Isolates of *L. maculans* used in this study were collected from either naturally or experimentally infected plants (Table S2). The genome of v23.1.3 is completely sequenced and annotated, therefore this isolate is used as the reference *L. maculans* isolate (Rouxel *et al.*, 2011; Dutreux *et al.*, 2018). v23.1.2 is a sister isolate of v23.1.3. All fungal cultures were maintained on V8 juice agar medium, and highly sporulating cultures were obtained on V8 juice, as previously described by Ansan-Melayah *et al.* (1995).

Bacterial strains and DNA manipulation

The amplification of genes of interest encoding the different effectors was performed using specific primer pairs (Table S1) on cDNA of the reference isolate v23.1.3, grown *in vitro*, using the Taq polymerase Phusion (Invitrogen, Carlsbad, USA) under standard PCR conditions. Using a Gateway cloning strategy, PCR products flanked by attB recombination sites were recombined into pDONR221 vectors (Invitrogen, Carlsbad, USA) via a BP recombination reaction generating an entry clone carrying attL sequences according to the

supplier's recommendations (<https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/cloning/gateway-cloning/protocols.html#bp>). *Escherichia coli* strain DH5 α (Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis) was used for the amplification of the entry vectors. *E. coli* transformants were selected on Luria-Bertani (LB) medium (peptone 10 g/l, yeast extract 5 g/l, NaCl 10 g/l) with 50 μ g/ml of kanamycine. Inserts cloned into entry vectors were subsequently inserted into different destination vectors: pSite-dest-RFP, pSite-dest-GFP, pSite-RFP-dest and pSite-GFP-dest via a LR recombination reaction between an *attL*-containing entry clone and an *attR*-containing destination vector to generate an expression clone. The *A. tumefaciens* GV3101::pMP90 strain was then transformed with the destination vectors.

DNA extraction, PCR and sequencing

Genomic DNA was extracted from *L. maculans* conidia with the DNeasy 96 plant kit (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France) as described previously (Attard *et al.* 2002). *AvrLm10A*, *AvrLm10B* and their homologues were amplified by PCR using primer pairs located in the 5' and 3'UTR of the genes (Table S1). PCR amplification was performed using GoTaq (GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase, Promega) and an Eppendorf Mastercycler EP Gradient thermocycler (Eppendorf, Le Pecq, France). A subset of PCR products were sequenced by Eurofins Genomics (Eurofins, Ebersberg, Germany). Sequences were aligned and compared using DNASTAR Lasergene Software (Version 12.2.0.80)

Identification of homologues and Phylogenetic analyses

In order to search for *AvrLm10A/AvrLm10B* homologues in *L. maculans* '*brassicae*' v23.1.3, and closely related species forming the oilseed rape-infecting species complex, a blastp analysis with BioEdit software (Hall *et al.*, 1999) was performed against the proteomes of *L. maculans* '*brassicae*' (v23.1.3), *L. maculans* '*lepidii*' (IBCN84) and two subspecies of *L. biglobosa*, '*thlaspii*' (IBCN65) and '*brassicae*' (B3.5) available on <https://bioinfo.bioger.inrae.fr/portal/data-browser/public/leptosphaeria/genomes>.

Blastp analyses were then performed against the NCBI online databases to find the homologues of the five protein pairs found in *L. maculans*. Several criteria were used to filter the homologues in addition to the e-value such as percentage of coverage, sequence size and number of cysteines. All protein homologues identified in other species were again aligned against a v23.1.3 proteome database using BioEdit to find the best reciprocal Blast. To complete the search for *AvrLm10B* homologues, an approach based on synteny was used.

Both NCBI and Ensembl Fungi were used to identify the closest neighboring genes of *AvrLm10A* / *SIX5* homologues in opposite transcriptional orientation. We checked whether these genes encoded a small protein and if they were homologous to either *AvrLm10B* or *Avr2*. Amino acid sequences of *AvrLm10A* homologues were aligned with m-coffee using the webserver (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:mcoffee>; Moretti *et al.*, 2007). The multiple sequence alignment was adjusted manually to realign a few cysteines.

Based on this curated multiple sequence alignment, we searched for the best substitution model with ModelFinder (WAG+R4) and inferred a maximum likelihood phylogenetic tree with iqtree (2.1.4-beta) with 1000 bootstrapping replicates (Kalvaanamorthy *et al.*, 2017; Hoang *et al.*, 2018; Minh *et al.*, 2020). We pruned the tree, removing all branches with bootstrap support below 60% and visualized it with ete3.

In order to determine whether the neighbouring genes of *AvrLm10A/SIX5* belonged to common families, a database containing all the corresponding proteins was constructed and a blastp against that database was performed using the BioEdit software (e-value<1).

RNAseq analysis

Expression of the *AvrLm10* gene family during infection of oilseed rape by *L. maculans* was investigated using RNAseq data generated by Gay *et al.* (2021). Reads from Darmor-*bzh* cotyledons at 2, 5, 7, 9, 12 and 15 days post inoculation (DPI), from inoculated petioles at 7 and 14 DPI and from inoculated stems at 14 and 28 DPI inoculated with pycnidiospores of the reference *L. maculans* isolate v23.1.2 were analyzed. Reads from *L. maculans* grown on V8-agar medium were used as control. Two biological replicates were analyzed per condition. RNASeq reads were mapped on the model genes of *L. maculans* reference strain v23.1.3 after normalization by library size (CPM). All genes were detected as differentially expressed in at least one infection condition compared to the *in vitro* growth condition on V8-agar medium, according to the criterion: Log_2 (Fold change) > 2.0 and p-value < 0.05. For *Lmb_jn3_02612/Lema_P017580.1*, an alignment against RNAseq reads under controlled conditions was again performed after manually correcting the two sequences. To determine whether this last gene pair was expressed in other infection conditions, the expression level of both genes was checked in field conditions, during stem colonization and saprophytic growth on residues.

Quantitative RT-PCR analysis

RNA samples generated by Gay *et al.* (2021) were adjusted to 3 µg to generate cDNA using oligo-dT with the SMARTScribe Reverse Transcriptase (Clontech, Palo Alto, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. RNA samples corresponded to several infection stages of *L. maculans* v23.1.2 isolate on the susceptible cultivar of *B. napus*, Darmor-bzh: 2, 7 and 14 DPI on cotyledons, 7 and 14 DPI on petioles and 28 DPI on stems. qRT-PCR experiments were performed using a 7900 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and ABsolute SYBR Green ROX dUTP Mix (ABgene, Courtaboeuf, France) as described by Fudal *et al.* (2007). For each condition, two independent biological and two technical replicates were performed. The qRT-PCR primers used are indicated in Table S1. They were drawn using the "PrimerSelect" tool from Lasergene. Cycle threshold (Ct) values were analyzed as described by Muller *et al.* (2002) using the constitutive reference genes *EF1alpha* and *actin*.

Transient expression assays

For *Agrobacterium*-mediated *N. benthamiana* leaf transformations, *A. tumefaciens* GV3101::pMP90 strains expressing the different genes of interest (*AvrLm10A*, *AvrLm10B*, *Lmb_jn3_08094*, *Lmb_jn3_08095*, *Lmb_jn3_09745* and *Lmb_jn3_09746*) coupled to GFP or RFP at the C-terminal and N-terminus were grown overnight in 10 ml of LB liquid medium with appropriate antibiotics (rifampicin 25 µg/ml, streptomycin, spectinomycin and gentamycin 100 µg/ml) at 28°C and 220-250 rpm. Two ml of overnight cultures were transferred in 18 ml of LB with antibiotics for 4 h at 28°C and 220-250 rpm, centrifuged for 10 min at 5000 rpm, and pellets were resuspended in agroinfiltration medium (MES: 10 mM, MgCl₂: 10 mM, Acetosyringone: 200 µM) to OD₆₀₀=0.5. *Agrobacteria* were left for 2 to 3 h, in the dark at room temperature, and then infiltrated on the underside of 4- to 5-week-old *N. benthamiana* leaves with a 1-ml syringe without a needle. The infiltrated plants were incubated for 48 h in growth chambers with 16 h of day (25 °C, 50% humidity) and 8 h of night (22 °C, 50% humidity) for FRET-FLIM, co-immunoprecipitation or co-localization experiments.

Confocal laser scanning microscopy

Leica TCS SPE laser scanning confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) was used for cytology observations with a X 63 oil immersion lens. *N. benthamiana* leaves were observed 48h post-infiltration of *agrobacteria*. For the GFP detection, the laser emitted at

488 nm and emission was captured using a 489–509 nm broad-pass filter. For the RFP detection the laser emitted at 532 nm and emission was captured using 558–582 nm. The detector gain was between 800 and 900.

FRET-FLIM and data analysis

The fluorescence lifetime of the donor was measured experimentally in the presence and absence of the acceptor. FRET efficiency (E) was calculated by comparing the lifetime of the donor (Lmb_jn3_09745-GFP or Lmb_jn3_08094-GFP) in the presence (tDA) or absence (tD) of the acceptor (Lmb_jn3_09746-RFP, Lmb_jn3_08095-RFP, RFP-Lmb_jn3_08095 or LmStee98-RFP): $E=1-(tDA)/(tD)$. LmStee98, another *L. maculans* effector highly expressed during the late asymptomatic colonization phase of petioles and stems was used as a negative control for the interaction with Lmb_jn3_09745 or Lmb_jn3_08094. Statistical comparisons between control (donor) and assay (donor+acceptor) lifetime values were performed by Student's t-test. FRET-FLIM measurements were performed using a FLIM system coupled to a streak camera (Krishnan *et al.*, 2003) as described in Petit-Houdenot *et al.* (2019). For each cell, average fluorescence decay profiles were plotted and lifetimes were estimated by fitting data with an exponential function using a nonlinear least-squares estimation procedure (detailed in Camborde *et al.*, 2017).

Protein extraction, Western blot and co-immunoprecipitation

Lmb_jn3_08094-GFP/ Lmb_jn3_08095-RFP or Lmb_jn3_09745-GFP /Lmb_jn3_09746-RFP were coexpressed in *N. benthamiana* leaves. Lmb_jn3_08094-GFP and Lmb_jn3_09745-GFP were coexpressed with RFP, as a negative control. 48h after infiltration, proteins from 1 g of *N. benthamiana* leaves were extracted using a protein extraction buffer (1 ml of 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2 mM EDTA, 1% SDS, 1% β -mercapto-ethanol, 10% glycerol, 0.025% bromophenol blue, 1 mM PMSF protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher, Rockford, USA)). For immunodetection of proteins, a part of the extracted proteins were directly mixed with 4X Laemmli Sample Buffer (Biorad, Hercules, USA) and boiled for 5 min. Monoclonal anti-RFP (RF5R) antibody (Thermo Fisher, Rockford, USA), anti-GFP antibody (Invitrogen Camarillo, USA) and a secondary Goat-anti-mouse antibody conjugated with horseradish peroxidase (Dako, Glostrup, Denmark) were used as described in Petit-Houdenot *et al.* (2019). For anti-RFP immunoprecipitations, 20mL of magnetic RFP-trap M beads (RFP-Trap[®] Chromotek) were prewashed in the protein extraction buffer before being added to the protein extract. The mixture was gently agitated for 3h at 4°C, before collecting the magnetic beads using a magnetic rack. The beads were washed 4 times with the protein extraction

buffer, then once with low salt washing buffer (20 mM Tris HCl, pH7.5). The proteins collected on beads were eluted by boiling in 4X Laemmli Sample Buffer (Biorad, Hercules, USA) for 5 min and run on a 10% polyacrylamide gel containing SDS. Then, proteins were blotted onto PVDF membranes using semi-dry blotting for 30 min at 15 V (Biorad, Hercules, USA) and analyzed by immunoblotting using Mouse anti-GFP, or monoclonal anti-RFP antibodies, as described in Petit-Houdenot *et al.* (2019).

Acknowledgements

Authors wish to thank all members of the “Effectors and Pathogenesis of *L. maculans*” group. We are grateful to the BIOGER bioinformatics platform (<https://bioinfo.bioger.inrae.fr/>; Nicolas Lapalu, Adeline Simon) for helpful discussions. N. Talbi was funded by a PhD salary from the University Paris-Saclay and Y. Petit-Houdenot by a “Contrat Jeune Scientifique” grant from INRAE. The “Effectors and Pathogenesis of *L. maculans*” group benefits from the support of Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-17-EUR-0007). This work was supported by the French National Research Agency project StructuraLEP (ANR-14-CE19-0019). The “Laboratoire des Interactions Plantes-Microbes-Environnement” is part of the French Laboratory of Excellence project (TULIP ANR-10-LABX-41).

References

- Ansan-Melayah, D., Balesdent, M. H., Buee, M., Rouxel, T. (1995) Genetic characterization of AvrLm1, the first avirulence gene of *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology*, 85(12), 1525-1529.
- Attard, A., Gout, L., Gourgues, M., Kühn, M. L., Schmit, J., Laroche, S. *et al.* (2002) Analysis of molecular markers genetically linked to the *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm1* in field populations indicates a highly conserved event leading to virulence on *Rlm1* genotypes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(7), 672-682.
- Balesdent, M. H., Attard, A., Kühn, M. L., & Rouxel, T. (2002) New avirulence genes in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology*, 92(10), 1122-1133.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., Von Heijne, G., & Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of molecular biology*, 340, 783-795.
- Balesdent, M. H., Fudal, I., Ollivier, B., Bally, P., Grandaubert, J., Eber, F. *et al.* (2013) The dispensable chromosome of *Leptosphaeria maculans* shelters an effector gene conferring avirulence towards *Brassica rapa*. *New Phytologist*, 198(3), 887-898.
- Boutemy, L. S., King, S. R., Win, J., Hughes, R. K., Clarke, T. A., Blumenschein, T. M. *et al.* (2011) Structures of Phytophthora RXLR effector proteins: a conserved but adaptable fold underpins functional diversity. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 35834-35842.

- Brun, H., Chèvre, A. M., Fitt, B. D., Powers, S., Besnard, A. L., Ermel, M. *et al.* (2009) Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytologist*, 185(1), 285-299.
- Camborde, L., Jauneau, A., Briere, C., Deslandes, L., Dumas, B., & Gaulin, E. (2017) Detection of nucleic acid–protein interactions in plant leaves using fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nature protocols*, 12, 1933-1950.
- Cao, L., Blekemolen, M. C., Tintor, N., Cornelissen, B. J., & Takken, F. L. (2018) The *Fusarium oxysporum* Avr2-Six5 effector pair alters plasmodesmatal exclusion selectivity to facilitate cell-to-cell movement of Avr2. *Molecular plant*, 11(5), 691-705.
- Chèvre, A. M., Eber, F., This, P., Barret, P., Tanguy, X., Brun, H. *et al.* (1996) Characterization of *Brassica nigra* chromosomes and of blackleg resistance in *B. napus*–*B. nigra* addition lines. *Plant Breeding*, 115, 113-118.
- Chuma, I., Isobe, C., Hotta, Y., Ibaragi, K., Futamata, N., Kusaba, M. (2011) Multiple translocation of the AVR-Pita effector gene among chromosomes of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* and related species. *PLoS Pathogens*, 7(7), e1002147.
- Daverdin, G., Rouxel, T., Gout, L., Aubertot, J. N., Fudal, I., Meyer, M. *et al.* (2012) Genome structure and reproductive behaviour influence the evolutionary potential of a fungal phytopathogen. *PLoS Pathogens*, 8, e1003020.
- Degrave A, Wagner M, George P, Coudard L, Pinochet X, Ermel M, *et al.* (2021) A new avirulence gene of *Leptosphaeria maculans*, *AvrLm14*, identifies a resistance source in American broccoli (*Brassica oleracea*) genotypes. *Molecular Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1111/mpp.13131>
- Delourme, R., Chèvre, A. M., Brun, H., Rouxel, T., Balesdent, M. H., Dias, J. S. *et al.* (2006) Major gene and polygenic resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*). In *Sustainable strategies for managing Brassica napus (oilseed rape) resistance to Leptosphaeria maculans (phoma stem canker)* Springer, Dordrecht, 41-52.
- Dilmaghani, A., Balesdent, M. H., Didier, J. P., Wu, C., Davey, J., Barbetti, M. J. *et al.* (2009) The *Leptosphaeria maculans*–*Leptosphaeria biglobosa* species complex in the American continent. *Plant Pathology*, 58(6), 1044-1058.
- Dilmaghani, A., Gout, L., Moreno-Rico, O., Dias, J. S., Coudard, L., Castillo-Torres, N. *et al.* (2013) Clonal populations of *Leptosphaeria maculans* contaminating cabbage in Mexico. *Plant Pathology*, 62(3), 520-532.
- Di, X., Cao, L., Hughes, R. K., Tintor, N., Banfield, M. J., & Takken, F. L. (2017) Structure–function analysis of the *Fusarium oxysporum* Avr2 effector allows uncoupling of its immune-suppressing activity from recognition. *New Phytologist*, 216, 897-914.
- Dutreux, F., Da Silva, C., d’Agata, L., Couloux, A., Gay, E. J., Istace, *et al.* (2018). De novo assembly and annotation of three *Leptosphaeria* genomes using Oxford Nanopore MinION sequencing. *Scientific data*, 5, 1-11.
- de Guillen, K., Ortiz-Vallejo, D., Gracy, J., Fournier, E., Kroj, T., & Padilla, A. (2015) Structure analysis uncovers a highly diverse but structurally conserved effector family in phytopathogenic fungi. *PLoS pathogens*, 11, e1005228.
- De Jonge, R., Van Esse, H. P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R. *et al.* (2010) Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *science*, 329, 953-955.
- Figuroa, M., Ortiz, D., Henningsen, E.C. (2021) Tactics of host manipulation by intracellular effectors from plant pathogenic fungi. *Curr Opin Plant Biol.* 62:102054.
- Fisher, M. C., Hawkins, N. J., Sanglard, D., & Gurr, S. J. (2018) Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science*, 360, 739-742.

- Fudal, I., Ross, S., Gout, L., Blaise, F., Kuhn, M. L., Eckert, M. R., *et al.* (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(4), 459-470.
- Fudal, I., Ross, S., Brun, H., Besnard, A. L., Ermel, M., Kuhn, M. L. *et al.* (2009) Repeat-induced point mutation (RIP) as an alternative mechanism of evolution toward virulence in *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22, 932-941.
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. D., Jaffe, D. *et al.* (2003) The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*, 422(6934), 859-868.
- Gay, E. J., Soyer, J. L., Lapalu, N., Linglin, J., Fudal, I., Da Silva, C. *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, 1-27.
- Gervais, J., Plissonneau, C., Linglin, J., Meyer, M., Labadie, K., Cruaud, C. *et al.* (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, N. J., Links, M. G., Balesdent, M. H., Profotova, B. *et al.* (2015) Rapid identification of the *Leptosphaeria maculans* avirulence gene AvrLm2 using an intraspecific comparative genomics approach. *Molecular plant pathology*, 16(7), 699-709.
- Ghanbarnia, K., Ma, L., Larkan, N. J., Haddadi, P., Fernando, W. G. D., & Borhan, M. H. (2018) *Leptosphaeria maculans* AvrLm9: a new player in the game of hide and seek with AvrLm4-7. *Molecular plant pathology*, 19, 1754-1764.
- Gout, L., Fudal, I., Kuhn, M. L., Blaise, F., Eckert, M., Cattolico, L. *et al.* (2006) Lost in the middle of nowhere: the AvrLm1 avirulence gene of the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*. *Molecular microbiology*, 60(1), 67-80.
- Grandaubert, J., Lowe, R. G., Soyer, J. L., Schoch, C. L., Van de Wouw, A. P., Fudal, I., *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, 1-27
- Guttman, D. S., McHardy, A. C., & Schulze-Lefert, P. (2014) Microbial genome-enabled insights into plant-microorganism interactions. *Nature Reviews Genetics*, 15(12), 797-813.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hoang, D.T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B.Q., Vinh L.S. (2018) UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Mol. Biol. Evol.*, 35, 518–522. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>
- Irieda, H., Inoue, Y., Mori, M., Yamada, K., Oshikawa, Y., Saitoh, H. *et al.* (2019) Conserved fungal effector suppresses PAMP-triggered immunity by targeting plant immune kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116, 496-505.
- Jiquel, A., Gervais, J., Geistodt-Kiener, A., Delourme, R., Gay, E. J., Ollivier, B. *et al.* (2021) A gene-for-gene interaction involving a ‘late’ effector contributes to quantitative resistance to the stem canker disease in *Brassica napus*. *New Phytologist*.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006) The plant immune system. *nature*, 444(7117), 323-329.
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B.Q., Wong, T.K.F., von Haeseler, A., and Jermini, L.S. (2017) ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods* 14,587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
- Krishnan, R. V., Masuda, A., Centonze, V. F. E., & Herman, B. A. (2003) Quantitative imaging of protein-protein interactions by multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy using a streak camera. *Journal of biomedical optics*, 8, 362-367.

- Lazar, N., Mesarich, C. H., Petit-Houdenot, Y., Talbi, N., de la Sierra-Gallay, I. L., Zélie, E. *et al.* (2021) A new family of structurally conserved fungal effectors displays epistatic interactions with plant resistance proteins. *bioRxiv*, 2020-12.
- Li, Y., Steenwyk, J.L., Chang, Y., Wang Y., James, T.Y., Stajich, J. *et al.* (2021). A genome-scale phylogeny of the kingdom Fungi. *Curr Biol.* 31, 1653-1665.
- Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., *et al.* (2015) Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual review of plant biology*, 66, 513-545.
- Ma, L., Houterman, P.M., Gawehns, F., Cao, L., Sillo, F., Richter, H., *et al.* (2015) The AVR2–SIX5 gene pair is required to activate I-2-mediated immunity in tomato. *New Phytol*, 208: 507-518.
- Mesarich, C. H., Ökmen, B., Rovenich, H., Griffiths, S. A., Wang, C., Karimi Jashni, M. *et al.* (2018) Specific hypersensitive response–associated recognition of new apoplastic effectors from *Cladosporium fulvum* in wild tomato. *Molecular plant-microbe interactions*, 31, 145-162.
- Minh, B.Q., Schmidt, H.A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M.D., von Haeseler, A., *et al.* (2020) IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol. Biol. Evol.* 37, 461 <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
- Moretti, S., Armougom, F., Wallace, I.M., Higgins, D.G., Jongeneel, C.V., Notredame, C. (2007) The M-Coffee web server: a meta-method for computing multiple sequence alignments by combining alternative alignment methods. *Nucleic Acids Research* 35, W645–W648. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm333>
- Muller, P. Y., Janovjak, H., Miserez, A. R., & Dobbie, Z. (2002) Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT PCR. *Biotechniques*, 33(3), 514-514.
- Neik, T. X., Ghanbarnia, K., Ollivier, B., Scheben, A., Severn-Ellis, A., Larkan, N. J. *et al.* (2020) Two independent approaches converge to the cloning of a new *Leptosphaeria maculans* avirulence effector gene, *AvrLmS-Lep2*. *Molecular Plant Pathology*.
- Parlange, F., Daverdin, G., Fudal, I., Kuhn, M. L., Balesdent, M. H., Blaise, F. *et al.* (2009). *Leptosphaeria maculans* avirulence gene AvrLm4-7 confers a dual recognition specificity by the Rlm4 and Rlm7 resistance genes of oilseed rape, and circumvents Rlm4-mediated recognition through a single amino acid change. *Molecular microbiology*, 71(4), 851-863.
- Pedersen, C., van Themaat, E. V. L., McGuffin, L. J., Abbott, J. C., Burgis, T. A., Barton, G. *et al.* (2012) Structure and evolution of barley powdery mildew effector candidates. *BMC genomics*, 13, 1-21.
- Petit-Houdenot, Y., Degrave, A., Meyer, M., Blaise, F., Ollivier, B., Marais, C. L. *et al.* (2019) A two genes–for–one gene interaction between *Leptosphaeria maculans* and *Brassica napus*. *New Phytologist*, 223, 397-411.
- Plissonneau, C., Daverdin, G., Ollivier, B., Blaise, F., Degrave, A., Fudal, I. *et al.* (2016) A game of hide and seek between avirulence genes AvrLm4-7 and AvrLm3 in *Leptosphaeria maculans*. *New Phytologist*, 209(4), 1613-1624.
- Redkar, A., Hoser, R., Schilling, L., Zechmann, B., Krzymowska, M., Walbot, V. *et al.* (2015) A secreted effector protein of *Ustilago maydis* guides maize leaf cells to form tumors. *The Plant Cell*, 27, 1332-1351.
- Rocafort, M., Fudal, I., & Mesarich, C. H. (2020) Apoplastic effector proteins of plant-associated fungi and oomycetes. *Current opinion in plant biology*, 56, 9-19.
- Rouxel, T., & Balesdent, M. H. (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, J. K., Hoede, C., Van de Wouw, A. P., Couloux, A. *et al.* Howlett, B. J. (2011) Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by Repeat-Induced Point mutations. *Nature communications*, 2, 1-10.

- Sánchez-Vallet, A., Fouché, S., Fudal, I., Hartmann, F. E., Soyer, J. L., Tellier, A., & Croll, D. (2018) The genome biology of effector gene evolution in filamentous plant pathogens. *Annual review of phytopathology*, *56*, 21-40.
- Seitner, D., Uhse, S., Gallei, M., & Djamei, A. (2018) The core effector Cce1 is required for early infection of maize by *Ustilago maydis*. *Molecular plant pathology*, *19*, 2277-2287.
- Shiller, J., Van de Wouw, A. P., Taranto, A. P., Bowen, J. K., Dubois, D., Robinson, A. *et al.* (2015) A large family of *AvrLm6*-like genes in the apple and pear scab pathogens, *Venturia inaequalis* and *Venturia pirina*. *Frontiers in plant science*, *6*, 980.
- Soyer, J. L., Clairet, C., Gay, E. J., Lapalu, N., Rouxel, T., Stukenbrock, E. H. *et al.* (2020) Genome-wide mapping of histone modifications in two species of *Leptosphaeria maculans* showing contrasting genomic organization and host specialization. *bioRxiv*.
- Soyer, J. L., El Ghalid, M., Glaser, N., Ollivier, B., Linglin, J., Grandaubert, J. *et al.* (2014). Epigenetic control of effector gene expression in the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *PLoS genetics*, *10*, e1004227.
- Stachowiak, A., Olechnowicz, J., Jedryczka, M., Rouxel, T., Balesdent, M. H., Happstadius, I. *et al.* (2006) Frequency of avirulence alleles in field populations of *Leptosphaeria maculans* in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, *114*(1), 67-75.
- Van den Burg, H. A., Harrison, S. J., Joosten, M. H., Vervoort, J., & de Wit, P. J. (2006) *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *19*, 1420-1430.
- Ve, T., Williams, S. J., Catanzariti, A. M., Rafiqi, M., Rahman, M., Ellis, J. G. *et al.* (2013) Structures of the flax-rust effector AvrM reveal insights into the molecular basis of plant-cell entry and effector-triggered immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*, 17594-17599.
- Wirthmueller, L., Maqbool, A., & Banfield, M. J. (2013) On the front line: structural insights into plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Microbiology*, *11*, 761-776.

Supporting Information legends

Figure S1. Localization and immunoblotting of the recombinant proteins *Lmb_jn3_08094*, *Lmb_jn3_08095*, *Lmb_jn3_09745* and *Lmb_jn3_09746* in *N. benthamiana* cells.

- A. Localization of *Lmb_jn3_09745*, *Lmb_jn3_09746*, *Lmb_jn3_08094* and *Lmb_jn3_08095* coupled to GFP or RFP at the C-terminal in *N. benthamiana* cells
- B. *Lmb_jn3_09745*GFP and *Lmb_jn3_08094*GFP immunoblotting with anti-GFP (α -GFP) antibodies (Input)

Figure S2. Phylogenetic tree and multiple sequence alignment of AvrLm10A / SIX5 homologues.

Maximum likelihood phylogeny of AvrLm10A/SIX5 homologues listed in Table S4. Putative duplications are indicated with red stars. The shape of terminal nodes indicates whether the protein is from a Sordariomycete (circle) or Dothideomycete (square) or other (no shape), nodes are colored according to species and labeled with the protein identifier. From left to right: species and strain name, different families of neighboring genes indicated with colored squares, the aligned protein sequence.

Table S1. Primers used in this study.

Table S2. Characteristics of the isolates used for polymorphism studies of the *AvrLm10* family in *Leptosphaeria maculans* populations.

Table S3. Presence and polymorphism of the *AvrLm10* family in *L. maculans* isolates.

Table S4. Homologues of AvrLm10A/SIX5 and associated proteins.

Table S5. Homologous proteins of AvrLm10B and its paralogues in *L. maculans* ‘brassicae’, identified in the NCBI nr database.

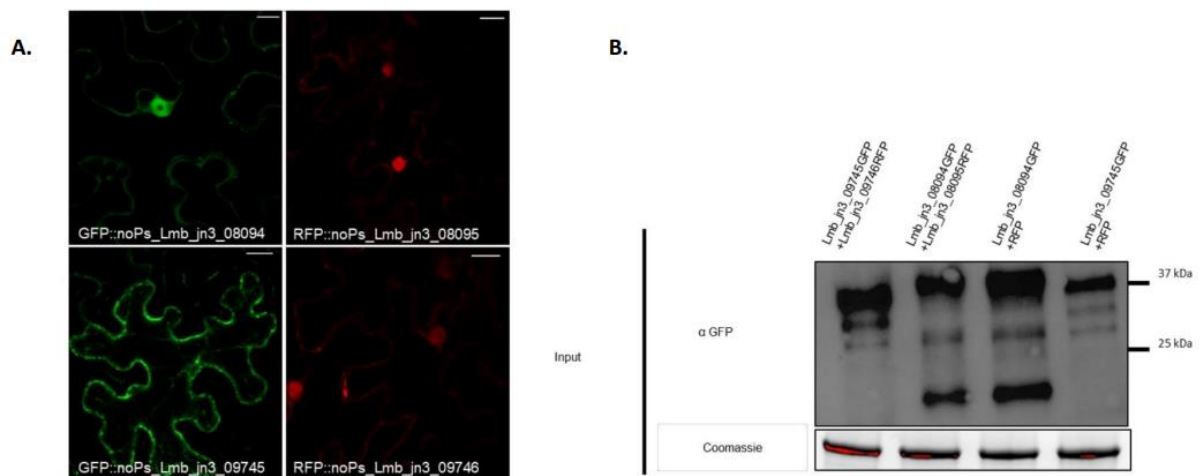


Figure S1. Localization and immunoblotting of the recombinant proteins *Lmb_jn3_08094*, *Lmb_jn3_08095*, *Lmb_jn3_09745* and *Lmb_jn3_09746* in *N. benthamiana* cells.

- A. Localization of *Lmb_jn3_09745*, *Lmb_jn3_09746*, *Lmb_jn3_08094* and *Lmb_jn3_08095* coupled to GFP or RFP at the C-terminal in *N. benthamiana* cells
- B. *Lmb_jn3_09745GFP* and *Lmb_jn3_08094GFP* immunoblotting with anti-GFP (α -GFP) antibodies (Input)

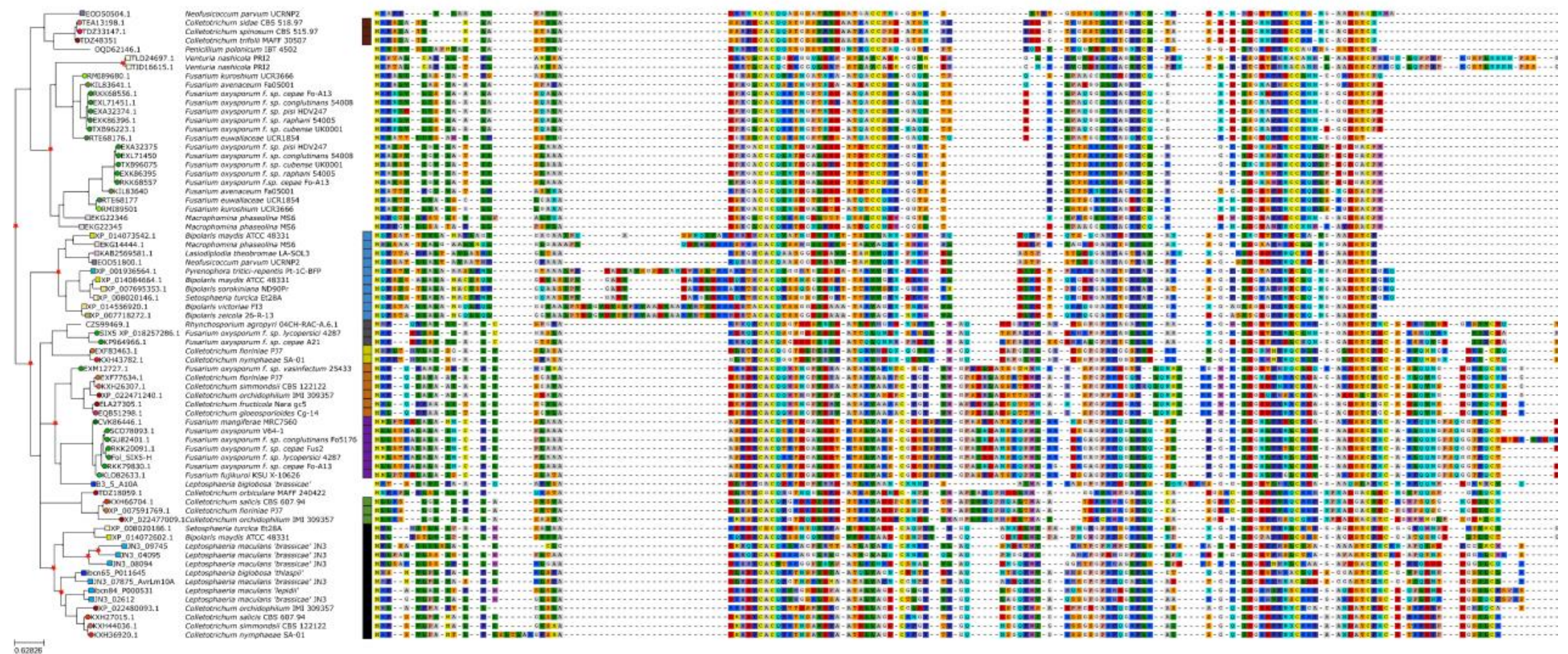


Figure S2. Phylogenetic tree and multiple sequence alignment of AvrLm10A / SIX5 homologues.

Maximum likelihood phylogeny of AvrLm10A/SIX5 homologues listed in Table S4. Putative duplications are indicated with red stars. The shape of terminal nodes indicates whether the protein is from a Sordariomycete (circle) or Dothideomycete (square) or other (no shape), nodes are colored according to species and labeled with the protein identifier. From left to right: species and strain name, different families of neighboring genes indicated with colored squares, the aligned protein sequence.

Table S1. Primers used in this study

Experiment	Primer name	Sequence
Cloning	jn3_08094_noPS -GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTtcATGGACAAACACCATT ATTGTGCC
	jn3_08094_nosto p-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTcACGTTGACACAGGATG CC
	jn3_08094_stop- GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTcCTAACGTTGACACAGG ATGCC
	jn3_08095_noPS -GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTtcATGTTGCCCTCGCTCAG AAGAATTTTC
	jn3_08095_nosto p-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTcTACATTATAGACTTCCC CATC
	jn3_08095_stop- GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTcCTATACATTATAGACTT CCCCATC
	jn3_09745_noPS -GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTtcATGGACATGCACCAGT ACTGTGC
	jn3_09745_nosto p-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTcTGACCAACACATAATG CCTC
	jn3_09745_stop- GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTcCTATGACCAACACATA ATGCCTC
	jn3_09746_noPS -GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTtcATGTCACCTACGCCAA ACGAA
	jn3_09746_nosto p-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTcTAGATTGTGCCAAGCC CCTG
	jn3_09746_stop- GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTcTTATAGATTGTGCCAA GCCCTG
	jn3_04095_noPS -GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTtcATGGACAAGCACCAG TATTGTGC
	jn3_04095_nosto p-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTcGCTCTTCCAACATAATT TCCC
	jn3_04095_stop- GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTcTTAGCTCTTCCAACATA ATTTCCC
	jn3_04096_noPS -GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTtcATGTTACCTGCCTCTA ACGAG
	jn3_04096_nosto p-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTcGCCACCAAGTGGGACT ATAACC
	jn3_04096_stop- GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTcTTAGCCACCAAGTGGG ACTATAACC
screening and sequencing	jn3_08094_noPS	GACAAACACCATTATTGTGCC
	jn3_08094_noSt op	ACGTTGACACAGGATGCC
	jn3_08095_noPS	TTGCCTCGCTCAGAAGAATTTTC
	jn3_08095_noSt op	TACATTATAGACTTCCCCATC
	jn3_09745_noPS	GACATGCACCAGTACTGTGC
	jn3_09745_noSt op	TGACCAACACATAATGCCTC
	jn3_09746_noPS	TCACCTACGCCCAACGAA
	jn3_09746_noSt op	TAGATTGTGCCAAGCCCCTG
	jn3_04095_noPS	GACAAGCACCAGTATTGTGC
	jn3_04095_noSt op	GCTCTTCCAACATAATTTCCC
	jn3_04096_noPS	TTACCTGCCTCTAACGAG
	jn3_04096_noSt	GCCACCAAGTGGGACTATAACC

	op	
	jn3_02612seq UU	GTACATAAGCTCCCCTCGC
	jn3_02612seq L	GTCATAGTCACGGCGCAAC
	Lema_P017580. 1seq U	ACAAGGGGTTGCTTATACACA
	Lema_P017580. 1seq L	AGTCGACCTAAGCCCTGATT
	jn3_08094seq U	AGAGTCGCTTGATCCATTGAA
	jn3_08094seq L	ACACCGTGAACCTATAGCCT
	jn3_08095seq U	ACCCACGCTATAAAGACACGA
	jn3_08095seq L	AAAGTCCCTGCGCTCTGTAT
	jn3_09745seq U	ATGCGTATCTAGTATACCCCTA
	jn3_09745seq L	GAGAAGAAGCCTTCCCTCT
	jn3_09746seq U	GGCAAACCCTAACCTACTT
	jn3_09746seq L	GCCCTAGAGCCTTAGATATAGCC
	jn3_04095seq U	AGGGAAGAGAGTGAAGACGA
	jn3_04095seq L	CGCGCGTCCTTGGTATTAAT
	jn3_04096_seq U	AGGAGAGATCTACCTTATACGCT
	jn3_04096_seq L	AGCACACTCTACCTTAACCGT
	AvrLm10AseqU	CCTTTTCCTTAGACCATGG
	AvrLm10AseqL	GGTGAGGAAGTTAAGAGAAGC
	AvrLm10B seqU	CCGTCTCCCACATTACTTC
	AvrLm10B seqL	CGTAGGAAAGGATATTCAAAGG
qPCR	jn3_08094_qU	TGCAAAACTGTTATCGTCCCTTT
	jn3_08094_qL	TGCAGGTACGTTAATAGGTCC
	jn3_08095_qU	AGTGGGGACCTGACAATGACC
	jn3_08095_qL	CTTCGCCAACGTAATAGCAGAC
	jn3_09745_qU	AGTACTGTGCCTGTCAAAG
	jn3_09745_qL	CAATTAGGGCCTGGTGTAT
	jn3_09746_qU	ACGCCAACGAATTTCCCAACTA
	jn3_09746_qL	GCTGCTCTGCGTGCTGTAACCA
	jn3_04095_qU	AGTATTGTGCCTGTGAGAAAA
	jn3_04095_qL	CTTATGAGCTATCCAGTATCCT
	jn3_04096_qU	GCGCGGCTGGAGAAGTC
	jn3_04096_qL	GCTGCGGCTGCTAAAGTAACA

Table S2: Characteristics of the isolates used for polymorphism studies of the AvrLm10 family in *Leptosphaeria maculans* populations and presence of the AvrLm10 family

ndme	Country	Region	Sampling date	Reference	Isolated from	AvrLm10A (presence) [†]	AvrLm10A (sequencing)	AvrLm10B (presence)	AvrLm10B (sequencing)
AD2	USA	Griffin (Georgia)	2005	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
AD4	USA	Griffin (Georgia)	2005	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
AD46	USA	Griffin (Georgia)	2005	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
AD66	USA	Griffin (Georgia)	2005	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	0	present
AD70	USA	Griffin (Georgia)	2005	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	0	present
AD87	USA	Plains (Georgia)	2005	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
AD134	USA	Plains (Georgia)	2005	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	0	present
AD109	USA	Plains (Georgia)	2005	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
AD126	USA	Plains (Georgia)	2005	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
AD105	USA	Plains (Georgia)	2005	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
AD194	Chile	Chile (Temuco)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Surpass 400	present	nd	present
AD190	Chile	Chile (Temuco)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Surpass 400	present	0	present
AD217	Chile	Chile (Temuco)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
AD219	Chile	Chile (Temuco)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
AD258	Chile	Chile (Temuco)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Surpass 400	present	0	present
AD323	Canada	Kincardine (Ontario)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
AD336	Canada	Kincardine (Ontario)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
AD372	Canada	Kincardine (Ontario)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	0	present
AD379	Canada	Kincardine (Ontario)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	0	present
AD420	Canada	Kincardine (Ontario)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	0	present
AD1294	Canada	North Saskatchewan (Alberta)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	0	present
AD1366	Canada	Westaskin (Alberta)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
AD752	Canada	Camrose (Alberta)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
AD466	Canada	Rosthern (Saskatchewan)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
AD717	Canada	Roland (Manitoba)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
AD917	Canada	Brandon (Manitoba)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	0	present
AD879	Canada	Elm Creek (Manitoba)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
AD987	Canada	Letellier (Manitoba)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	0	present
AD1120	Canada	Morris (Manitoba)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	0	present
AD951	Canada	Somerses (Manitoba)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	0	present
AD478	Canada	Rosthern (Saskatchewan)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
AD539	Canada	Waskatoon (Saskatchewan)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
AD1018	Canada	Morris (Manitoba)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
AD847	Canada	Brich hills (Saskatchewan)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
AD1198	Canada	Langin (Saskatchewan)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
AD 673	Canada	Rosthern (Saskatchewan)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
AD 462	Canada	Rosthern (Saskatchewan)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
WT3	Australia	Western Australia	2005	Vincenot et al., 2008 & Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
WT30	Australia	Western Australia	2005	Vincenot et al., 2008 & Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
WT50	Australia	Western Australia	2005	Vincenot et al., 2008 & Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
WT1	Australia	Western Australia	2005	Vincenot et al., 2008 & Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
WT78	Australia	Western Australia	2005	Vincenot et al., 2008 & Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
WT92	Australia	Western Australia	2005	Vincenot et al., 2008 & Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
WT12	Australia	Western Australia	2005	Vincenot et al., 2008 & Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
WT47	Australia	Western Australia	2005	Vincenot et al., 2008 & Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	0	present
WT57	Australia	Western Australia	2005	Vincenot et al., 2008 & Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	0	present
WT91	Australia	Western Australia	2005	Vincenot et al., 2008 & Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
WT15	Australia	Western Australia	2005	Vincenot et al., 2008 & Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	0	present
WT51	Australia	Western Australia	2005	Vincenot et al., 2008 & Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
WT64	Australia	Western Australia	2005	Vincenot et al., 2008 & Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
WT31	Australia	Western Australia	2005	Vincenot et al., 2008 & Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
WT86	Australia	Western Australia	2005	Vincenot et al., 2008 & Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	absent	nd	absent
WT101	Australia	Western Australia	2005	Vincenot et al., 2008 & Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
WT33	Australia	Western Australia	2005	Vincenot et al., 2008 & Dilmaghani et al., 2009	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
OMR186	Mexico	Salamanca	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	nd	present
OMR192	Mexico	Salamanca	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	nd	present
OMR199	Mexico	Salamanca	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	nd	present
OMR203	Mexico	Salamanca	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	nd	present
OMR211	Mexico	Salamanca	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	nd	present
OMR215	Mexico	Salamanca	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	0	present
OMR222	Mexico	Salamanca	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	nd	present
OMR238	Mexico	Salamanca	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	nd	present
OMR243	Mexico	Salamanca	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	nd	present
OMR249	Mexico	Salamanca	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	nd	present
OMR45	Mexico	Aguaascalientes	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	0	present
OMR48	Mexico	Aguaascalientes	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	nd	present
OMR51	Mexico	Aguaascalientes	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	nd	present
OMR56	Mexico	Aguaascalientes	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	nd	present
OMR61	Mexico	Aguaascalientes	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	0	present
OMR75	Mexico	Salamanca	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	0	present
OMR79	Mexico	Salamanca	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	nd	present
OMR87	Mexico	Salamanca	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	nd	present
OMR92	Mexico	Salamanca	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	absent	nd	present
OMR98	Mexico	Salamanca	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	0	present
OMR167	Mexico	Asientos	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	0	present
OMR166	Mexico	Asientos	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	nd	present
OMR180	Mexico	Asientos	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	nd	present
WT75	Australia	Western Australia	2005	Vincenot et al., 2008	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	0	present
WT32	Australia	Western Australia	2005	Vincenot et al., 2008	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
WT08	Australia	Western Australia	2005	Vincenot et al., 2008	<i>B. ndpus</i>	Westar	present	nd	present
IBC14	Australia	South Australia	1988	Mendes-Pereira et al., 2003	<i>B. ndpus</i>	unknown	present	0	present
IBC11	Australia	Victoria	1988	Mendes-Pereira et al., 2003	<i>B. ndpus</i>	unknown	present	0	present
OMR131	Mexico	Asientos	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	0	present
OMR134	Mexico	Asientos	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	0	present
OMR139	Mexico	Asientos	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	0	present
OMR142	Mexico	Asientos	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	nd	present
OMR105	Mexico	Asientos	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	nd	present
OMR110	Mexico	Asientos	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	nd	present
OMR111	Mexico	Asientos	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	nd	present
OMR113	Mexico	Asientos	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	nd	present
OMR119	Mexico	Asientos	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	nd	present
OMR124	Mexico	Asientos	2008	Dilmaghani et al., 2012	<i>B. oleracea</i>	broccoli	present	nd	present

ndme	<i>Lmb_jn3_08094</i> (presence)	<i>Lmb_jn3_08094</i> (sequencing)	<i>Lmb_jn3_08095</i> (presence)	<i>Lmb_jn3_08095</i> (sequencing)	<i>Lmb_jn3_09745</i> (presence)	<i>Lmb_jn3_09745</i> (sequencing)	<i>Lmb_jn3_09746</i> (presence)	<i>Lmb_jn3_09746</i> (sequencing)
AD2	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
AD4	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
AD46	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
AD66	present	0	present	0	present	0	present	S160T
AD70	present	0	present	0	present	0	present	0
AD87	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
AD134	present	0	present	0	present	0	present	0
AD109	absent	nd	absent	nd	absent	nd	absent	nd
AD126	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
AD105	present	0	present	0	present	0	present	S160A
AD194	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
AD190	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
AD217	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
AD219	present	0	present	0	present	nd	present	0
AD258	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
AD323	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
AD336	present	0	present	0	present	R27M	present	S160A
AD372	present	0	present	0	present	nd	present	nd
AD379	present	0	present	0	present	nd	present	nd
AD420	present	0	present	0	present	0	present	0
AD1294	present	0	present	0	present	0	present	0
AD1366	absent	nd	absent	nd	absent	nd	absent	nd
AD752	present	nd	present	nd	present	0	present	0
AD466	absent	nd	absent	nd	absent	nd	absent	nd
AD717	present	nd	present	nd	present	0	present	0
AD917	present	0	present	0	present	0	present	0
AD879	present	nd	present	nd	present	0	present	0
AD987	present	0	present	0	present	0	present	0
AD1120	present	0	present	0	present	0	present	0
AD951	present	0	present	0	present	0	present	0
AD478	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
AD539	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
AD1018	present	nd	present	nd	present	0	present	S160A
AD847	present	0	present	0	present	0	present	0
AD1198	present	nd	present	nd	present	0	present	0
AD 673	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
AD 462	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
WT3	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
WT30	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
WT50	present	0	present	0	present	0	present	0
WT1	absent	nd	absent	nd	absent	nd	absent	nd
WT78	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
WT92	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
WT12	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd

WT47	present	nd	present	0	present	0	present	0
WT57	present	0	present	0	present	0	present	0
WT91	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
WT15	present	0	present	0	absent	nd	absent	nd
WT51	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
WT64	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
WT31	present	0	present	0	absent	nd	absent	nd
WT86	absent	nd	absent	nd	absent	nd	absent	nd
WT101	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
WT33	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
OMR186	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
OMR192	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
OMR199	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
OMR203	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
OMR211	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
OMR215	present	0	present	0	absent	nd	absent	nd
OMR222	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
OMR238	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
OMR243	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
OMR249	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
OMR45	present	0	present	0	absent	nd	absent	nd
OMR48	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
OMR51	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
OMR56	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
OMR61	present	0	present	0	absent	nd	absent	nd
OMR75	present	0	present	0	absent	nd	absent	nd
OMR79	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
OMR87	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
OMR92	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
OMR98	present	0	present	0	absent	nd	absent	nd
OMR167	present	0	present	0	absent	nd	absent	nd
OMR166	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
OMR180	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
WT75	present	0	present	0	present	Q21STOP, Q53L,	present	R29Q, M56I, G78R,
WT32	present	nd	present	nd	absent		absent	nd
WT08	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
IBC14	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
IBC18	present	0	present	0	absent	nd	absent	nd
OMR131	present	0	present	0	absent	nd	absent	nd
OMR134	present	0	present	0	absent	nd	absent	nd
OMR139	present	0	present	0	absent	nd	absent	nd
OMR142	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
OMR105	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
OMR110	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
OMR111	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
OMR113	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
OMR119	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
OMR124	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd

INV.13.94	present	0	present	0	present	0	present	S160A and A162S
INV.13.95	present	nd	present	nd	present	0	present	0
INV.13.96	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.97	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.98	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.99	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.100	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.101	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.102	present	0	present	0	present	0	present	0
G13.501	present	nd	present	nd	present	0	present	0
G13.515	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
G13.100	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
G13.322	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.565	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.566	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.567	present	0	present	0	present	0	present	S160A and A162S
INV.13.569	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.570	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.571	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.572	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.573	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.661	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.662	present	nd	present	nd	present	0	present	S160A and A162S
INV.13.663	present	nd	present	nd	present	0	present	0
INV.13.664	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.665	present	nd	present	nd	present	0	present	0
INV.13.666	present	nd	present	nd	present	0	present	S160A and A162S
INV.13.667	present	nd	present	nd	present	0	present	0
INV.13.668	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.669	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.469	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.470	present	0	present	0	present	0	present	S160A and A162S
INV.13.471	present	0	present	0	present	0	present	0
INV.13.472	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.473	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.474	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.475	present	nd	present	nd	absent	nd	present	nd
INV.13.734	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.736	present	0	present	0	present	0	present	S160A
INV.13.737	present	0	present	0	present	0	present	S160A
INV.13.738	present	0	present	0	present	0	present	0
INV.13.739	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.740	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.741	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.476	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.477	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.387	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.389	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd

INV.13.390	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.391	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.392	present	0	present	0	present	0	present	S160A and A162S
INV.13.393	present	0	present	0	present	0	present	0
INV.13.394	present	0	present	0	present	0	present	S160A
INV.13.395	present	0	present	0	present	0	present	S160A and A162S
INV.13.290	present	0	present	0	present	0	present	0
INV.13.305	present	0	present	0	present	0	present	0
INV.13.307	present	0	present	0	present	0	present	0
INV.13.334	present	0	present	0	present	0	present	0

ndme	Lmb_jn3_04095 (presence)	Lmb_jn3_04095 (sequencing)	Lmb_jn3_04096 (presence)	Lmb_jn3_04096 (sequencing)	Lmb_jn3_02612 (presence)	Lmb_jn3_02612 (sequencing)	LemaP0212 (presence)	LemaP0212 (sequencing)
AD2	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
AD4	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
AD46	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
AD66	present	nd	present	0	present	0	present	0
AD70	present	0	present	0	present	0	present	0
AD87	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
AD134	present	0	present	0	present	0	present	0
AD109	absent	nd	absent	nd	present	nd	present	nd
AD126	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
AD105	present	nd	present	nd	present	0	present	0
AD194	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
AD190	absent	nd	present	0	present	0	present	0
AD217	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
AD219	present	nd	present	nd	present	0	present	0
AD258	absent	nd	present	0	present	nd	present	nd
AD323	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
AD336	present	nd	present	nd	present	0	present	0
AD372	present	0	present	0	present	0	present	0
AD379	present	0	present	0	present	0	present	0
AD420	present	0	present	0	present	0	present	0
AD1294	present	0	present	0	present	0	present	0
AD1366	absent	nd	present	nd	present	nd	present	nd
AD752	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
AD466	absent	nd	absent	nd	present	nd	present	nd
AD717	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
AD917	present	0	present	0	present	0	present	0
AD879	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
AD987	present	0	present	0	present	0	present	0
AD1120	present	nd	present	0	present	0	present	0
AD951	present	0	present	0	present	0	present	0
AD478	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
AD539	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
AD1018	absent	nd	present	nd	present	nd	present	nd
AD847	present	nd	present	nd	present	0	present	0
AD1198	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
AD 673	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
AD 462	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
WT3	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
WT30	present	nd	present	nd	absent	nd	present	nd
WT50	present	nd	present	0	present	0	present	0
WT1	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
WT78	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
WT92	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
WT12	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd

WT47	present	0	present	0	present	0	present	0
WT57	present	0	present	D178A	present	0	present	0
WT91	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
WT15	present	0	present	0	present	0	present	0
WT51	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
WT64	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
WT31	present	nd	present	nd	present	0	present	0
WT86	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
WT101	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
WT33	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
OMR186	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
OMR192	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
OMR199	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
OMR203	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
OMR211	absent	nd	present	nd	present	nd	present	nd
OMR215	present	0	present	0	present	0	present	0
OMR222	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
OMR238	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
OMR243	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
OMR249	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
OMR45	present	0	present	0	present	0	present	0
OMR48	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
OMR51	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
OMR56	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
OMR61	present	0	present	0	present	0	present	0
OMR75	present	0	present	0	present	0	present	0
OMR79	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
OMR87	present	nd	present	nd	absent	nd	present	nd
OMR92	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
OMR98	present	0	present	0	present	0	present	0
OMR167	present	0	present	0	present	0	present	0
OMR166	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
OMR180	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
WT75	present	0	present	0	present	0	present	0
WT32	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
WT08	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
IBC14	present	nd	present	0	absent	nd	present	nd
IBC18	present	0	present	0	present	0	present	0
OMR131	present	0	present	0	present	0	present	0
OMR134	present	0	present	0	present	0	present	0
OMR139	present	0	present	0	present	0	present	0
OMR142	present	nd	present	nd	absent	nd	present	nd
OMR105	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
OMR110	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
OMR111	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
OMR113	present	nd	present	nd	absent	nd	present	nd
OMR119	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
OMR124	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd

INV.13.94	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.95	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.96	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.97	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.98	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.99	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.100	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.101	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.102	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
G13.501	present	nd	present	nd	present	nd	absent	nd
G13.515	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
G13.100	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
G13.322	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.565	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.566	present	nd	present	nd	absent	nd	present	nd
INV.13.567	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.569	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.570	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.571	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.572	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.573	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.661	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.662	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.663	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.664	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.665	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.666	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.667	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.668	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.669	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.469	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.470	present	0	present	0	present	0	present	0
INV.13.471	present	0	present	0	present	0	present	0
INV.13.472	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.473	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.474	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.475	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.734	present	nd	present	nd	present	0	present	0
INV.13.736	present	nd	present	nd	present	0	present	0
INV.13.737	present	0	present	0	present	0	present	0
INV.13.738	present	0	present	0	present	0	present	0
INV.13.739	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.740	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.741	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.476	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.477	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.387	present	nd	present	nd	present	nd	present	nd
INV.13.389	present	nd	present	nd	present	nd	absent	nd

INV.13.390	present	nd	present	nd	absent	nd	present	nd
INV.13.391	present	nd	present	nd	absent	nd	absent	nd
INV.13.392	present	0	present	0	present	0	present	0
INV.13.393	present	0	present	0	present	0	present	0
INV.13.394	present	0	present	0	present	0	present	0
INV.13.395	present	nd	present	nd	present	0	present	0
INV.13.290	present	0	present	0	present	0	present	0
INV.13.305	present	0	present	0	present	nd	present	nd
INV.13.307	present	0	present	0	present	0	present	0
INV.13.334	present	0	present	0	absent	nd	present	nd

a Presence by PCR amplification.

nd: not done

0: gene has no mutation or a silent mutation (no impact at the protein level)

Table S3. Presence and polymorphism of the *AvrLm10* family in *L. maculans* isolates

Origin of the isolates ^a	<i>AvrLm10A</i>		<i>AvrLm10B</i>		<i>Lmb_jn3_08094</i>		<i>Lmb_jn3_08095</i>		<i>Lmb_jn3_09745</i>		<i>Lmb_jn3_09746</i>		<i>Lmb_jn3_04095</i>		<i>Lmb_jn3_04096</i>		<i>Lmb_jn3_02612</i>		<i>Lema_P017580.1</i>	
	PCR ^b	Mut ^c	PCR ^b	Mut ^c	PCR ^b	Mut ^c	PCR ^b	Mut ^c	PCR ^b	Mut ^c	PCR ^b	Mut ^c	PCR ^b	Mut ^c	PCR ^b	Mut ^c	PCR ^b	Mut ^c	PCR ^b	Mut ^c
USA	10/10 (100%)	0/3	10/10 (100%)	0/3	9/10 (90%)	0/4	9/10 (90%)	0/4	9/10 (90%)	1/4	9/10 (90%)	2/4	9/10 (90%)	0/2	9/10 (90%)	0/3	10/10 (100%)	0/4	10/10 (100%)	0/4
Chile	5/5 (100%)	1/2	5/5 (100%)	1/2	5/5 (100%)	0/1	5/5 (100%)	0/1	3/5 (60%)	na	3/5 (60%)	0/1	3/5 (60%)	na	5/5 (100%)	0/2	5/5 (100%)	0/2	5/5 (100%)	0/2
Canada	22/22 (100%)	6/8	22/22 (100%)	6/8	20/22 (90%)	1/10	20/22 (90%)	0/10	18/22 (81%)	1/13	18/22 (81%)	4/13	19/22 (86%)	0/7	21/22 (95%)	0/8	22/22 (100%)	0/10	22/22 (100%)	0/10
Australia	21/22 (95%)	1/6	21/22 (95%)	1/6	20/22 (91%)	0/6	20/22 (91%)	0/7	9/22 (41%)	1/4	9/22 (41%)	1/4	22/22 (100%)	0/5	22/22 (100%)	1/7	18/22 (82%)	0/7	20/22 (91%)	0/7
Mexico	32/33 (97%)	9/9	33/33 (100%)	9/9	33/33 (100%)	0/9	33/33 (100%)	0/9	2/33 (6%)	na	2/33 (6%)	na	32/33 (97%)	0/9	33/33 (100%)	0/9	29/33 (89%)	0/9	32/33 (97%)	0/9
France	57/58 (98%)	1/11	57/58 (98%)	0/6	58/58 (100%)	0/16	58/58 (100%)	0/16	57/58 (98%)	4/23	58/58 (100%)	10/23	58/58 (100%)	0/11	58/58 (100%)	0/11	54/58 (93%)	0/12	55/58 (94%)	0/12
Total	147/150 (98%)	18/39	148/150 (99%)	17/34	145/150 (97%)	1/46	145/150 (97%)	0/47	98/150 (65%)	7/44	99/150 (66%)	16/45	143/150 (95%)	0/35	148/150 (99%)	1/40	138/150 (92%)	0/44	144/150 (96%)	0/44

^aDetailed description of the isolates is available in Table S2

^bPresence of the genes was evaluated by PCR using 5' and 3'UTR specific primers (Table S1)

^cNumber of isolates with SNP (Single Nucleotide Polymorphism) compared to the reference isolate v23.1.3

Table S4. Homologues of AvrLm10A/SIX5 and associated proteins

Species	Strain	ID	Length (aa)	Cysteine number ^a	Size of the intergenic region (bp)	Neighbor ID encoding a small protein	Length (aa)	Cysteine number ^a
<i>L. maculans</i> 'brassicae'	JN3	Lmb_jn3_07875 (AvrLm10A)	120	7	7600	Lmb_jn3_07874 (AvrLm10B)	190	2
<i>L. maculans</i> 'brassicae'	JN3	Lmb_jn3_08094	123	7	699	Lmb_jn3_08095	174	2
<i>L. maculans</i> 'brassicae'	JN3	Lmb_jn3_02612	123	7	719	<i>LemaP017580.1</i>	179	2
<i>L. maculans</i> 'brassicae'	JN3	Lmb_jn3_04095	124	7	1200	Lmb_jn3_04096	180	2
<i>L. maculans</i> 'brassicae'	JN3	Lmb_jn3_09745	120	8	692	Lmb_jn3_09746	166	3
<i>L. maculans</i> 'lepidii'	IBCN84	Lml_ibcn84_P000531	123	7	179	Lm_ibcn84_P000532	179	2
<i>L. biglobosa</i> 'thlaspii'	IBCN65	Lbt_ibcn65_P011645	120	7	1337	Lb_ibcn65_P011644	170	2
<i>Colletotrichum salicis</i>		KXH27015.1	119	7	747	KXH27014	166	2
<i>Colletotrichum simmondsii</i>		KXH44036.1	119	7	762	KXH44035 (gene model adjusted)	167	2
<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	SA-01	KXH36920.1	125	7	764	KXH36921.1	170	2
<i>Colletotrichum orchidophilum</i>		XP_022480093.1	119	7	1128	XP_022480092	173	2
<i>Rhynchosporium agropyri</i>		CZS99469.1	122	7	3149	CZS99470.1	161	3
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>		EXM12727.1	126	7	2509	EXM12728	173	3
<i>Colletotrichum fioriniae</i>	PJ7	EXF77634.1	126	7	688	EXF77635	178	3
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	4287	XP_018257286 (SIX5)	119	7	1197	XP_018257288 (AVR2)	163	3
<i>Colletotrichum fructicola</i>	Nara gc5	ELA27305.1	126	7	637	ELA27306	176	4
<i>Colletotrichum simmondsii</i>		KXH26307.1	128	7	699	KXH26306 (gene model adjusted)	178	3

<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Cg-14	EQB51298.1 (gene model adjusted)	126	7	633	EQB51297	176	4
<i>Fusarium mangiferae</i>		CVK86446.1	133	8	854	CVK86445	158	1
<i>Fusarium oxysporum</i>	V64-1	SCO78093.1	133	8	829	SCO78094	158	1
<i>Fusarium oxysporum</i>	Fo5176	EGU82401.1	141	8	742	EGU82402 (gene model adjusted)	158	1
<i>Setosphaeria turcica</i>	Et28A	XP_008020186.1	120	7	1120	XP_008020185	170	2
<i>Bipolaris maydis</i>	ATCC 48331	XP_014072602.1	120	7	1082	XP_014072601	177	2
<i>Colletotrichum fioriniae</i>	PJ7	EXF83463.1	122	6	1194	EXF83462	179	2
<i>Fusarium fujikuroi</i>		KLO82633.1	133	8	754	KLO82632	158	1
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>		<i>not annotated</i>	132	8	829	XP_018239896 (FOXG_18957)	158	1
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	FoC_Fus2	RKK20091.1	133	8	825	RKK19707	111	0
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	Fo_A13	RKK79830.1	133	8	829	RKK79828 (gene model adjusted)	158	1
<i>Colletotrichum orchidophilum</i>		XP_022471240.1 (gene model adjusted)	126	7	675	XP_022471239	178	3
<i>Leptosphaeria biglobosa</i> 'brassicae'	B3.5	Lbb_B3.5_A10_A	119	5		Not found		
<i>Bipolaris maydis</i>	ATCC 48331	XP_014073542.1	114	4	973	XP_014073561	188	6
<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	SA-01	KXH43782.1	122	6	1376	KXH43783	179	2
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	Pt-1C-BFP	XP_001936564.1	130	4	1517	XP_001936563 (gene model adjusted)	247	12
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	MAFF 240422	TDZ18059.1	124	9		Not found		

<i>Bipolaris maydis</i>	ATCC 48331	XP_014084664.1	121	5	967	XP_014084665	254	10
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>		KAB2569581.1	103	4	1017	KAB2569575	226	9
<i>Macrophomina phaseolina</i>	MS6	EKG14444.1	114	4	720	EKG14443	236	10
<i>Bipolaris victoriae</i>	FI3	XP_014556920.1	132	4	795	XP_014556947 (gene model adjusted)	237	9
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>		ALQ80805.1	122	7	4107	RKK06767.1	163	3
<i>Macrophomina phaseolina</i>	MS6	EKG22345.1 (gene model adjusted)	94	8		Not found		
<i>Colletotrichum salicis</i>	CBS 607.94	KXH66704.1	125	9	1442	KXH66703.1	205	3
<i>Neofusicoccum parvum</i>	UCRNP2	EOD51800.1	102	4	1143	EOD51796	225	9
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	ND90Pr	XP_007695353.1	121	5	721	XP_007695352	227	9
<i>Setosphaeria turcica</i>	Et28A	XP_008020146.1	121	5	789	XP_008020147	211	7
<i>Colletotrichum fioriniae</i>		XP_007591769.1	125	9	1467	XP_007591768.1	205	3
<i>Neofusicoccum parvum</i>	UCRNP2	EOD50504.1	98	8		Not found		
<i>Fusarium euwallaceae</i>		RTE68176.1	93	7		Not found		
<i>Colletotrichum sidae</i>		TEA13198.1	96	8	3155	TEA13204	295	3
<i>Colletotrichum orchidophilum</i>		XP_022477009.1 (gene model adjusted)	126	8	1431	XP_022477010	203	4
<i>Fusarium avenaceum</i>		KIL83641.1	93	7				
<i>Bipolaris zeicola</i>	26-R-13	XP_007718272.1	132	4	795	XP_007718271	237	9
<i>Venturia nashicola</i>		TLD24697.1	121	7		Not found		
<i>Venturia nashicola</i>		TID16615.1	121	7		Not found		
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i>	HDV247	EXA32374.1	95	8		Not found		

<i>Fusarium kuroshium</i>		RMI89680.1	95	8		Not found		
<i>Colletotrichum trifolii</i>		TDZ48351.1	96	8	2879	TDZ48352	295	3
<i>Fusarium avenaceum</i>		KIL83640 (SIX5-like)	94	8		Not found		
<i>Colletotrichum spinosum</i>		TDZ33147.1	96	8	2785	TDZ32965	295	3
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>		EXK86396.1	95	8		Not found		
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i>		EXL71451.1	95	8		Not found		
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	Fo_A13	RKK68556.1	95	8		Not found		
<i>Penicillium polonicum</i>		OQD62146.1	103	8		Not found		
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>		TXB96223.1	95	8		Not found		
<i>Fusarium euwallaceae</i>		RTE68177 (SIX5-like)	94	8		Not found		
<i>Fusarium kuroshium</i>		RMI89501 (SIX5-like)	94	8		Not found		
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i>	HDV247	EXA32375 (SIX5-like)	94	8		Not found		
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>conglutinans</i>		EXL71450 (SIX5-like)	94	8		Not found		
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>		TXB96075 (gene model adjusted) (SIX5-like)	94	8		Not found		
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>raphani</i>		EXK86395 (SIX5-like)	94	8		Not found		
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	Fo_A13	RKK68557 (SIX5-like)	94	8		Not found		
<i>Macrophomina phaseolina</i>	MS6	EKG22346 (SIX5-like)	95	8		Not found		

^a Cysteine number is calculated on the mature protein, without signal peptide.

^b Prediction using SignalP 3.0 software (*Bendtsen et al.*, 2004).

Table S5. Homologous proteins of AvrLm10B and its paralogues in *L. maculans* 'brassicae', identified in the NCBI nr database

Class	Species	ID	Cysteine number	% identity with AvrLm10B	% similarity with AvrLm10B	Evalue
Sordariomycetes	<i>Colletotrichum salicis</i>	KXH27014.1	1	41%	52%	2e-31
Sordariomycetes	<i>Colletotrichum simmondsii</i>	KXH44035.1	1	38%	53%	2e-30
Sordariomycetes	<i>Colletotrichum fioriniae</i>	EXF85563.1	1	39%	52%	2e-30
Sordariomycetes	<i>Colletotrichum orchidophilum</i>	XP_022480092.1	1	38%	51%	5e-25
Sordariomycetes	<i>Colletotrichum nymphaeae</i>	KXH36921.1	1	37%	50%	2e-24
Dothideomycetes	<i>Setosphaeria turcica</i>	XP_008020185.1	1	29%	49%	2e-18
Dothideomycetes	<i>Bipolaris maydis</i>	XP_014072601.1	1	31%	49%	4e-18
Sordariomycetes	<i>Colletotrichum higginsianum</i>	XP_018163466.1	1	38%	54%	2e-13
Sordariomycetes	<i>Colletotrichum higginsianum</i>	XP_018163101.1	2	26%	35%	5e-04
Dothideomycetes	<i>Leptosphaeria biglobosa</i> 'thlaspii'	Lb_ibcn65_P011644	2	36/92 (39%)	54/92 (58%)	9e-012
Dothideomycetes	<i>Leptosphaeria maculans</i> 'lepidii'	Lm_ibcn84_P000532	2	37%	47%	1e-021

The homologous proteins were identified through a blastp against the NCBI nr database using AvrLm10B, Lmb_jn3_08095, Lmb_jn3_09746, Lmb_jn3_04096 and LemaP017580.1 sequence.

Chapitre II
Caractérisation fonctionnelle
de la famille
AvrLm10A/AvrLm10B

Introduction

AvrLm10A/AvrLm10B, deux gènes d'avirulence de *L. maculans*, nécessaires pour déclencher la reconnaissance par le gène de résistance *Rlm10* de la moutarde noire, ont été précédemment identifiés et caractérisés (Petit-Houdenot *et al.* 2019). *AvrLm10A* et *AvrLm10B* correspondent à deux gènes voisins codant des effecteurs putatifs localisés en orientation inverse et séparés par une grande région intergénique. Dans le chapitre 1, nous avons identifié quatre homologues d'*AvrLm10A* et *AvrLm10B* dans le protéome de *L. maculans* 'brassicae': Lmb_jn3_08094/Lmb_jn3_08095, Lmb_jn3_09745/Lmb_jn3_09746, Lmb_jn3_04095 / Lmb_jn3_04096 et Lmb_jn3_02612/LemaP017580.1. Les gènes codant ces différents homologues présentaient la même organisation génomique qu'*AvrLm10A* et *AvrLm10B*, indiquant l'appartenance de ce couple à une famille multigénique chez *L. maculans*. Ces gènes ont été étudiés pour leur profil d'expression lors de l'infection sur colza, leur conservation dans les populations naturelles de *L. maculans*, mais également pour la présence d'homologues chez d'autres espèces fongiques. Ainsi, nous avons mis en évidence que les gènes formant chaque couple étaient co-régulés, mais qu'ils présentaient des profils d'expression différents, certains étant surexprimés à toutes les étapes biotrophes du cycle infectieux et notamment pendant la phase précoce d'infection sur cotylédons, d'autres étant spécifiquement exprimés lors de la phase tardive de colonisation biotrophe du pétiole et de la tige. Parmi les quatre homologues d'*AvrLm10A/AvrLm10B*, deux couples, Lmb_jn3_08094/Lmb_jn3_08095, Lmb_jn3_09745/Lmb_jn3_09746, présentaient une forte expression lors de l'infection. *AvrLm10A* partage respectivement 40% et 36% d'identité de séquence protéique avec Lmb_jn3_08094 et Lmb_jn3_09745, les trois protéines ayant une taille d'environ 120aa et une même richesse en cystéines (7 cystéines), l'espacement entre ces cystéines étant conservé. *AvrLm10B*, la protéine partenaire d'*AvrLm10A* présente également des homologies de séquence protéique avec Lmb_jn3_08095 et Lmb_jn3_09746 (27% et 24% respectivement), celles-ci étant plus faibles que celles retrouvées entre *AvrLm10A* et ses homologues. En plus des homologues identifiés chez *L. maculans*, nous avons pu montrer que des homologues d'*AvrLm10A* été présents dans plus de trente champignons phytopathogènes de la famille des Dothidomycètes et des Sordariomycètes, avec au total 66 protéines homologues identifiées. *AvrLm10B* est moins conservée chez les autres champignons phytopathogènes, des homologues n'étant retrouvés que chez des Dothidéomycètes. Nous

avons montré qu'AvrLm10A et ses homologues pouvaient être associés à au moins huit familles d'effecteurs, dont la famille AvrLm10B.

Parmi les homologues d'AvrLm10A, on trouve SIX5, une protéine AVR de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) qui partage une identité de séquence protéique de 36% avec AvrLm10A et qui, comme cette dernière, coopère avec un autre effecteur AVR, AVR2, qui n'est pas un homologue d'AvrLm10B. *Fol* est un champignon pathogène responsable de maladies vasculaires destructrices sur un large éventail de plantes. Les protéines effectrices sécrétées dans le xylème (SIX, Secreted In Xylem) représentent des déterminants majeurs de la pathogénie des différentes forma specialis de *F. oxysporum* (Houterman *et al.*, 2007, Schmidt *et al.*, 2013). Actuellement, 14 effecteurs SIX ont été identifiés chez *Fol* et la plupart des gènes codant des effecteurs SIX sont localisés sur un chromosome dispensable qui peut être transféré horizontalement à une souche non pathogène de *F. oxysporum*, ce qui entraîne un transfert de pathogénie (Ma *et al.*, 2010, Vlaardingerbroek *et al.*, 2016). SIX5 et AVR2 (SIX3) sont les deux effecteurs les plus étudiés chez *Fusarium* et partagent des caractéristiques communes avec la famille AvrLm10A / AvrLm10B. En effet, AVR2 et SIX5 sont des gènes voisins, localisés sur le chromosome dispensable de *F. oxysporum*, transcrits de manière divergente sous le contrôle d'un promoteur commun (Ma *et al.*, 2015). Il a été montré que SIX5 et AVR2 interagissaient physiquement et que cette interaction avait lieu au niveau des plasmodesmes, SIX5 assurant le transport de cellule à cellule d'AVR2 (Cao *et al.*, 2018). AVR2 et SIX5 sont tous deux nécessaires pour induire une résistance chez les lignées de tomate contenant le gène de résistance *I-2*, mais sont également impliquées dans l'agressivité du champignon (Houterman *et al.*, 2009 ; Ma *et al.*, 2015 ; Cao *et al.*, 2018). Il a été établi qu'AVR2 favorise la colonisation du champignon en ciblant un mécanisme de défense basal de la plante via la suppression de la PTI, tandis que SIX5 favorise le mouvement de cellule à cellule d'AVR2 (Di *et al.*, 2017 ; Cao *et al.*, 2018). Seule la structure cristalline d'AVR2 a pu être résolue expérimentalement, révélant une structure en sandwich β avec deux feuilletts β antiparallèles (Di *et al.*, 2017), similaire à la structure de l'effecteur ToxA de *Pyrenophora tritici-repentis* et à celle de l'effecteur AvrL567 de *Melampsora lini* (Sarma *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2007). Di *et al.* (2017) ont montré que les résidus impliqués dans la reconnaissance d'AVR2 par *I-2* étaient tous situés sur une boucle externe de la protéine permettant également de dissocier la fonction AVR de l'activité de suppression de la PTI par AVR2. Chez *L. maculans*, Petit-Houdenot *et al.* (2019) ont montré qu'AvrLm10A et AvrLm10B étaient également capables d'interagir physiquement. Dans le chapitre I, j'ai

également pu mettre en évidence une forte interaction physique entre Lmb_jn3_09745 et Lmb_jn3_09746. Il a été montré, par silencing, qu'AvrLm10A (mais pas AvrLm10B) régulait négativement le développement des macules lors de l'infection sur cotylédons de colza (Petit-Houdenot *et al.*, 2019).

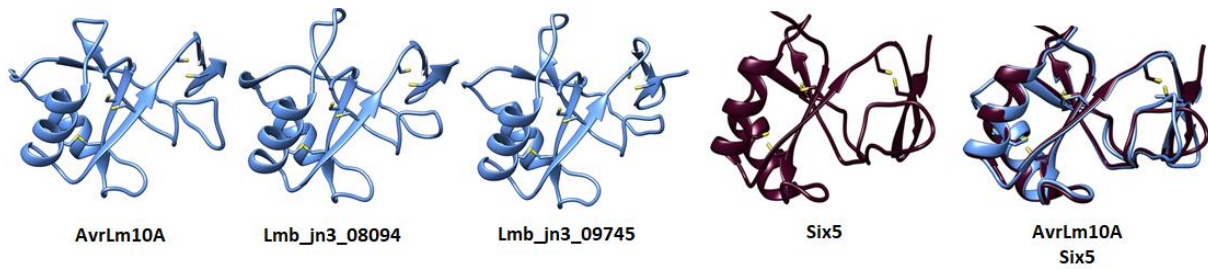
Dans ce chapitre, nous nous sommes inspirés des études menées et des connaissances générées sur le couple SIX5 / AVR2 pour caractériser les trois couples de la famille AvrLm10A /AvrLm10B les plus exprimés lors de l'infection du colza. En effet, les interactions retrouvées entre SIX5 et AVR2, AvrLm10A et AvrLm10B, et Lmb_jn3_09745 et Lmb_jn3_09746 respectivement, suggèrent une conservation de la fonction de transport de cellule à cellule d'un effecteur par son partenaire via les plasmodesmes. Nous avons, donc, dans ce chapitre investigué les différentes protéines effectrice d'un point de vue structural et fonctionnel en étudiant : (i) la conservation de structure entre effecteurs par des prédiction à l'aide d'Alphafold, (ii) la localisation des différents couples au niveau des plasmodesmes, (iii) la capacité des homologues d'AvrLm10A à transporter leurs protéines partenaires ainsi qu'AVR2 de cellule à cellule (iv) la capacité des différentes protéines à supprimer la mort cellulaire et notamment la PTI et (v) l'implication des différentes protéines dans la pathogénie de *L. maculans*.

Pour mener à bien ce travail, certaines parties de ce chapitre ont fait objet d'une collaboration avec l'équipe de F. Takken au sein du groupe 'Molecular Plant Pathology' du Swammerdam Institute for Life Sciences (Université d'Amsterdam, Pays-Bas). Ainsi, j'ai intégré des résultats obtenus par Mila C. Blekemolen, doctorante de F. Takken, concernant le transport de cellule à cellule d'AVR2 par les effecteurs de *L. maculans*, ainsi que des résultats de tests de suppression de PTI par les membres de la famille AvrLm10 obtenus lors de mon séjour à l'université d'Amsterdam en mars 2020.

Résultats

1. Les homologues d'AvrLm10A et Six5 présentent de fortes analogies structurales

Nous avons prédit la structure 3D d'AvrLm10A, Lmb_jn3_08094 et Lmb_jn3_09745, ainsi que celle de leur homologue chez *F. oxysporum* SIX5, sans leur peptide signal, afin de déterminer si ce sont des analogues structuraux. La prédiction de structure 3D via Alphafold a permis de prédire des modèles structuraux fiables présentant la même organisation structurale (Figure 27). Cette prédiction révèle une structure constituée de cinq feuillets β et de deux hélices α , ainsi que la présence de 3 ponts disulfures bien conservés entre les différentes structures. L'alignement basé sur la structure montre plusieurs motifs conservés entre AvrLm10A et SIX5 dont les six cystéines formant des ponts disulfure (Figure 27).



RMSD: ca	1	11	21	31	41		
AvrLm10A_1.pdb, chain A	1	D L H D F C A C Q Y	G T N S R V D M A A	T A L V A F N C G N	P Y T F A Q A K D Q	F W I G R H S G P G	
Lmb_jn3_08094_1.pdb, chain A	1	D K H H Y C A C V T	R K G G P I N V P A	T L K I N R E C S N	A L V L A Q D N G Q	Y W Y G G H T P G	
RMSD: ca	51	P R F Q G A F L K A	..E T G R I D G D	K F H N A C L E D S	G G A S T C F N C G	S T Q E N T D G S I	
Lmb_jn3_08094_1.pdb, chain A	50	P R H A G I F L S L	P D K S K R L D G D	Y M H N L C K A A G	A P D S A C F N C D	F Y Q E D E D G G I	
RMSD: ca	99	T C L .					
Lmb_jn3_08094_1.pdb, chain A	100	L C Q R					
RMSD: ca	1	D L H D F C A C Q Y	G T N S R V D M A A	T A L V A F N C G N	P Y T F A Q A K D Q	F W I G R H S G P G	
AvrLm10A_1.pdb, chain A	1	D L H D F C A C Q Y	G T N S R V D M A A	T A L V A F N C G N	P Y T F A Q A K D Q	F W I G R H S G P G	
Lmb_jn3_09745_1.pdb, chain A	1	D M H Q Y C A C Q R	I R A G P I H T T A	T L A I A K Q C N N	K F V L A Q S N D H	T W V I K H T P G	
RMSD: ca	51	P R F Q G A F L K A	E T G . . R I D G D	K F H N A C L E D S	G G A S T C F N C I	G S I Q E N T D G S	
AvrLm10A_1.pdb, chain A	51	P R F Q G A F L K A	E T G . . R I D G D	K F H N A C L E D S	G G A S T C F N C I	G S I Q E N T D G S	
Lmb_jn3_09745_1.pdb, chain A	49	P N W P G I Y L S L	K S K A I E I D G D Y	F H S L C I S A G	A A A S T C F N C K	N A P Q I S E F G G I	
RMSD: ca	98	T C L .					
AvrLm10A_1.pdb, chain A	99	I M C W S					
Lmb_jn3_09745_1.pdb, chain A	99	I M C W S					
RMSD: ca	1	D K H H Y C A C V T	R K G G P I N V P A	T L K I N R E C S N	A L V L A Q D N G Q	Y W Y G G H T P G P	
Lmb_jn3_08094_1.pdb, chain A	1	D M H Q Y C A C Q R	I R A G P I H T T A	T L A I A K Q C N N	K F V L A Q S N D H	T W V I K H T P G P	
RMSD: ca	51	R H A G I F L S L P	D K S K R L D G D Y	M H N L C K A A G A	P D S A C F N C I	D F Y Q E D E D G G I	
Lmb_jn3_08094_1.pdb, chain A	51	R H A G I F L S L P	D K S K R L D G D Y	M H N L C K A A G A	P D S A C F N C I	D F Y Q E D E D G G I	
Lmb_jn3_09745_1.pdb, chain A	50	N W P G I Y L S L K	S K A I E I D G D Y	F H S L C I S A G	A A S T C F N C K N	A P Q I S E F G G I	
RMSD: ca	100	L C Q R					
Lmb_jn3_08094_1.pdb, chain A	100	L C Q R					
Lmb_jn3_09745_1.pdb, chain A	100	M C W S					
RMSD: ca	1	D L	H D F C A C Q Y G T	N S R V D M A A T A	L V A F N C G N P Y
AvrLm10A_1.pdb, chain A	1	D L	H D F C A C Q Y G T	N S R V D M A A T A	L V A F N C G N P Y
Six5_1.pdb, chain A	1	M R F E Y I S V L A	L C G A S L A R D		H O Y C A C Q S G S	G D S I D I D A T T	Q L Q N D N S K S Y
RMSD: ca	51	T F A Q A K D Q F W	I G R H S G P G P R	F Q G A F L K A E T	G R I D G D K F H N	A C L E D S G G A S	
AvrLm10A_1.pdb, chain A	33	T F A Q A K D Q F W	I G R H S G P G P R	F Q G A F L K A E T	G R I D G D K F H N	A C L E D S G G A S	
Six5_1.pdb, chain A	50	L W A Q T S P A Y W	F A D R H K P G P R	F A G I Y L K A A N	G K I D G D T F Y N	L C I N N G G A D S	
RMSD: ca	83	T C F N C G S I Q E	N T D G S I I C L .				
AvrLm10A_1.pdb, chain A	83	T C F N C G S I Q E	N T D G S I I C L .				
Six5_1.pdb, chain A	100	T C F D C S K S H Q	V R N I V I Y C D A	A			

Figure 27. Prédiction de la structure 3D d'AvrLm10A, Lmb_jn3_08094, Lmb_jn3_09745 et SIX5 et alignement de leurs séquences protéiques basé sur leurs structures.

(A) Les prédictions de structure 3D effectuées en utilisant AlphaFold (Mirdita *et al.*, 2022).
 (B) Alignement multiple des séquences protéiques basé sur leurs structures en utilisant logiciel Jalview.

AvrLm10B, la protéine partenaire d'AvrLm10A présente également des homologies de séquence protéique avec Lmb_jn3_08095 et Lmb_jn3_0974 (27% et 24% respectivement), celles-ci étant plus faibles que celles retrouvées entre AvrLm10A et ses homologues. De plus,

les analyses réalisées dans le chapitre précédent ont révélé qu'AvrLm10B était moins conservée chez les autres champignons phytopathogènes, des homologues n'étant retrouvés que chez des Dothidéomycètes et quelques Sordariomycetes du genre *Colletotrichum*, et aucune homologie de séquence n'étant retrouvée avec AVR2, la protéine AVR partenaire de SIX5 chez *F. oxysporum*. La structure 3D d'AVR2 avait été résolue par cristallographie (Di *et al.*, 2017) montrant une analogie structurale avec la protéine ToxA de *P. tritici-repentis* et une organisation en sandwich β faite de deux feuillets β . Afin de déterminer si, malgré leur absence d'homologie de séquence, AVR2, AvrLm10B, Lmb_jn3_08095 et Lmb_jn3_09746 présentaient une organisation structurale commune, nous avons prédit la structure 3D des protéines de *L. maculans* à l'aide d'AlphaFold. Les trois protéines prédites présentent un repliement en sandwich β qui semble être similaire à celui observé pour AVR2 (Figure 28A). Cependant les différentes structures étaient difficiles à superposer. Ayant observé que la partie N terminale de ces protéines était désordonnée et pouvait potentiellement contenir un pro-domaine, nous avons décidé d'éliminer des acides aminés en partie N terminale des différentes protéines. Ainsi, nous avons prédit la structure 3D d'AvrLm10B⁽⁴⁰⁻¹⁶⁴⁾, Lmb_jn3_08095⁽⁵⁶⁻¹⁵⁵⁾ et Lmb_jn3_09746⁽⁴²⁻¹⁵⁰⁾. Les protéines tronquées présentaient une meilleure qualité de prédiction tout en conservant un même repliement en sandwich β (Figure 28A). De plus, nous avons ainsi obtenu une meilleure superposition entre AvrLm10B⁽⁴⁰⁻¹⁶⁴⁾ et Avr2 comparée à celle avec AvrLm10B non tronquée (Figure 28B). Néanmoins, l'alignement des deux protéines basé sur la structure montre qu'il y a peu de motifs conservés. Ces protéines ne présentant qu'une seule cystéine dans leur séquence, cela pourrait ajouter de la flexibilité à leur organisation structurale.

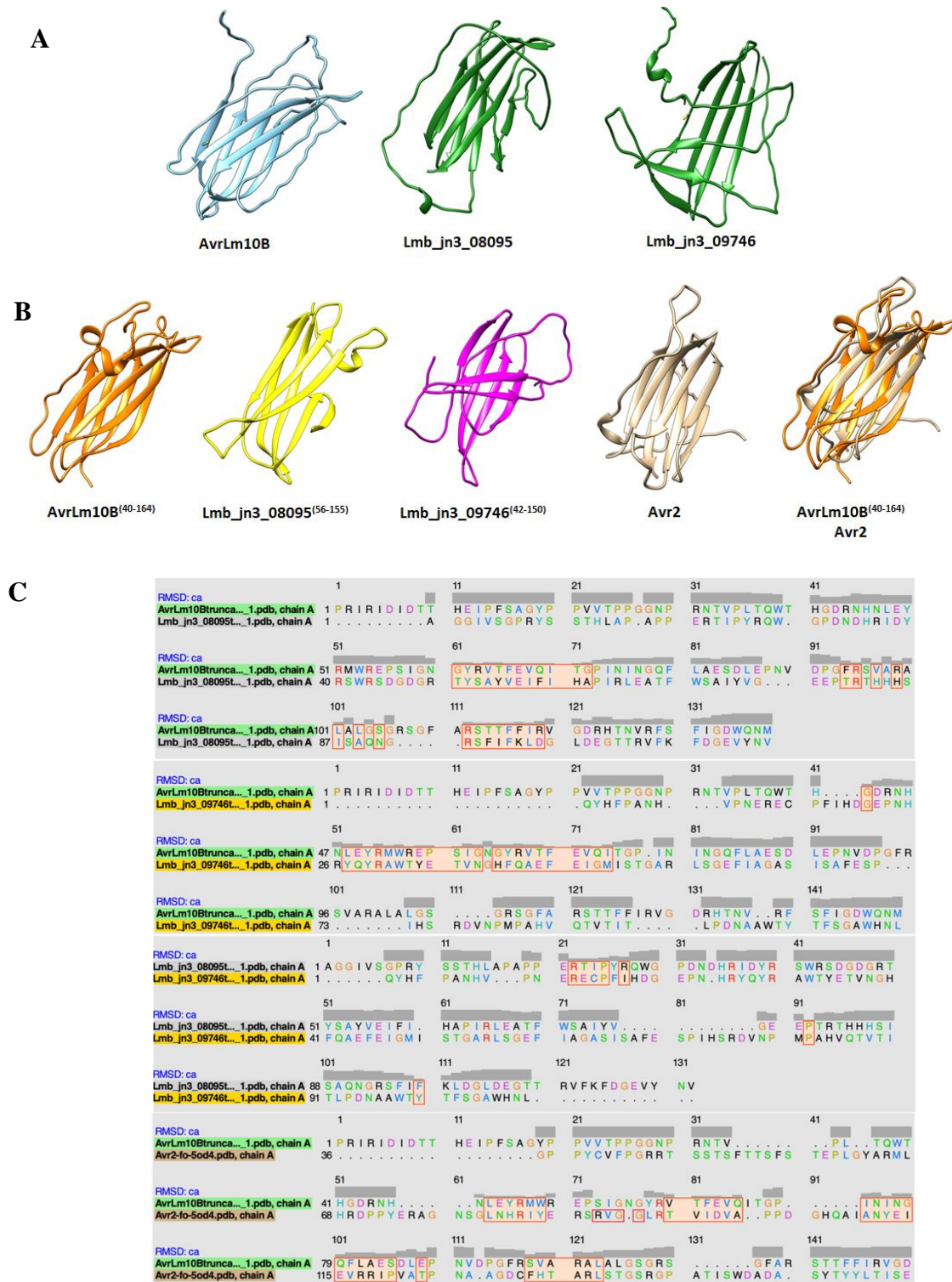


Figure 28. Prédiction de la structure 3D d'AvrLm10B, Lmb_jn3_08095 et Lmb_jn3_09746 et comparaison avec la structure d'Avr2.

(A) Les prédictions de structure 3D des protéines entières d'AvrLm10B, Lmb_jn3_08095 et Lmb_jn3_09746 . (B) Les prédictions de structure 3D des protéines tronquées (AvrLm10B⁽⁴⁰⁻¹⁶⁴⁾, Lmb_jn3_08095⁽⁵⁶⁻¹⁵⁵⁾ et Lmb_jn3_09746⁽⁴²⁻¹⁵⁰⁾) et superposition des structures 3D d'AvrLm10B⁽⁵¹⁻¹⁶⁴⁾ et Avr2 (structure cristalline déterminée par Di *et al.*, 2017). Les prédictions ont été réalisées en utilisant AlphaFold (Mirdita *et al.*, 2022). (C) Alignement multiple des séquences protéiques basé sur leurs structures en utilisant logiciel Jalview.

2. AvrLm10A et Lmb_jn3_09745 permettent le transport de leur partenaire de cellule à cellule

.Nous avons tout d'abord déterminé si AvrLm10A, Lmb_jn3_09745 et Lmb_jn3_08094 co-localisaient avec leur protéine partenaire au niveau des plasmodesmes puis nous avons testé leur capacité à les transporter de cellule à cellule.

Afin de visualiser la présence des protéines formant les différents couples au niveau des plasmodesmes, les deux protéines partenaires ont été co-exprimées transitoirement dans *N. benthamiana* (AvrLm10A et Lmb_jn3_09745 étant fusionnées à la GFP, leur protéine partenaire n'étant pas fusionné à un fluorochrome), en présence d'une protéine végétale localisée au niveau des plasmodesmes, PDCB1, fusionnée à la mcherry. La co-expression des protéines formant les couples AvrLm10A/AvrLm10B et Lmb_jn3_09745/ Lmb_jn3_09746 permet d'observer des spots de GFP au niveau de la membrane plasmique co-localisant avec la protéine PDCB1 marquée à la mCherry, suggérant une localisation de ces deux couples au niveau des plasmodesmes. Cependant, beaucoup plus de points co-localisant au niveau des plasmodesmes ont été retrouvés pour le couple Lmb_jn3_09745/ Lmb_jn3_09746 que pour le couple AvrLm10A/AvrLm10B. De plus, pour AvrLm10A / AvrLm10B, une localisation au niveau des plasmodesmes n'est observée qu'au bout de 72h post-infiltration, contre 48h post-infiltration pour Lmb_jn3_09745/ Lmb_jn3_09746 (Figure 29). Ce résultat suggère que les protéines AvrLm10A, AvrLm10B, Lmb_jn3_09745 et Lmb_jn3_09746 s'accumulent au niveau des plasmodesmes avant d'être transportées vers les cellules voisines.

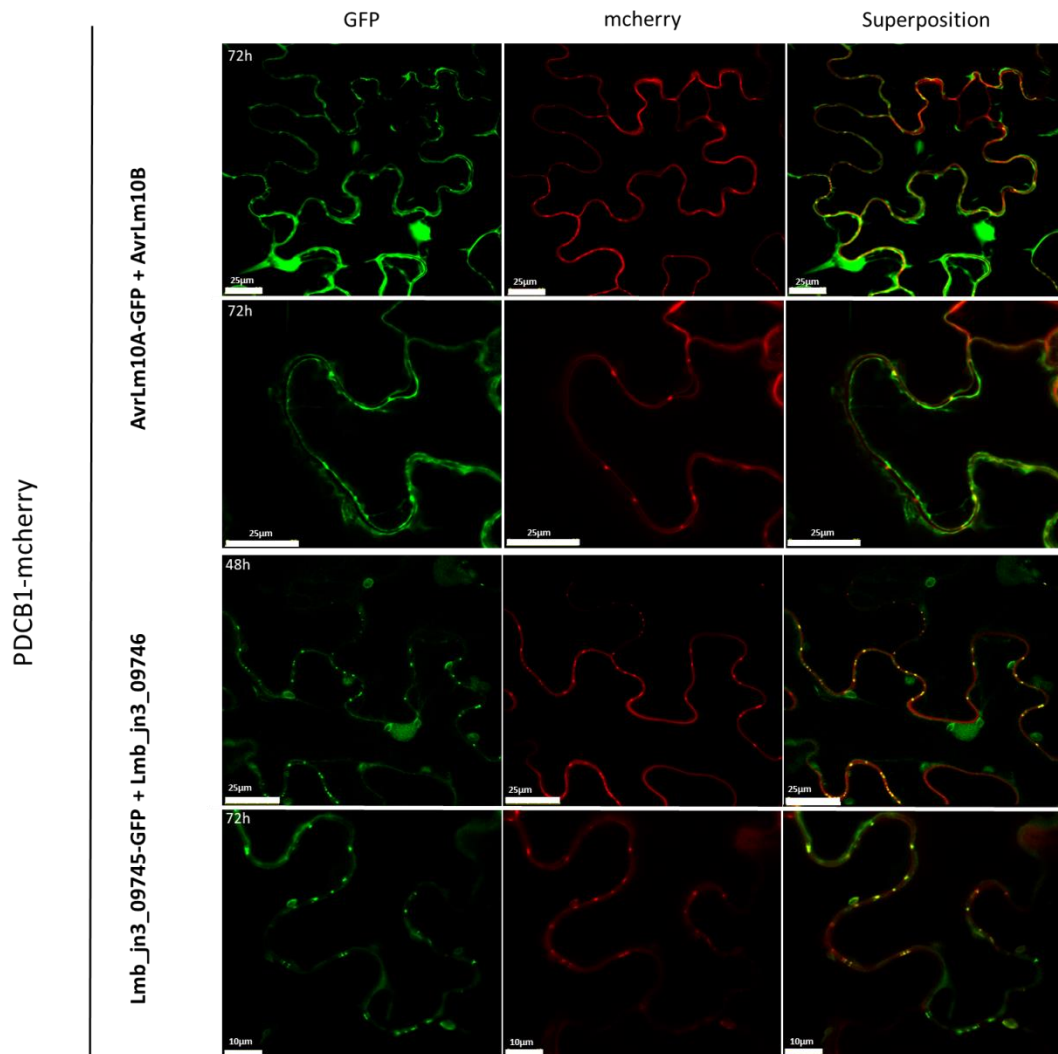


Figure 29. AvrLm10A et AvrLm10B ainsi que Lmb_jn3_09745 et Lmb_jn3_09746 co-localisent au niveau des plasmodesmes.

Images obtenues par microscopie confocale de feuilles de *N. benthamiana* agro-infiltrées avec des constructions permettant l'expression d'AvrLm10A-GFP et AvrLm10B, ou celle de Lmb_jn3_09745-GFP et Lmb_jn3_09746, co-exprimées avec une protéine végétale associée aux plasmodesmes, PDCB1 fusionnée à la mCherry. Les observations ont été faites à 48h et 72h après infiltration.

Afin de visualiser directement le mouvement intercellulaire d'AvrLm10B, Lmb_jn3_09746 et Lmb_jn3_08095, nous avons utilisé un vecteur binaire portant des gènes codant à la fois pour AvrLm10B-GFP, Lmb_jn3_09746-GFP ou Lmb_jn3_08095-GFP et une protéine associée au

réticulum endoplasmique (RE), non mobile, HDEL fusionnée à la mCherry (mCherry-HDEL), pour réaliser une expression transitoire dans *N. benthamiana* à l'aide d'*A. tumefaciens*. Nous avons pour cela utilisé le protocole développé par Blekemolen *et al.* (2018). Cette expérience nécessite d'obtenir une transformation des cellules de tabac en mosaïque, afin de pouvoir visualiser le mouvement de protéines vers des cellules non transformées. Afin d'obtenir une expression en mosaïque, de faibles DO ont été utilisées (0,1, 0,05 ou 0,01). La protéine mCherry-HDEL localisée dans le RE a servi de marqueur de la transformation cellulaire car la protéine est incapable d'être transportée vers les cellules voisines non transformées. Les cofiltrations de AvrLm10B-GFP/mCherry-HDEL, Lmb_jn3_08095-GFP/mCherry-HDEL et Lmb_jn3_09746-GFP/mCherry-HDEL ont été réalisées en présence ou en l'absence de leur protéines partenaires AvrLm10A, Lmb_jn3_08094 et Lmb_jn3_09745. Nous avons ensuite observé le transport des protéines AvrLm10B-GFP, Lmb_jn3_08095-GFP et Lmb_jn3_09746-GFP depuis des cellules transformées vers les cellules voisines non transformées (Figure 30).

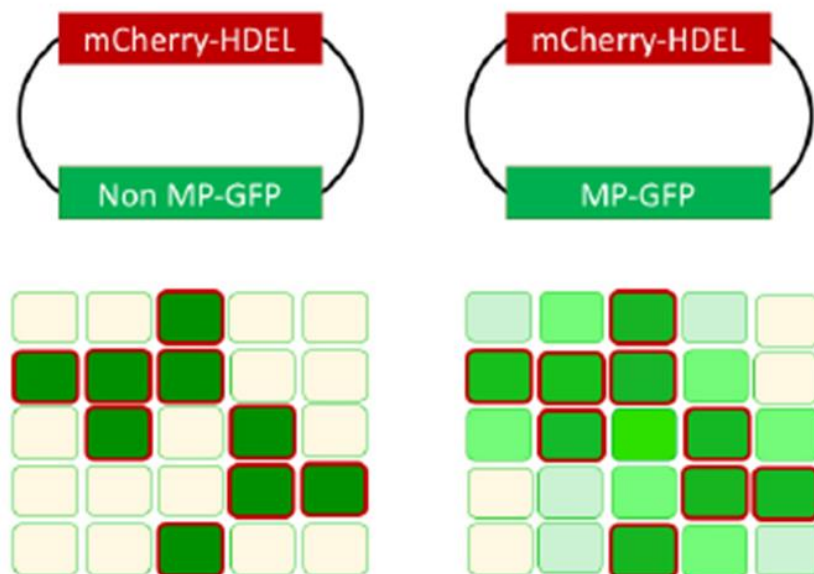


Figure 31. Transformation transitoire médiée par *Agrobacterium* de plusieurs cellules dans un modèle de type mosaïque.

Dans le cas d'une protéine non mobile, les cellules transformées sont marquées à la fois en rouge (mCherry HDEL) et en vert (Non-MP-GFP), et entourent des cellules non transformées non fluorescentes (gauche). Une protéine mobile (MP-GFP) sera transloquée des cellules transformées (mCherry-HDEL et MP-GFP) vers les cellules voisines non transformées, ce qui entraîne une augmentation du signal GFP dans ces cellules (à droite). L'intensité de ce signal GFP dans les cellules non transformées varie en fonction de la quantité de cellules transformées voisines (D'après Blekemolen *et al.*, 2018).

En l'absence d'AvrLm10A, Lmb_jn3_08094 ou Lmb_jn3_09745 (remplacées par la protéine effectrice LmStee98 qui n'interagit pas avec AvrLm10B, Lmb_jn3_08095 et Lmb_jn3_09746), les cellules transformées montraient un signal mCherry localisé dans le RE à la périphérie de la cellule et un signal GFP dans le cytoplasme et le noyau de ces mêmes cellules (Figure 31) alors que les cellules adjacentes non transformées ne présentaient pas de fluorescence (à l'exception d'une seule cellule pour Lmb_jn3_09746 ; Tableau 2). En présence d'AvrLm10A et de Lmb_jn3_09745, des cellules non transformées montraient une fluorescence verte nucléaire et cytoplasmique, mais aucune fluorescence rouge (Figure 31 ; Tableau 2). Cette observation suggère la translocation par AvrLm10A et Lmb_jn3_09745 de leurs protéines partenaires respectives des cellules transformées aux cellules adjacentes non transformées, alors que Lmb_jn3_08094 ne transporterait pas sa protéine partenaire. Il est intéressant de noter qu'un plus grand nombre d'événements de transport a été relevé pour couple Lmb_jn3_09745/Lmb_jn3_09746.

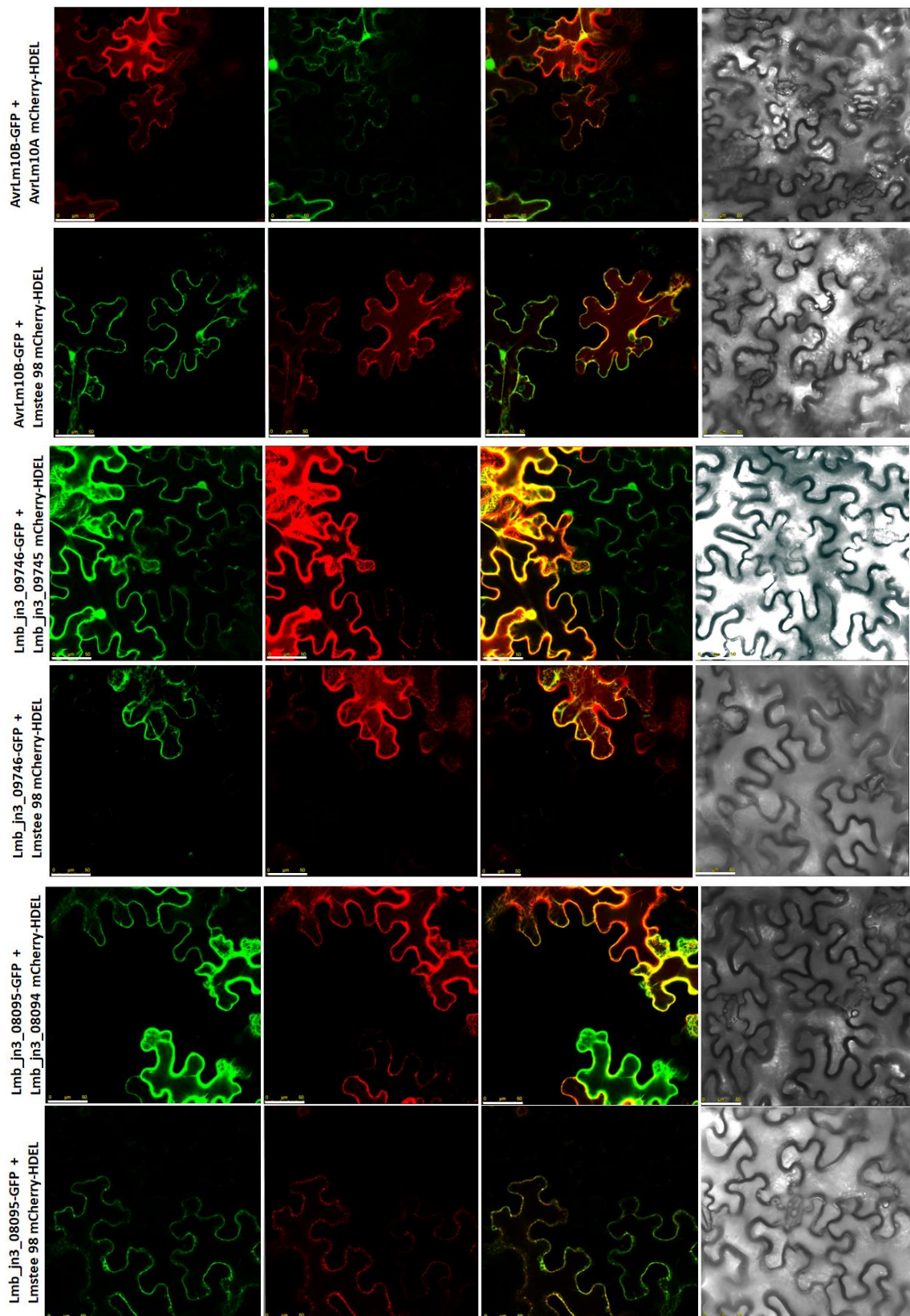


Figure 32. AvrLm10A et Lmb_jn3_09745 sont capables de transporter leurs partenaires de cellule à cellule dans *N. benthamiana*.

Images obtenues par microscopie confocale de feuilles de *N. benthamiana* agro-infiltrées avec des constructions permettant la co-expression d'AvrLm10B-GFP, Lmb_jn3_09746-GFP ou Lmb_jn3_08095-GFP avec la protéine mCherry-HDEL ainsi que des constructions permettant

l'expression d'AvrLm10A, Lmb_jn3_08094, Lmb_jn3_09745 ou Lmstee98 (un effecteur de *L. maculans* n'interagissant pas avec AvrLm10B, Lmb_jn3_09746 et Lmb_jn3_08095 ; Talbi *et al.*, en prep). Les observations ont été faites à 48h après infiltration. Deux répétitions (une seule pour Lmb_jn3_09745/Lmb_jn3_09746) ont été réalisées.

Tableau 2. Comptage des événements de transport de cellule à cellule.

	AvrLm10A / AvrLm10B- GFP	Lmstee 98 / AvrLm10B- GFP	Lmb_jn3_08094 / Lmb_jn3_08095- GFP	Lmstee 98 / Lmb_jn3_08095- GFP	Lmb_jn3_09745 / Lmb_jn3_09746- GFP	Lmstee 98 / Lmb_jn3_09746- GFP
Nombre de mosaïques observées	16	10	12	8	14	7
Événement de transport	2	0	0	0	9	1
Absence de transport	12	10	11	7	0	3
Transport potentiel	2	0	1	1	3	2

3. AvrLm10A et ses homologues chez *L. maculans* sont capables de transporter AVR2 de *F. oxysporum* de cellule à cellule.

Après avoir observé qu'AvrLm10A et Lmb_jn3_09745 étaient capables de transporter leur partenaire de cellule à cellule, nous avons décidé de tester leur capacité à transporter également l'effecteur AVR2 de *F. oxysporum* dans *N. benthamiana*. Pour cela, deux approches ont été utilisées. Une première approche de transformation en mosaïque telle que celle décrite dans le paragraphe précédent a été utilisée pour déterminer la capacité d'AvrLm10A à transporter AVR2. Ainsi, nous avons utilisé une construction permettant l'expression de la protéine HDEL fusionnée à la mCherry et Avr2fusionnée à la GFP ainsi qu'une construction permettant l'expression d'AvrLm10A (ou SIX5 en tant que témoins positifs). Des souches d'Agrobactéries exprimant ces constructions ont été co-infiltrées dans des feuilles de *N. benthamiana*. Que ce soit en présence de SIX5 ou d'AvrLm10A, nous avons observé des cellules non transformées montrant une fluorescence verte nucléaire et cytoplasmique, mais aucune fluorescence rouge (Figure 32A).

Une deuxième approche a également été utilisée pour tester la capacité d'AvrLm10A, Lmb_jn3_09745 et Lmb_jn3_08094 à transporter AVR2. Cette fois, un vecteur exprimant à la fois en excès la GFP et la protéine HDEL fusionnée à la mCherry (2XGFP+ mCherry-HDEL) et un vecteur exprimant AVR2 (35S:DspAVR2) ont été coinfiltrés en présence ou non d'AvrLm10A, Lmb_jn3_09745 ou Lmb_jn3_08094, SIX5 étant utilisé comme témoin positif. Lors de l'infiltration, une frontière entre les cellules transformées et non transformées se crée. En présence d'une protéine capable de transporter AVR2, le transport d'AVR2 dans les cellules voisines non transformées permet l'ouverture des plasmodesmes et ainsi le passage de

la GFP présente en excès dans les cellules transformées. Les événements de transport sont quantifiés en estimant le nombre de cellules présentant uniquement une fluorescence verte. Nous avons ainsi observé qu'en plus de transporter leurs protéines partenaires, AvrLm10A et Lmb_jn3_09745 sont aussi capables de transporter AVR2 de cellule à cellule. Bien qu'incapable d'interagir, ni de transporter sa protéine partenaire, Lmb_jn3_08094 serait également capable de transporter AVR2 (Figure 32B)

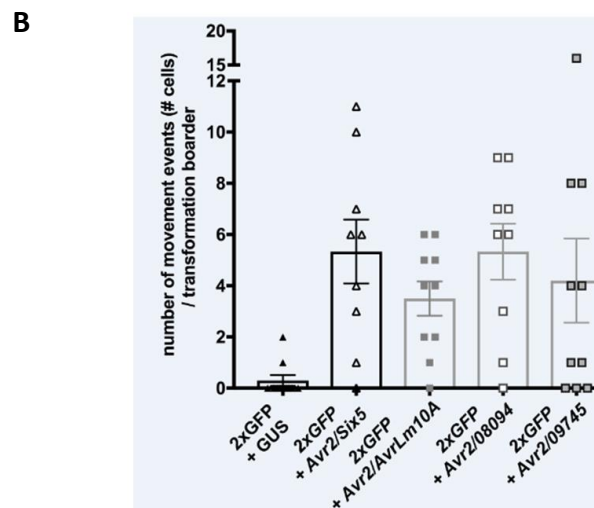
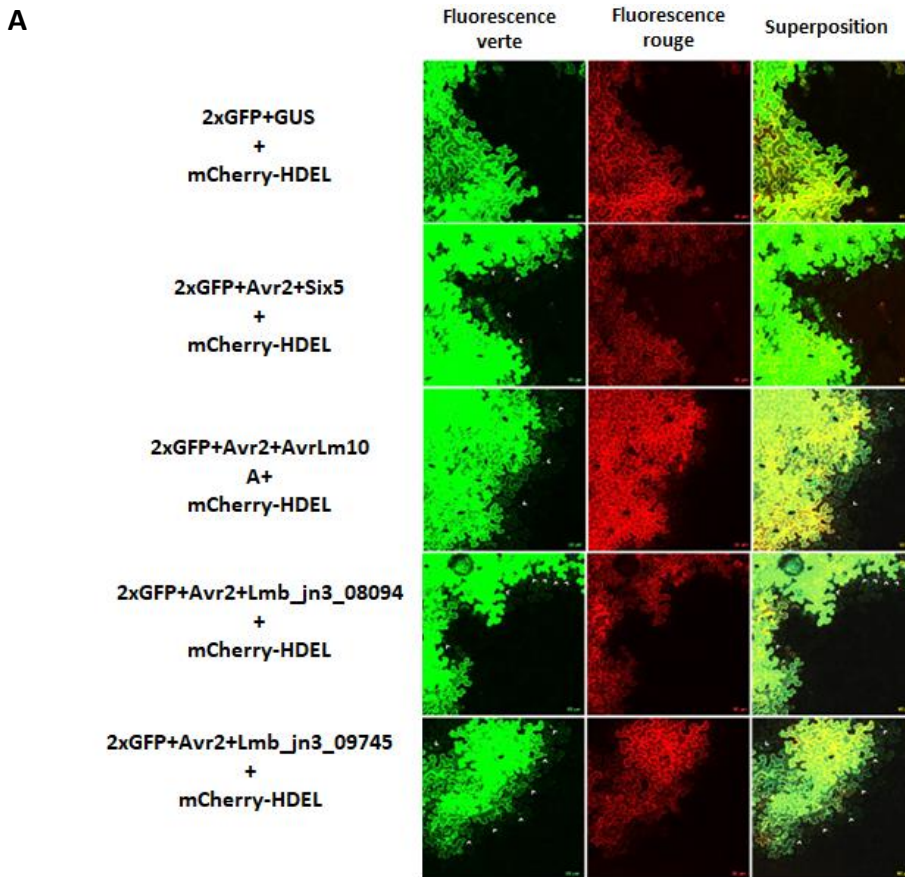


Figure 33. AvrLm10A, Lmb_jn3_09745 et Lmb_jn3_08094 sont capables de transporter AVR2 de cellule à cellule dans *N. benthamiana*.

(A) Images obtenues par microscopie confocale de feuilles de *N. benthamiana* agro-infiltrées avec des constructions permettant la co-expression de la protéine mCherry-HDEL avec une double GFP, ainsi qu'AvrLm10A ou SIX5 et AVR2. Les observations ont été faites à 48h après infiltration. (B) Comptage du nombre de mouvements de cellule à cellule observés lors de la co-expression de mCherry-HDEL, 2xGFP et AVR2 en présence de SIX5, AvrLm10A, Lmb_jn3_09745 ou Lmb_jn3_08094. Les mouvements de cellule à cellule sont comptés au niveau de chaque bordure de transformation.

4. **Lmb_jn3_08094/Lmb_jn3_08095** et **Lmb_jn3_09745/Lmb_jn3_09746** **suppriment la mort cellulaire induite par BAX**

Petit-Houdenot *et al.* (2019) ont montré qu'AvrLm10A avec son peptide signal était capable de supprimer la mort cellulaire provoquée sur *N. benthamiana* par les 3 inducteurs de mort cellulaire : BAX (un facteur pro-apoptotique murin, inducteur général de mort cellulaire), NEP1 (un effecteur nécrotique de *C. higginsianum*, inducteur général de mort cellulaire) et AvrPto (un effecteur de *P. syringae* reconnu par un gène de résistance de *N. benthamiana*, marqueur de l'ETI). De plus, la mort cellulaire provoquée par AvrPto était également supprimée par AvrLm10B lorsqu'il était exprimé avec son peptide signal, et par la co-expression d'AvrLm10A et AvrLm10B avec ou sans leur peptide signal. Nous avons testé si les couples Lmb_jn3_08094 / Lmb_jn3_08095 et Lmb_jn3_09745/Lmb_jn3_09746 avaient également la capacité de supprimer la mort cellulaire induite sur feuilles de *N. benthamiana*. Pour cela, nous avons exprimé Lmb_jn3_08094, Lmb_jn3_08095, Lmb_jn3_09745 et Lmb_jn3_09746 seules ou en couple sans leur peptide signal chez *N. benthamiana* à l'aide d'*A. tumefaciens*. 24h après l'expression des différents effecteurs, BAX a été exprimé à son tour dans les feuilles de *N. benthamiana*, une souche d'*A. tumefaciens* transformée avec un vecteur vide étant utilisée comme contrôle. Une suppression de la mort cellulaire se traduit par l'absence de taches nécrotiques normalement induites par BAX. Une échelle qualitative permettant de quantifier la sévérité des symptômes a été utilisée (Figure 33A). Les nécroses ont été observées deux semaines après l'agro-infiltration (Figure 33B). L'ensemble des protéines testées (Lmb_jn3_08094, Lmb_jn3_08095, Lmb_jn3_09745 et Lmb_jn3_09746 sans leur peptide signal), seules ou en couples, suppriment significativement la mort cellulaire induite par BAX (Figure 33C ; différence significative au seuil de 0.001% ; p-value : 2.87E-18).

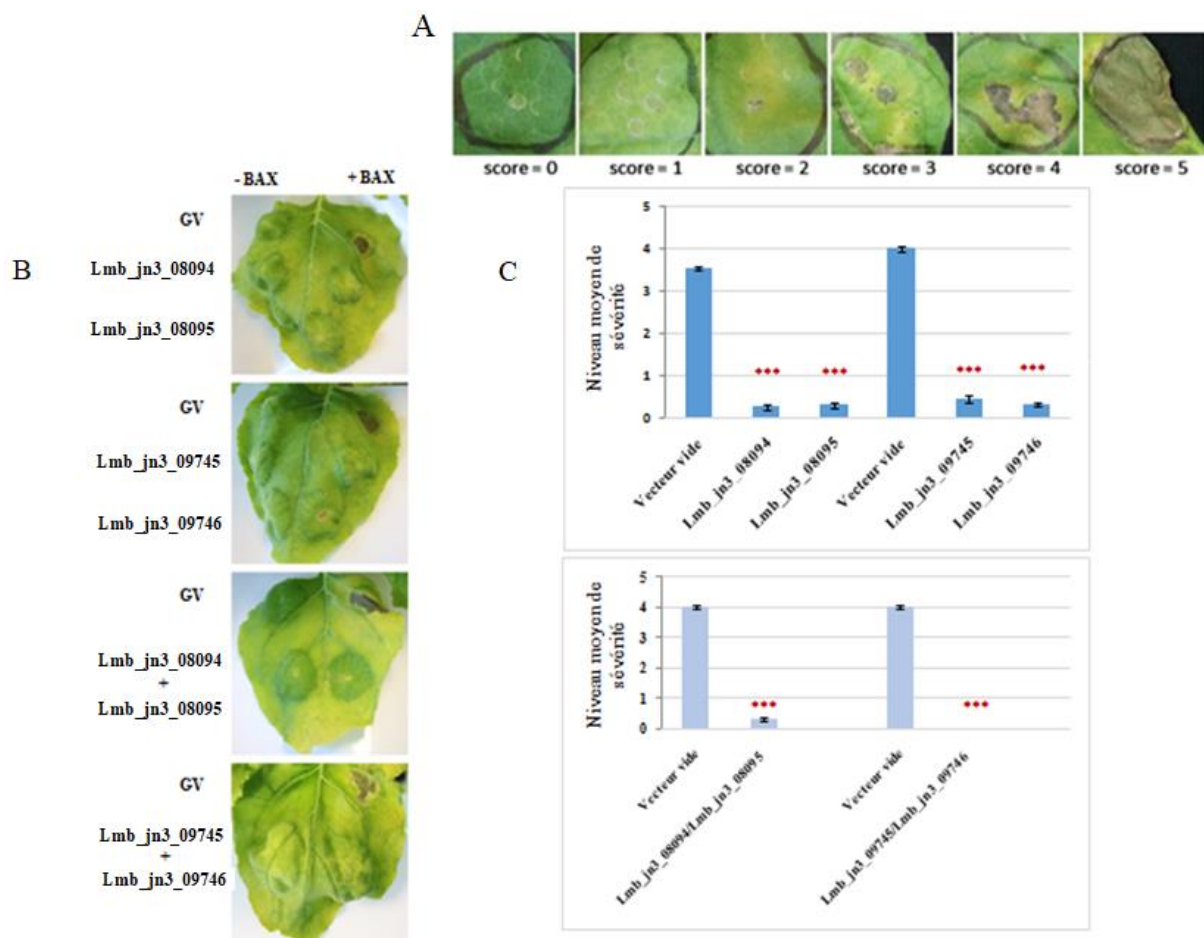


Figure 34. Suppression de la mort cellulaire induite par BAX chez *Nicotiana benthamiana* par Lmb_jn3_08094, Lmb_jn3_08095, Lmb_jn3_09745, Lmb_jn3_09746.

Des feuilles de *N. benthamiana* ont été infiltrées par *Agrobacterium tumefaciens* transformée avec un vecteur vide dans le cas du contrôle négatif (GV3101 exprimant le vecteur vide pMP90) ou avec les gènes Lmb_jn3_08094, Lmb_jn3_08095, Lmb_jn3_09745 ou Lmb_jn3_09746 sans leur peptide signal. Les différents gènes ont été exprimés seules dans *N. benthamiana* ou coexprimés en réalisant une coinfiltration des deux agrobactéries portant les gènes correspondant à un couple. 24 h après l'infiltration, les mêmes feuilles ont été infiltrées par *A. tumefaciens* exprimant le gène *BAX* de souris pour induire la mort cellulaire. **(A)** Échelle d'évaluation des symptômes. La notation a été faite en utilisant l'échelle suivante: 0: aucun symptôme visible, 1: décoloration de la zone d'infiltration, 2: chlorose, 3: petites taches nécrotiques, 4: nécrose étendue sur moins de 50% de la zone d'infiltration, 5: nécrose sur plus de 50% de la zone d'infiltration. **(B)** Photos des feuilles 20 jours après infiltration **(C)** Scores moyens des tests de suppression de la mort cellulaire provoquée par BAX. Les étoiles indiquent des différences significatives par rapport au phénotype obtenu après expression de *BAX* et d'un vecteur vide n'exprimant pas d'effecteur (Test de Kruskal-wallis: ***: p-value <0,001). Les résultats correspondent à deux répétitions biologiques et 6 répétitions techniques.

5. Lmb_jn3_08094, Lmb_jn3_08095, Lmb_jn3_09745, Lmb_jn3_09746 sont capables de supprimer la PTI mais pas AvrLm10A/AvrLm10B.

Il a été montré qu'AVR2 de *F.oxysporum* était capable de supprimer la PTI induite par la flagelline et la chitine, ainsi que la production de ROS et le dépôt de callose chez *A. thaliana* et *N. benthamiana* (Di *et al.*, 2017). Nous avons donc testé la capacité des membres de la famille AvrLm10 à supprimer l'induction de ROS déclenchée par la présence de flg22 (un dérivé de 22 acides aminés de la flagelline bactérienne ; Felix *et al.*, 1999) permettant d'évaluer, de manière quantitative, la capacité à supprimer la PTI. *AvrLm10A*, *AvrLm10B*, *Lmb_jn3_08094*, *Lmb_jn3_08095*, *Lmb_jn3_0974* et *Lmb_jn3_09746*) ont été exprimés de façon transitoire dans *N. benthamiana*. 48h après infiltration de ces effecteurs étudiés, la PTI a été induite par traitement à la flg22 et la capacité de supprimer la PTI a été évaluée en mesurant le peroxyde d'hydrogène, une espèce réactive de l'oxygène induite lors de la PTI, par chimioluminescence. Ainsi, les feuilles de *N. benthamiana* infiltrées avec des agrobactéries contenant un vecteur vide ont répondu à flg22 par une production rapide de ROS. Nous avons utilisé comme contrôle positif Avr2, qui inhibe diverses réponses de PTI induites par flg22 (Di *et al.*, 2017), ainsi qu'un effecteur candidat récemment identifié chez *F. oxysporum* comme étant capable de réduire presque totalement les réponses induites lors de la PTI (Foa2 ; Tintor *et al.*, 2020). Nous avons observé que *Lmb_jn3_08095* est capable de très fortement supprimer la PTI tout comme Foa2, alors que *Lmb_jn3_08094*, *Lmb_jn3_09745* et *Lmb_jn3_09746* sont capables de supprimer la PTI de façon moins importante mais équivalente à AVR2. Quant à *AvrLm10A* et *AvrLm10B*, ils ne sont pas capables de supprimer la PTI induite par flg22 dans les conditions testées (Figure 34).

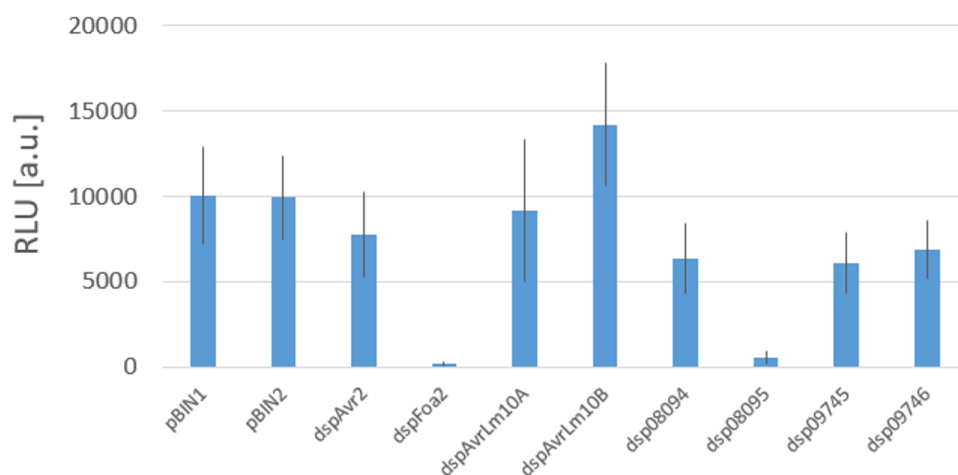


Figure 35. Niveau relatif des ROS produites suite à un traitement par flg22 dans des feuilles de *N. benthamiana* exprimant différents effecteurs candidats.

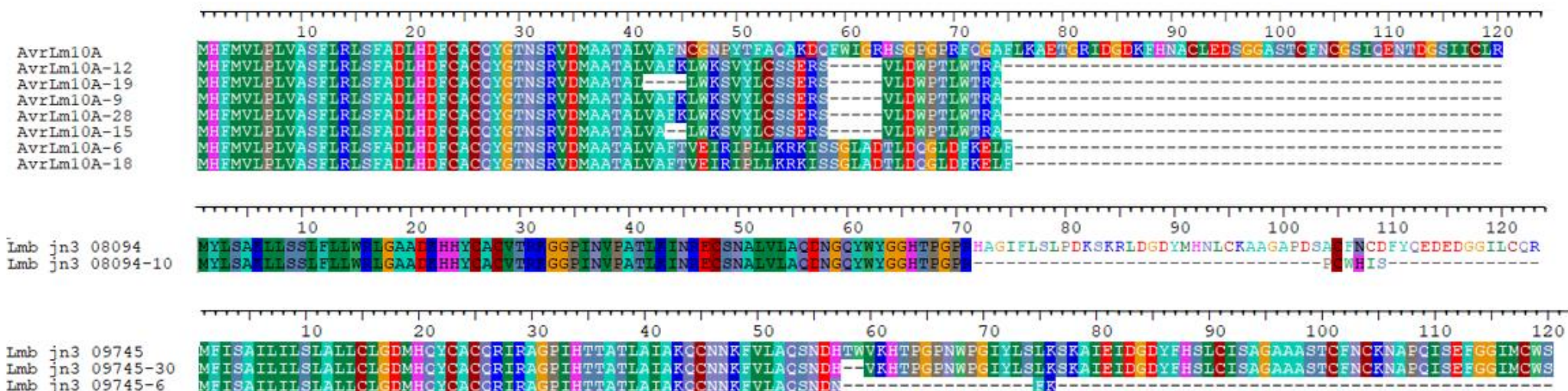
AvrLm10A, *AvrLm10B*, *Lmb_jn3_08094*, *Lmb_jn3_08095*, *Lmb_jn3_0974* et *Lmb_jn3_09746* ont été exprimés dans *N. benthamiana* à l'aide *A. tumefaciens*. AVR2 et Foa2 ont été utilisés comme contrôles positifs supprimant modérément ou drastiquement l'induction de ROS. Un vecteur vide ne contenant pas d'effecteur a été utilisé comme contrôle négatif (pBIN1 et 2). 48h après infiltration, des disques foliaires ont été découpés à l'emporte-pièce et laissés 24h dans de l'eau miliQ. 24h après les disques ont été transférés dans une plaque à 96 puits contenant 100 μ l d'eau, 250 μ M de luminol et 10 μ g ml⁻¹ de peroxydase de Raifort (HRP). La luminescence a été enregistrée sur une période de 50 min à l'aide du lecteur de plaques Magellan F50 (Tecan), après traitement par 100nM de flg22 ou de l'eau, et mesurée comme la somme des photons détectés.

6. Implication des membres de la famille *AvrLm10A/AvrLm10B* dans l'agressivité de *L. maculans*.

Petit-Houdenot *et al.* (2019) avaient montré par une approche de silencing par ARN interférent qu'*AvrLm10A* était impliqué dans l'agressivité de *L. maculans* sur colza, en régulant négativement la taille des lésions provoquées lors de l'infection sur cotylédons. En effet, la taille des lésions foliaires était négativement corrélée au niveau d'expression résiduelle d'*AvrLm10A*. En revanche, Le silencing d'*AvrLm10B* n'avait pas d'effet significatif sur la taille des lésions foliaires. Nous avons choisi d'utiliser la technologie CRISPR-Cas9 (Idnurm *et al.*, 2017) pour inactiver *AvrLm10A*, *AvrLm10B*, *Lmb_jn3_08094*, *Lmb_jn3_08095*, *Lmb_jn3_09745* et *Lmb_jn3_09746*. Nous avons inactivé *AvrLm10A* et ses homologues dans la souche JN3-Cas9 et *AvrLm10B* et ses homologues dans la souche V41-2-24-Cas9 (JN3 et V41-2-24 ayant des mating type différents et pouvant donc être croisées). Nous avons généré un nombre variable de mutants : d'un seul pour *Lmb_jn3_08094* à dix pour *Lmb_jn3_08095* et *Lmb_jn3_09746* (Figures 35A et 36A). Nous avons dans un premier temps testé la capacité des transformants à induire des symptômes sur cotylédons du cultivar

sensible ES Astrid et n'avons par la suite gardé qu'un seul transformant par mutation capable d'induire des symptômes. Nous avons également sélectionné, lorsque c'était possible, un transformant ne présentant pas de mutation, comme témoin de transformation.

A



B

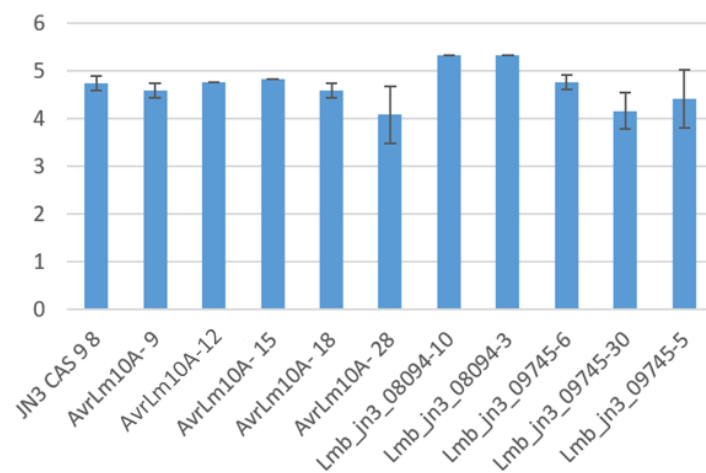
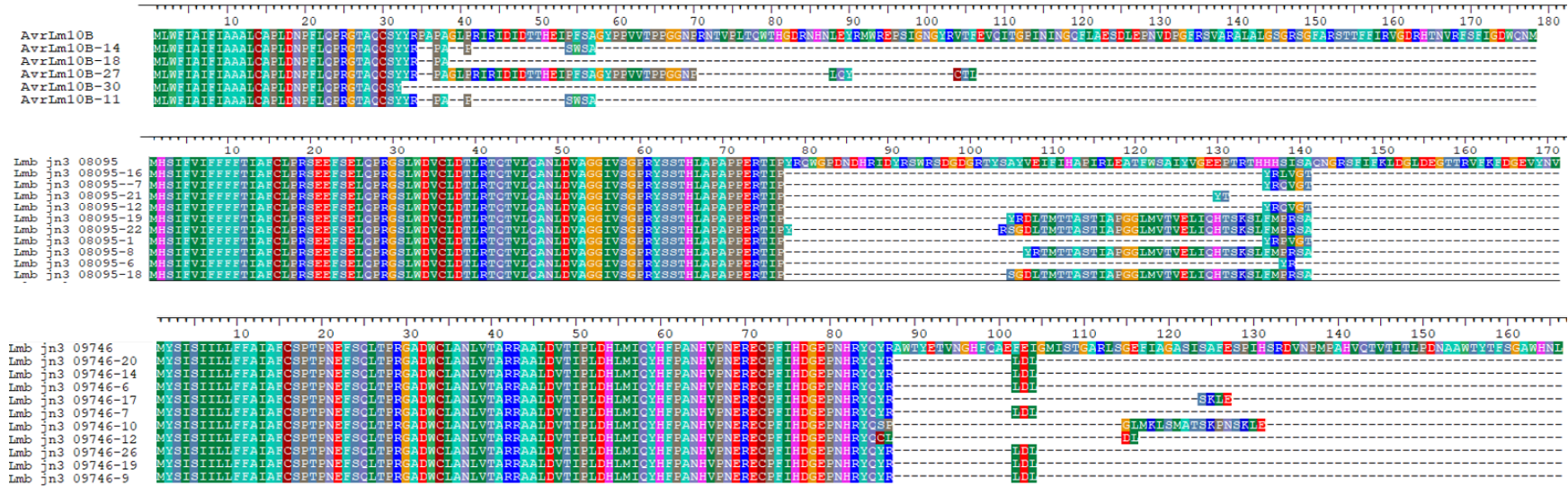


Figure 36. Production de mutants CRISPR-Cas9 inactivés pour AvrLm10A, Lmb_jn3_08094 et Lmb_jn3_09745 dans un fond génétique JN3.

(A) Alignement des séquences protéiques prédites pour chacun des mutants CRISPR-Cas9 sélectionnés avec celles de la protéine WT pour AvrLm10A, Lmb_jn3_08094 et Lmb_jn3_09745. (B) Symptômes obtenus sur cotylédons de colza sensible (cultivar ES-Astrid) avec les transformants mutés dans les différents gènes. Les symptômes sont mesurés 12 jours après l'infection. Les résultats sont exprimés sous la forme d'un score moyen en utilisant la notation IMAScore (1 à 3 résistance de la plante ; 4 à 6 sensibilité de la plante ; Balesdent *et al.*, 2015).

A



B

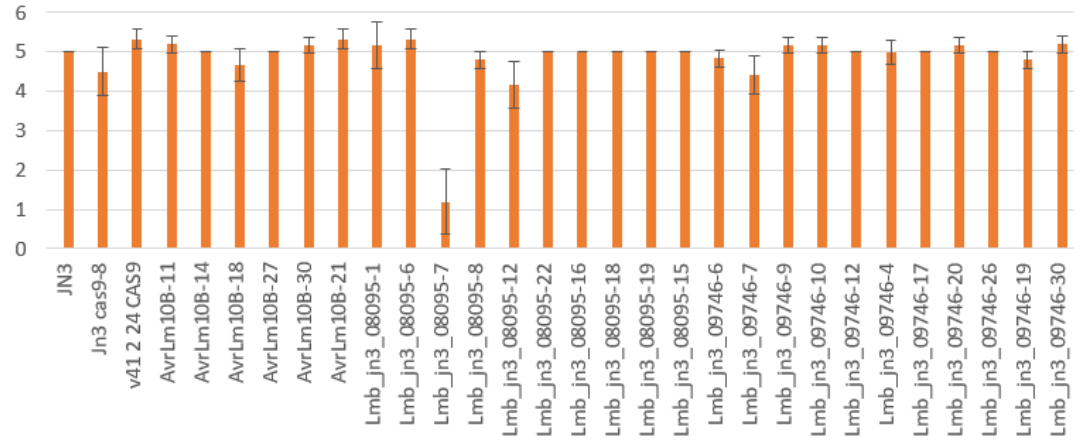


Figure 37. Production de mutants CRISPR-Cas9 inactivés pour AvrLm10B, Lmb_jn3_08095 et Lmb_jn3_09746 dans un fond génétique V41-2-24.

(A) Alignement des séquences protéiques prédites pour chacun des mutants CRISPR-Cas9 sélectionnés avec celles de la protéine WT pour AvrLm10B, Lmb_jn3_08095 et Lmb_jn3_09746. (B) Symptômes obtenus sur cotylédons de colza sensible (cultivar ES-Astrid) avec les transformants mutés dans les différents gènes. Les symptômes sont mesurés 12 jours après l'infection. Les résultats sont exprimés sous la forme d'un score moyen en utilisant la notation IMAScore (1 à 3 résistance de la plante ; 4 à 6 sensibilité de la plante ; Balesdent et al., 2015)

Nous avons pu sélectionner au total 20 mutants (3 pour *AvrLm10A*, 4 pour *AvrLm10B*, 2 pour *Lmb_jn3_09745*, 4 pour *Lmb_jn3_09746*, 1 pour *Lmb_jn3_08094* et 6 pour *Lmb_jn3_08095*). Aucun défaut de croissance ou de sporulation n'a été observé pour l'ensemble des transformants. Ces transformants ont été testés sur un cultivar portant le gène de résistance *Rlm10* (Eurol-Rlm10), ce qui a permis de confirmer que l'inactivation d'*AvrLm10A* et *AvrLm10B* permettait d'échapper à la reconnaissance par Rlm10, alors que les transformants mutés pour les autres gènes restaient avirulents vis à vie de *Rlm10* (Figure 37).

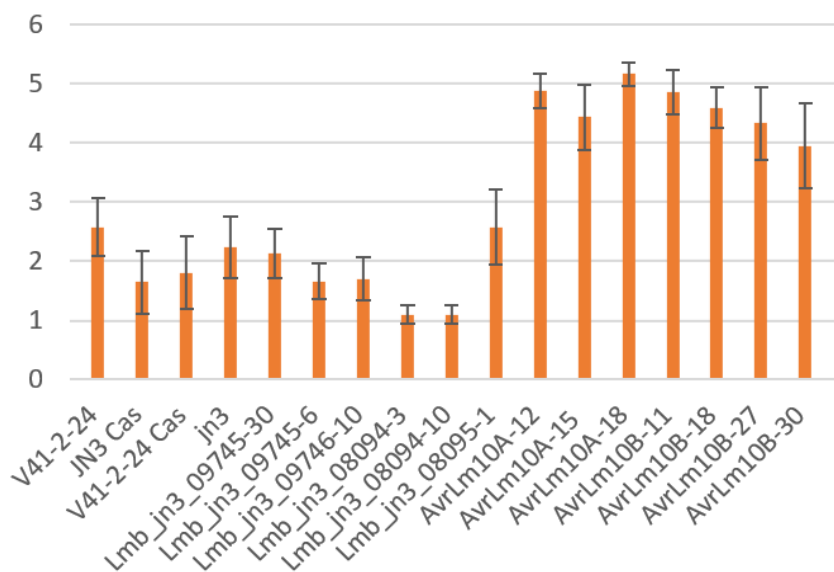


Figure 38. Les transformants inactivés pour *AvrLm10A* ou *AvrLm10B* sont virulents vis-à-vis de *Rlm10*.

Les transformants mutés dans les différents gènes ont été inoculés sur des cotylédons d'un cultivar portant *Rlm10* (Eurol Rlm10) Le pouvoir pathogène a été mesuré 12 jours après l'infection. Les résultats sont exprimés sous la forme d'un score moyen en utilisant la notation IMAScore (1 à 3 résistance de la plante ; 4 à 6 sensibilité de la plante ; Balesdent *et al.*, 2015)

Afin de déterminer l'implication des différents gènes dans l'agressivité de *L. maculans*, les transformants sélectionnés ont été testé pour leur capacité à infecter le colza soit sur cotylédons pour les effecteurs exprimés en phase précoce d'infection (*AvrLm10A*, *AvrLm10B*, *Lmb_jn3_09745* et *Lmb_jn3_09746*), soit sur tiges pour les effecteurs exprimés pendant les phases tardives d'infection (*Lmb_jn3_08094* et *Lmb_jn3_08095*).

Afin d'estimer le rôle d'*AvrLm10A*, *AvrLm10B*, *Lmb_jn3_09745* et *Lmb_jn3_09746* dans l'agressivité sur cotylédon, chaque transformant inactivé pour un de ces gènes a été inoculé sur le génotype sensible Es Astrid et les surfaces de lésions sur cotylédons ont été mesurées 12 ou 13 jours après infection (2 répétitions réalisées). Plusieurs témoins négatifs ont été intégrés dans les tests : les souches sauvages JN3 et V41-2-24, ainsi que des transformants

non mutés, *Lmb_jn3_09745-5* et *Lmb_jn3_09746-30*. Les résultats des deux inoculations ont été analysés séparément, les transformants non mutés servant de contrôle pour les analyses statistiques. Lors de la première répétition, seul le transformant *AvrLm10A-15* montrait une légère diminution des taille des lésions comparativement à *Lmb_jn3_09745-5* ($P = 0,02$), alors que lors de la deuxième répétition, une augmentation significative des tailles des lésions a été trouvée pour deux mutants (un mutant pour *AvrLm10A* ainsi qu'un un mutant pour *Lmb_jn3_09745* ; (*AvrLm10A-18*: $p = 8 \times 10^{-4}$, *Lmb_jn3_09745-6*: $p = 3 \times 10^{-6}$)). L'augmentation de taille de lésion était nettement plus important pour *Lmb_jn3_09745-6* qu'*AvrLm10A-18*. Si d'un point de vue séquence protéique, le mutant *AvrLm10A-18* présente, tout comme les deux autres mutants *AvrLm10A* testés, une séquence protéique très altérée, *Lmb_jn3_09745-6* quant à lui présente une séquence protéique très altérée, alors que l'autre mutant, *Lmb_jn3_09745-30* présente seulement une délétion de 2 aa qui pourrait ne pas impacter la fonction de *Lmb_jn3_09745*. Il convient de noter que JN3 semble également induire des tailles de lésions plus importantes comparativement au témoin *Lmb_jn3_09745-6*. L'inactivation d'*AvrLm10B* et *Lmb_jn3_09746* n'a eu aucun effet significatif sur les tailles de lésions sur cotylédons (Figure 38).

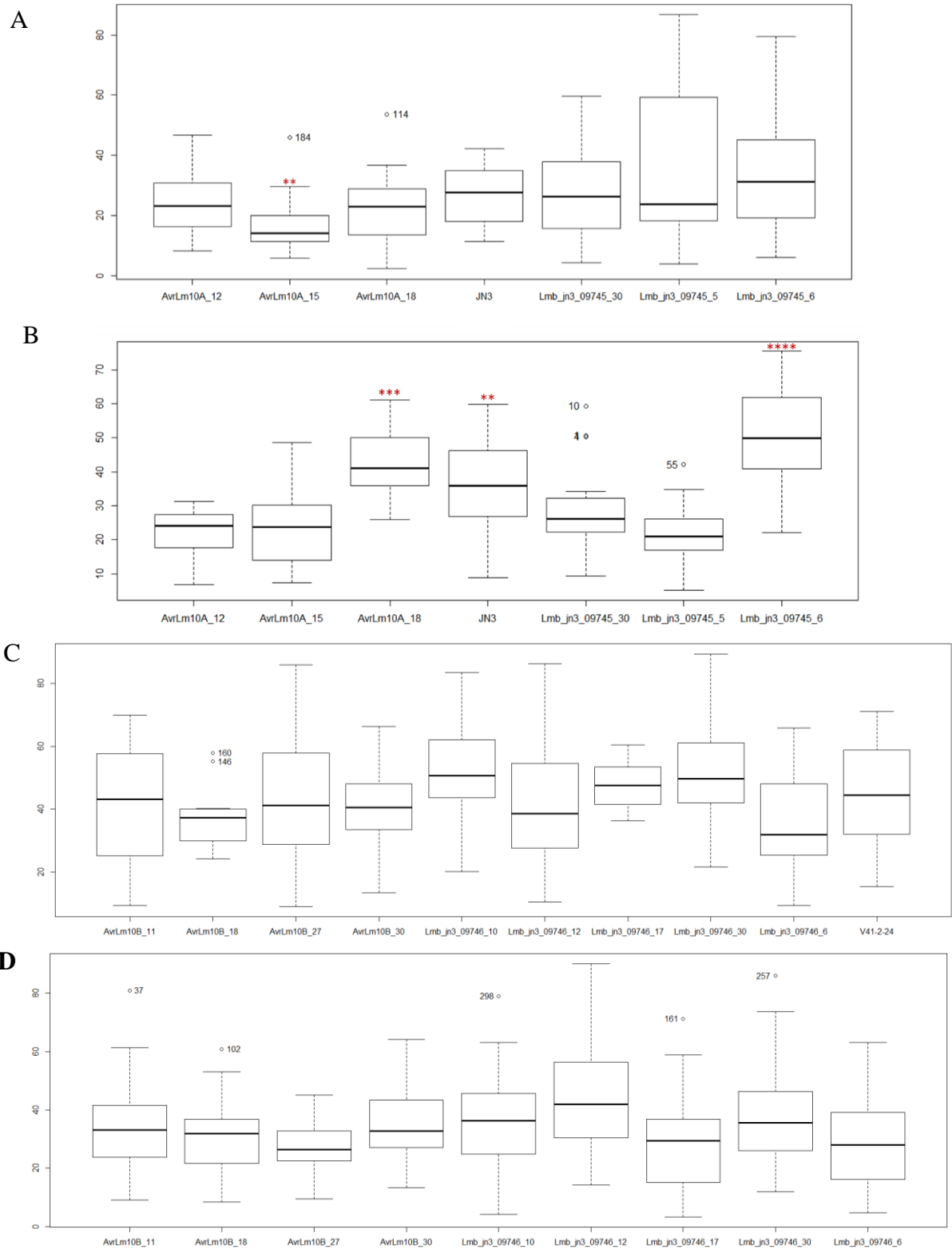


Figure 39. Boxplot représentant les médianes de taille de lésions provoquées par les transformants mutés pour les gènes *AvrLm10A*, *Lmb_jn3_09745*, *AvrLm10B* et *Lmb_jn3_09746*.

Les deux répétitions biologiques ont été représentées et analysées séparément. (A) Les médianes de taille de lésions provoquées par les transformants inactivés pour les gènes *AvrLm10A*, *Lmb_jn3_09745* lors de la première répétition. (B) Les médianes de taille de lésions provoquées par les transformants inactivés pour les gènes *AvrLm10A*, *Lmb_jn3_09745* lors de la deuxième répétition. (C) Les médianes

de taille de lésions provoquées par les transformants inactivés pour les gènes *AvrLm10B* et *Lmb_jn3_09746* lors de la première répétition. (D) Les médianes de taille de lésions provoquées par les transformants inactivés pour les gènes *AvrLm10B* et *Lmb_jn3_09746* lors de la deuxième répétition. Les astérisques indiquent une différence significative entre l'isolat témoin *Lmb_jn3_09745-5* ou *Lmb_jn3_09746-30* et les autres souches inoculées (test de Wilcoxon : ** valeur $p < 0,05$, *** valeur $p < 0,005$, **** valeur $p < 0,00005$).

Afin d'évaluer l'impact de l'inactivation de *Lmb_jn3_08094* et *Lmb_jn3_08095* sur la colonisation de la tige, des mutants de chacun des gènes ont été inoculés sur le cultivar sensible Bristol. L'agressivité a été évaluée 38 jours après inoculation en mesurant le pourcentage de nécrose sur des sections de tige réalisées à partir du point d'inoculation. Plusieurs témoins négatifs ont été intégrés dans les tests : les souches sauvages JN3 et V41-2-24 ainsi que les transformants non mutés *Lmb_jn3_08094-3* et *Lmb_jn3_08095-15*. Nous n'avons observé aucun impact significatif de l'inactivation génique sur la colonisation de la tige (Figure 39).

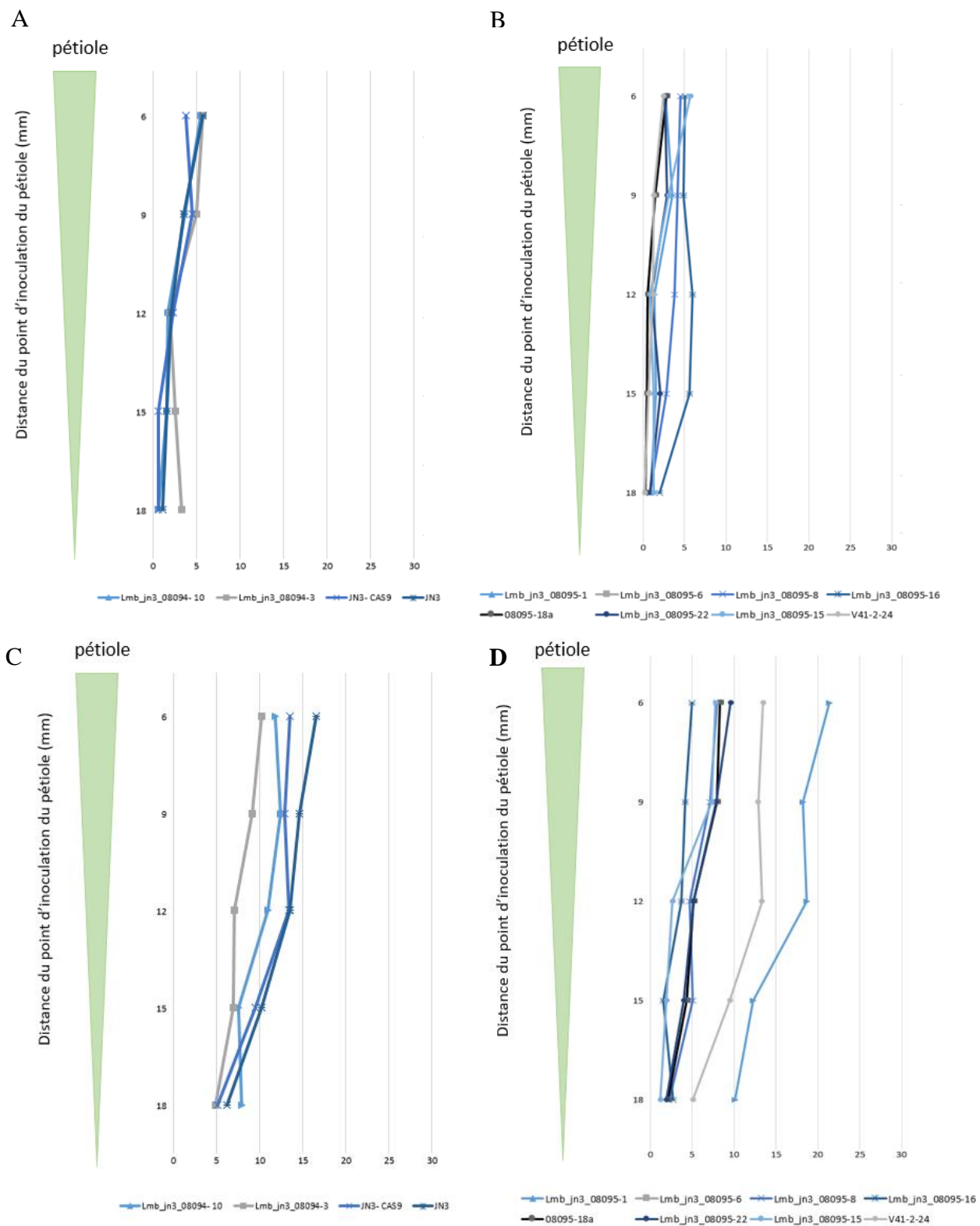


Figure 40. Effet de l'inactivation de *Lmb_jn3_08094* et *Lmb_jn3_08095* sur la capacité de *L. maculans* à infecter les tiges de colza.

Six mutants indépendants pour *Lmb_jn3_08095* et un mutant pour *Lmb_jn3_08094* ont été inoculés à la base du pétiole de la seconde feuille du cultivar sensible Bristol. Un mutant non inactivé a également été inoculé pour chaque gène (*Lmb_jn3_08094-3* et *Lmb_jn3_08095-15*) comme témoin négatif. Les symptômes ont été mesurés 38 jours après inoculation. Le pourcentage de surface nécrosée est représenté le long de la tige. Les deux répétitions biologiques ont été représentées et

analysées séparément : (A) Inactivation de *Lmb_jn3_08094* lors de la première répétition, (B) Inactivation de *Lmb_jn3_08095* lors de la première répétition, (C) Inactivation de *Lmb_jn3_08094* lors de la deuxième répétition, (D) Inactivation de *Lmb_jn3_08095* lors de la deuxième répétition. Aucune différence significative n'a été détectée selon le test de Wilcoxon avec une p-value de 0.05.

Matériels et méthodes

Culture des plantes et microorganismes

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

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

La souche DH5 α d'*Escherichia coli* a été cultivée sur un milieu LB (peptone 10 g/l, extrait de levure 5 g/l, NaCl 10 g/l) à 37°C. Les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* C58C1 et GV3101::pMP90 ont été cultivées sur milieu LB à 28°C.

L. maculans est cultivé sur un milieu V8 (10% jus V8, CaCO₃ 30 mM) à 25°C. Les spores de *L. maculans* sont obtenues selon le protocole décrit par Ansan-Melayah *et al.* (1995).

Clonages et transformation de *L. maculans*

Les gènes d'intérêt ont été amplifiés à partir d'ADNc de la souche de référence v23.1.3 à l'aide de la Taq polymérase Phusion (Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis) et de conditions de PCR adaptées. Les amorces utilisées pour ces amplifications sont résumées dans le Tableau S) Les produits PCR flanqués des sites de recombinaisons attB ont été recombinaison BP afin d'obtenir les vecteurs d'entrée portant des séquences attL selon les recommandations du fournisseur (<https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/cloning/gateway-cloning/protocols.html#bp>). Les inserts clonés dans les vecteurs d'entrée ont par la suite été insérés dans des vecteurs de destination Site-dest-GFP ou pK2GW7, via une réaction de recombinaison LR. Pour générer les constructions pour le test de transport de cellule à cellule, nous avons utilisé les différents vecteurs d'entrée pDONR207 contenant les gènes d'intérêt pour amplifier les séquences codantes avec les couples d'amorces listés dans le Tableau S. Les fragments obtenus ont été recombinaison dans un vecteur de 'mouvement intercellulaire' linéarisé pZK538 (Feng *et al.*, 2016), et la linéarisation a été réalisée par PCR inverse, en utilisant les amorces FP7939 et FP7940. La recombinaison a été réalisée selon le protocole de

clonage Gibson selon les recommandations du fournisseur (Biolabs, New-England) . Les différents plasmides ont été introduits dans *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 par électroporation à 2,5 kV, 200 Ω et 25 μ F.

Pour inactiver les différents gènes étudiés 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 ARNguides ont été choisis à l'aide du site web de prédiction CRISPOR, en utilisant le génome de *L. maculans* comme référence (Dutreux *et al.*, 2018) et amplifiés avec les amorces MAI0309 et MAI0310 (Tableau S). Par clonage Gibson (Silayeva e Barnes, 2018), les ARNs guides ont été insérés au niveau du site *XhoI* dans le plasmide pLAU53. Les différents plasmides ont été introduits dans *A. tumefaciens* C58-pGV2260 par électroporation à 2,5 kV, 200 Ω et 25 μ F. *L. maculans* a été transformé avec les souches d'*A. tumefaciens* obtenues comme décrit par Gout *et al.* (2006). Les transformants ont ensuite été transformés avec les plasmides pLAU53-gRNA. Les transformants fongiques ont été sélectionnés à l'aide d'hygromycine (50 μ g.ml⁻¹) pour pLAU2-Cas9 et généticine (50 μ g.ml⁻¹) pour pLAU53-gRNA.

Expression transitoire dans *N. benthamiana*

L'expression transitoire dans des feuilles de *N. benthamiana* a été réalisée par agroinfiltration comme décrit Petit-Houdenot *et al.* (2019). Pour les essais de localisation au niveau des plasmodesmes, l'infiltration a été effectuée en utilisant une DO600 de 0,5 alors que pour les tests de transport de cellule à cellule des DO allant de 0,1 à 0,001, ont été utilisées afin d'obtenir des transformations de cellules en mosaïque. Les feuilles agroinfiltrées ont été observées par microscopie confocale 48h ou 72h après l'infiltration.

Microscopie confocale

Les observations microscopiques ont été effectuées sur un microscope confocal Leica TCS SPE avec un objectif à immersion à huile 63X. Les longueurs d'onde d'émission et d'excitation suivantes ont été utilisées : GFP: excitation 488 nm, émission 489 - 509 nm; RFP / mCherry : excitation 532 nm, émission 558 à 582 nm. Le gain est réglé à une valeur comprise entre 800 et 900, avec un offset de -0,6.

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

Les souches d'*A. tumefaciens* GV3101::pMP90 exprimant les différents gènes d'intérêts ont été cultivées suivant les étapes décrites précédemment. Les cultures d'agrobactéries exprimant les gènes d'intérêt sont resuspendues à une DO de 0.5 comme décrit Petit-Houdenot *et al.* (2019) et infiltrées à la face inférieure de feuilles de *N. benthamiana*. 24h plus tard, des agrobactéries exprimant le gène *BAXI*, un inducteur de mort cellulaire, sont resuspendues à une DO de 0.8 et infiltrées au même endroit que les gènes d'intérêts. Les témoins négatifs correspondent à l'infiltration du vecteur pK2GW7 vide. La mort cellulaire est observée 10 à 15 jours post-infiltration et évaluée selon un système de notation explicité en Figure 6.

Test de suppression de PTI

La mesure de ROS après une induction de la PTI a été réalisée à partir d'un test basé sur le luminol/peroxydase (Felix *et al.*, 1999). Des disques de feuilles de *N. benthamiana* âgés de 4 semaines (diamètre = 5 mm) ont été prélevés à l'aide d'un emporte-pièce et déposés dans de l'eau stérile pendant la nuit. Les disques foliaires ont ensuite été transférés dans une plaque à 96 puits contenant 100 µl d'eau, 250 µM de luminol et 10 µg ml⁻¹ de peroxydase de Raifort (HRP) par puits. La luminescence a été enregistrée sur une période de 50 min à l'aide du lecteur de plaques Magellan F50 (Tecan), après un traitement avec 100 nM de flg22 ou de l'eau, et mesurée comme la somme des photons détectés dans chaque puits.

Test de pathogénie sur colza avec *Leptosphaeria maculans*

Les souches de *L. maculans* sont mises en culture sur V8 pendant une semaine. Des plugs de mycélium sont ensuite transférés sur une nouvelle boîte de V8 et mis à sporuler pendant deux semaines sous lumière bleu, comme précédemment décrit (Ansan-Melayah *et al.*, 1995). Les spores sont récupérées dans 3-5 ml d'eau stérile, filtrées et diluées à 1*10⁷ spores/ml. Des cotylédons de colza de 10 jours sont inoculés, après blessure, avec 10 µl de cette suspension de spores, mis sous cloche, à l'obscurité, à température ambiante durant 48h, puis remis en chambre de culture aux conditions appropriées pour le colza. Les symptômes sont notés 12 ou 13 jours post-inoculation selon l'échelle de notation IMAScore dont les modalités sont les suivantes : 1 : réaction hypersensible. 2 : petites lésions noires de 3 à 6 mm. 3 : petites lésions noires de 6 à 12 mm. 4 : collapsus cellulaire gris-vert. 5 : collapsus cellulaire gris-vert, présence de pycnides. 6 : collapsus cellulaire gris-vert, présence de beaucoup de pycnides. La plante est considérée résistante pour une note comprise entre 1 et 3, et sensible pour une note de 4 à 6. Les cotylédons ont ensuite été scannés pour mesure les surfaces de lésions.

Pour les tests sur tiges de colza, des plantes adultes sont inoculées comme décrit par Gervais *et al.* (2017), en coupant à la base du pétiole de la deuxième feuille horizontalement, à 1 cm du point d'insertion de la feuille. L'inoculum (10 µl contenant 10^7 pycnidiospores ml^{-1}) est déposé sur les pétioles coupés. Les plantes inoculées sont incubées comme décrit précédemment. La nécrose des tiges infectées est évaluée au bout de 38 jours en coupant la section entière de la tige entre le point d'insertion du pétiole inoculé et le collet de la tige, en tranches successives de 3 mm. Les sections sont scannées et le pourcentage de la section de tige présentant une nécrose interne est mesurée avec ImageJ.

Analyses bio-informatique et statistique

Les prédictions de structure 3D des différentes protéines ont été générées à l'aide d'AlphaFold (Mirdita *et al.*, 2022) en utilisant les séquences protéiques des effecteurs sans leur peptide signal. L'alignement des séquences protéiques basé sur la structure a été réalisé à l'aide du logiciel Jalview. Pour l'analyse statistique, un test de Wilcoxon a été réalisé, avec le logiciel R.

Discussion

Nous avons précédemment pu mettre en évidence l'existence d'une grande famille d'effecteurs comprenant AvrLm10A et SIX5, conservée entre champignons phytopathogènes. Une grande partie des membres de cette famille présentaient un effecteur partenaire, codé par un gène voisin en orientation inverse, ces effecteurs appartenant à au moins huit familles, et suggérant qu'AvrLm10A, SIX5 et leurs homologues pouvaient coopérer avec ces différentes familles d'effecteurs. Les résultats obtenus lors de cette étude nous permettent d'envisager qu'AvrLm10A, SIX5 et leurs homologues pourraient, au moins pour une partie d'entre eux, jouer le rôle de transporteurs de leurs effecteurs partenaires de cellule à cellule via les plasmodesmes, ces effecteurs partenaires modulant ensuite les réactions de défense de la plante hôte.

Nous avons pu prédire de fortes analogies structurales entre AvrLm10A, Lmb_jn3_08094 et Lmb_jn3_09745 de *L. maculans* et SIX5 de *F. oxysporum*. Ces analogues structuraux partagent la capacité de pouvoir transporter des protéines effectrices de cellule à cellule dans *N. benthamiana*. Leurs protéines partenaires, AvrLm10B, Lmb_jn3_08095, Lmb_jn3_09746 présentent également des analogies structurales et pourraient comporter des pro-domaines dans leur partie N terminale. En effet, l'élimination d'acides aminés dans leur partie N terminale (40 pour AvrLm10B, 55 pour Lmb_jn3_08095 et 41 Lmb_jn3_09746), peptide signal compris, a permis d'obtenir de meilleures prédictions de structure 3D de ces protéines. Le choix des acides aminés éliminés a été fait en se basant sur les prédictions de structure à partir des protéines entières qui montraient des parties N terminales désordonnées, suggérant la présence d'un pro-domaine. Il a récemment été montré qu'AVR2, ainsi que son analogue structural SIX8 qui interagit avec un effecteur partenaire PSL1, présentaient un pro-domaine (K2PP) capable d'être clivé par Kex2 (Yu *et al.*, 2021 ; Outram *et al* 2021). Même si un tel domaine n'a pas pu être retrouvé par simple recherche de motif kex2 (LxxP, KR ou RR ; Outram *et al.*, 2021) pour AvrLm10B, Lmb_jn3_08095 et Lmb_jn3_09746, l'amélioration de la prédiction de leurs structures 3D après élimination d'acides aminés en partie N terminale ainsi que la bonne superposition entre AvrLm10B⁽⁴¹⁻¹⁶⁴⁾ et Avr2, suggèrent la présence d'un pro-domaine ou du moins une maturation de ces protéines après sécrétion dans l'apoplasme. Ces résultats nous montrent que les protéines partenaires de SIX5, AvrLm10A et leurs homologues, bien qu'ayant été décrites comme appartenant à des familles

d'effecteurs différentes en se basant sur leur séquence protéique, pourraient en fait partager une même organisation structurale. Selon les résultats que nous avons obtenus, Lmb_jn3_08095 ne serait pas transporté de cellule à cellule par Lmb_jn3_08094, même s'il est capable d'induire une forte suppression de la PTI induite par flg22 dans *N. benthamiana*. AvrLm10A et Lmb_jn3_09745 semblent intervenir de la même façon lors de l'infection sur cotylédons, leur inactivation ayant un effet sur le développement des macules avec une augmentation de la taille des lésions.

La détermination de la structure 3D d'effecteurs fongiques a précédemment permis d'identifier plusieurs familles d'effecteurs partageant des analogies structurales sans partager de fortes homologies de séquences protéiques. C'est notamment le cas pour quatre familles structurales d'effecteurs fongiques: les familles MAX (effecteurs Avr de *Magnaporthe oryzae* et ToxB de *P. tritici repentis* ; de Guillen et *et al.*, 2015), RALPH (RNase-Like Proteins associated with Haustoria ; Spanu *et al.*, 2017), ToxA-like (Di *et al.*, 2017 ; Wang *et al.*, 2007) et LARS (Leptosphaeria Avirulence and Suppressing ; Lazar *et al.*, 2020). Nous pouvons ainsi considérer SIX5, AvrLm10A, Lmb_jn3_08094 et Lmb_jn3_09745 comme appartenant à une même famille structurale pouvant englober un nombre plus important d'effecteurs. En effet, Yu *et al.* (2021) ont récemment déterminé, en combinant résolution de structure cristalline et prédictions de structure d'effecteurs chez *F. oxysporum*, que SIX5 appartiendrait à une nouvelle famille structurale comprenant trois autres effecteurs, SIX14, PLS1 et PLS2. Il est intéressant de noter que PLS1 est aussi capable d'interagir avec un effecteur codé par un gène voisin de en orientation inverse, SIX8 (Ayukawa *et al.*, 2021 ; Yu *et al.*, 2021). La structure cristalline d'AVR2 (SIX3) avait été résolue, révélant une organisation en sandwich- β , avec deux feuilletts β antiparallèles (Di *et al.*, 2017), également retrouvée chez ToxA de *Pyrenophora tritici-repentis* et AvrL567 de *Melampsora lini* (Sarma *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2007). Yu *et al.* (2021) ont identifié deux autres effecteurs de *F. oxysporum*, SIX8 et FOXGE_015533, appartenant à la classe structurale « ToxA-like ». Les structures prédites d'AvrLm10B, Lmb_jn3_08095 et Lmb_jn3_09746 présentant également une organisation en sandwich- β , et leur organisation structurale étant analogue à celle d'Avr2, ils pourraient également appartenir à la famille ToxA-like. Il est intéressant de noter que SIX8, qui fait partie de la famille structurale ToxA-like, est, tout comme AVR2, capable d'interagir avec un effecteur partenaire, PLS1, montrant qu'il est possible de faire le lien entre les prédictions de familles structurales et les coopérations entre effecteurs (Yu *et al.* 2021)

Récemment, Rocafort *et al.* (2022) ont également identifié 31 effecteurs candidats de *V. inaequalis* comme appartenant à la famille ToxA-like. Les auteurs n'ont cependant pas précisé si ces effecteurs présentent, au moins pour certains, un gène voisin, en orientation inverse, codant un effecteur putatif.

Nous avons montré qu'AvrLm10A et Lmb_jn3_09745 étaient capables de transporter leur effecteur partenaire de cellule à cellule chez *N. benthamiana*, alors que nous n'avons pas pu montrer de capacité de transport de Lmb_jn3_08095 par son effecteur partenaire. Ce résultat est concordant avec le fait que seules AvrLm10A et Lmb_jn3_09745 étaient capables d'interagir physiquement avec AvrLm10B et Lmb_jn3_09746 respectivement (Petit-Houdenot *et al.*, 2019 ; Tabi *et al.*, 2021). Il faut cependant rester prudents dans nos conclusions car, lors de l'analyse de la capacité de transport de cellule à cellule par approche de transformation en mosaïque, peu d'évènements de transport ont été globalement observés, avec moins d'évènements détectés pour AvrLm10A que pour Lmb_jn3_09745. Même si la contrainte expérimentale de création de mosaïques et de détection des évènements de transport a été limitante, la puissance de l'interaction entre effecteurs a également pu jouer un rôle dans l'efficacité du transport. En effet, pour AvrLm10A pour qui peu d'évènements de transport ont été observés, l'interaction avec AvrLm10B a été décrite comme relativement faible (Petit-Houdenot *et al.*, 2019) comparativement à Lmb_jn3_09745 qui présente une interaction très forte avec Lmb_jn3_09746 (Talbi *et al.*, 2021) et pour laquelle nous avons pu observer davantage d'évènements de transport. Ces interactions physiques et ces capacités de transport distinctes sont également corrélées à la fréquence de localisation au niveau des plasmodesmes que nous avons pu observer. En effet, nous avons observé un plus grand nombre de points de fluorescence co-localisant au niveau des plasmodesmes, lors de la co-expression de Lmb_jn3_09745 et Lmb_jn3_09746, comparativement à la co-expression d'AvrLm10A et AvrLm10B. Afin de pouvoir confirmer ce résultat, nous tentons actuellement de valider l'interaction des membres des différents couples d'effecteurs au niveau des plasmodesmes par BiFC.

En plus d'avoir déterminé qu'AvrLm10A, Lmb_jn3_09745 et SIX5 étaient capables de transporter leurs protéines partenaires de cellule à cellule, nous avons également pu montrer une capacité de ces protéines (et également de Lmb_jn3_08094) à transporter AVR2. Ainsi, Lmb_jn3_08094, bien qu'elle ne transporte pas Lmb_jn3_08095 de cellule à cellule, semble être capable de transporter AVR2. Etant donné la forte analogie structurale entre

Lmb_jn3_08094 et ses homologues, l'hypothèse la plus plausible pour expliquer ce résultat est que Lmb_jn3_08095 a suffisamment divergé, notamment au niveau des sites d'interaction avec Lmb_jn3_08094 pour qu'il ne soit plus capable d'être transporté par son effecteur partenaire. Contrairement à AvrLm10A/AvrLm10B et Lmb_jn3_09745/ Lmb_jn3_09746 qui s'expriment fortement lors de la phase précoce de l'infection sur cotylédons, Lmb_jn3_08094/ Lmb_jn3_08095, quant à eux, s'expriment spécifiquement dans le pétiole et dans la tige, ce qui suggérerait une fonction distincte des autres couples de la famille AvrLm10 lors de l'infection. Ainsi, nous avons montré une très forte capacité de Lmb_jn3_08095 dans la suppression de PTI induite par Flg22 dans *N. benthamiana*. Lmb_jn3_08095 était en effet capable de supprimer la PTI au même niveau que FOA1, un effecteur candidat de la souche Fo5176 de *F. oxysporum* capable d'infecter *A. thaliana* (Thatcher *et al.*, 2009) qui supprime également très fortement la PTI induite par Flg22. Lmb_jn3_08094, Lmb_jn3_09745 et Lmb_jn3_09746 sont, quant à eux, capables de supprimer faiblement la PTI, au même niveau qu'AVR2, AvrLm10A et AvrLm10B n'ayant pas cette capacité. Ces résultats suggèrent une néo-fonctionnalisation et des fonctions, au moins partiellement, non-redondantes des quatre paires d'effecteurs.

Nous avons mis en évidence un rôle dans l'agressivité de *L. maculans* d'AvrLm10A et Lmb_jn3_09745, puisque des mutant inactivés pour *AvrLm10A* ou *Lmb_jn3_09745* montraient une augmentation significative dans la taille des macules sur cotylédons d'une variété sensible. Bien que ces résultats aient été obtenus seulement lors d'une des répétitions biologiques, ces observations sont confortées par le résultat obtenu lors des travaux de Petit-Houdenot *et al.* (2019) montrant, par une approche de silencing par ARNi, qu'AvrLm10A régulait négativement l'agressivité fongique en limitant le développement des lésions sur cotylédons. L'inactivation par CRISPR-Cas9 a donc pu valider ces résultats pour AvrLm10A et montrer que Lmb_jn3_09745 serait aussi capable de limiter le développement des macules, suggérant un rôle commun d'AvrLm10A et Lmb_jn3_09745. Cependant, si pour *Lmb_jn3_09745*, nous avons un seul transformant dont la protéine correspondante était fortement altérée et pour lequel un effet sur la taille des lésions a été observé, pour *AvrLm10A*, un seul transformant était affecté dans le développement de macules (AvrLm10A-18) alors que plusieurs transformants affectés pour la séquence protéique d'AvrLm10A avaient été testés, sachant que l'ensemble des transformants mutés pour *AvrLm10A* étaient virulents vis-à-vis de *Rlm10*. En ce qui concerne Lmb_jn3_08094 et Lmb_jn3_08095, aucun effet n'a été détecté lors de l'infection sur tige d'une variété sensible. Au moins pour

Lmb_jn3_08095, qui est capable de fortement supprimer PTI dans *N. benthamiana*, nous aurions pu supposer que son inactivation aurait induit une diminution de symptômes comparativement au témoin non inactivé. Nous pouvons en conclure que plusieurs effecteurs fonctionnent sans doute ‘en cocktail’ afin de supprimer la PTI sur tige. Par ailleurs, nous avons également pu montrer que Lmb_jn3_08094, Lmb_jn3_09745, et Lmb_jn3_09746 présentent une capacité à supprimer la PTI, même si cette capacité reste faible par rapport à Lmb_jn3_08095 : l’effet cumulé de l’action de ces effecteurs (possiblement associée à d’autres effecteurs) pourrait permettre d’assurer une suppression basale de la PTI.

La coopération entre effecteurs n’a été que rarement investiguée. Nos travaux montrent que cette coopération, liée ici au transport d’un effecteur par un autre, pourrait être partagée entre de nombreux champignons phytopathogènes et indispensable à la fonction effectrice de l’effecteur transporté. Les effecteurs transportés pourraient avoir des fonctions communes ou distinctes mais avec l’action commune de promouvoir l’infection. En effet, de façon générale et parallèlement au système immunitaire autonome de chaque cellule, le système immunitaire non autonome répond aux agents pathogènes par des signaux délivrés par les cellules infectées aux cellules non infectées par les voies apoplastiques et symplastiques (Lee & Lu, 2011 ; Yan *et al.*, 2019). Il serait donc tout à fait imaginable qu’un système de transport via des coopérations entre protéines effectrices soit indispensable pour permettre de préparer l’infection à longue distance.

La localisation de la plupart des membres de la famille AvrLm10/SIX5 au niveau des plasmodesmes, ainsi que leur capacité de transport de cellule à cellule, semblent indiquer une potentielle fonction au niveau de ces plasmodesmes. Les effecteurs, notamment ceux qui sont impliqués dans la suppression de PTI, ont un intérêt particulier d’agir au niveau des plasmodesmes. En effet, lors des réponses liées à la PTI, l’activation des PRRs initie l’induction de réponses immunitaires par le biais de multiples processus biologiques et physiologiques tels que l’accumulation de ROS, la régulation transcriptionnelle des gènes liés à l’immunité, ainsi qu’un dépôt de callose au niveau des plasmodesmes entraînant leur fermeture. Il a été démontré que le dépôt de callose est généralement déclenché par des PAMPs conservés. C’est notamment le cas de la chitine et du chitosan fongiques qui sont de puissants inducteurs de callose (Gong *et al.*, 2020). Certains récepteurs PRR sont justement impliqués dans le déclenchement d’une accumulation de callose au niveau des plasmodesmes induisant une fermeture de ces derniers, tel que Lym2 (lysin motif domain-containing

glycosylphosphatidylinositol-anchored protein 2), un PRR détectant la chitine chez *A. thaliana* (Miya *et al.*, 2007). Plusieurs effecteurs fongiques ont été décrits comme agissant au niveau des plasmodesmes pour contourner ces réactions de défense. Certains effecteurs entravent l'accumulation de la callose : c'est notamment le cas de Mlp37347, un effecteur de *Melampsora larici-populina* localisé au niveau des plasmodesmes (Germain *et al.*, 2018), l'accumulation de callose au niveau des plasmodesmes étant fortement réduite dans les lignées transgéniques d'*A. thaliana* exprimant Mlp37347 (Rahman *et al.*, 2021). D'autres effecteurs peuvent cibler les plasmodesmes afin d'élargir et empêcher leur fermeture. C'est dans ce mécanisme que le couple SIX5/AVR2 semble être impliqué (Cao *et al.*, 2018). En effet, quand nous avons investigué la capacité des différents homologues d'AvrLm10A et SIX5 à transporter AVR2, nous avons exprimé la 2xGFP dans les cellules de *N. benthamiana* et détecté son transport de cellule à cellule. Même si la voie de signalisation en aval de l'interaction SIX5-AVR2 dans la régulation de la fonction des plasmodesmes n'est pas connue, il semblerait que l'une des fonctions de l'interaction et du transport de ce complexe soit le maintien de l'ouverture des plasmodesmes afin d'assurer le passage non seulement d'AVR2 mais aussi d'autres protéines fongiques favorisant l'infection.

Chapitre III

Caracterisation de la famille structurale AvrLm3, AvrLm4- 7 et AvrLm5-9

Introduction

La majeure partie des gènes AVR de *L. maculans* présentent du polymorphisme présence / absence dans les populations naturelles (Rouxel et Balesdent, 2017). Ce n'est pas le cas du gène *AvrLm3*, pour qui l'analyse d'une grande collection de souches a révélé que le gène était présent dans tous les isolats de *L. maculans*, suggérant que ce gène est important pour le pouvoir pathogène du champignon (Plissonneau *et al.*, 2017 ; Balesdent *et al.*, 2022). D'autre part, dans les travaux de Plissonneau *et al.* (2016), le silencing d'*AvrLm3* avait entraîné une forte diminution de la surface de lésions causées par *L. maculans* confirmant son importance dans le pouvoir pathogène du champignon.

La résistance *Rlm3* a été largement utilisée depuis le début des années 1990, puis maintenue dans la plupart des cultivars de colza depuis cette époque (Rouxel et Balesdent, 2017). Ainsi les populations françaises de *L. maculans* étaient entièrement virulentes vis-à-vis de *Rlm3* au début des années 2000 (Balesdent *et al.*, 2003). Fait intéressant, l'apparition d'isolat virulents vis-à-vis de *Rlm7* s'est, de façon surprenante, accompagnée de la ré-apparition concomitante d'isolats avirulents vis-à-vis de *Rlm3* (Plissonneau *et al.*, 2016). De plus, une analyse des populations mondiales de *L. maculans* avait montré que 95% des souches isolées en Amérique du Nord étaient soit virulentes sur *Rlm7* et avirulentes sur *Rlm3*, soit avirulente sur *Rlm7* et virulentes sur *Rlm3* (Dilmaghani *et al.*, 2009). Ces observations ont conduit à l'hypothèse, puis à la validation, de l'implication d'*AvrLm4-7* dans le masquage d'*AvrLm3* vis-à-vis de son gène de résistance *Rlm3* (Plissonneau *et al.*, 2016). Il a également été montré qu'il ne s'agissait pas du seul masquage dû à *AvrLm4-7*, puisque ce dernier arrivait aussi à masquer la présence d'*AvrLm5-9* vis-à-vis de *Rlm9* (Ghanbarnia *et al.*, 2018). La façon dont *AvrLm4-7* masque *AvrLm3* et d'*AvrLm5-9* n'est pas connue : la présence d'*AvrLm4-7* n'empêche pas l'expression d'*AvrLm3* et *AvrLm5-9*, et les expériences de double hybride dans *S. cerevisiae* n'ont pas permis d'observer d'interaction physique entre *AvrLm4-7*, *AvrLm5-9* et *AvrLm3* (Plissonneau *et al.*, 2016 ; Ghanbarnia *et al.*, 2018).

AvrLm5-9 et *AvrLm3* partagent 29 % d'identité de séquence protéique entre elle, et seulement 17% d'identité avec *AvrLm4-7*. Mesarich *et al.* (2018) ont identifié un homologue d'*AvrLm3* chez *F. fulvum*, l'agent de la cladosporiose de la tomate. Il s'agit d'une protéine AVR, appelée *Ecp11-1*, qui est reconnu par les accessions de tomates sauvages portant le gène de résistance *CfEcp11-1*. *AvrLm3* et *Ecp11-1* partagent 37% d'identité et 59% de similarité.

AvrLm4-7 est l'une des premières protéines AVR dont la structure cristalline avait été résolue révélant la présence de 3 feuillets β recouverts par une hélice α avec une surface globalement chargée positivement et dont un domaine avait été montré comme étant impliqué dans la translocation d'AvrLm4-7 dans le cytoplasme des cellules végétales (Blondeau *et al.*, 2015). La résolution, au début de ma thèse, des structures 3D d'AvrLm5-9 et Ecp11-1, puis la modélisation de celle d'AvrLm3 à partir de la structure d'Ecp11-1, ont permis de retrouver, de façon surprenante, des analogies structurales entre toutes ces protéines malgré le peu d'identité de séquence protéique entre elles. Des tests préliminaires de complémentation dans un isolat de *L. maculans* virulent vis-à-vis de *Rlm3* suggéraient qu'Ecp11-1 était capable de conférer à *L. maculans* une reconnaissance par *Rlm3*. C'est dans ce contexte que j'ai poursuivi la caractérisation des interactions entre Ecp11-1, AvrLm3 et AvrLm4-7. Dans un premier temps, j'ai validé la capacité d'Ecp11-1 à induire une reconnaissance par *Rlm3* et testé celle d'AvrLm4-7 à masquer cette reconnaissance. D'autre part, une recherche basée sur la structure avait été initiée permettant de retrouver des analogues structuraux d'AvrLm5-9, d'AvrLm3 et AvrLm4-7, constituant ainsi une nouvelle famille structurale. Les résultats concernant la résolution des différentes structures d'effecteurs, les recherches d'analogues structuraux, et les résultats de complémentation sont présentés sous forme d'un article, dont je suis co-auteur, accepté (avec révisions mineures) dans *PLOS Pathogens*.

Dans un second temps, une recherche d'homologues d'AvrLm3 dans les bases de données protéiques m'a permis d'identifier d'autres homologues chez des espèces fongiques phytopathogènes (*F. oxysporum* et *Zymoseptoria ardabiliae*). J'ai entamé une caractérisation, par complémentation dans un isolat de *L. maculans* virulent vis-à-vis de *Rlm3*, de ces différents homologues afin de déterminer la capacité de *Rlm3* à reconnaître ces homologues mais aussi la capacité d'AvrLm4-7 à masquer cette reconnaissance. De plus, afin de déterminer s'il s'agissait aussi d'analogues structuraux d'AvrLm3, nous avons réalisé des prédictions de structure pour ces différents homologues. En parallèle, grâce aux données de polymorphisme d'AvrLm3 dans les populations de *L. maculans* (Plissonneau *et al.*, 2017 ; Balesdent *et al.*, 2022), il a été possible d'identifier des sites polymorphes potentiellement impliqués dans la reconnaissance par *Rlm3*. J'ai donc investigué l'implication de ces sites dans la reconnaissance par *Rlm3* non seulement pour AvrLm3 mais aussi pour son homologue Ecp11-1. J'ai rédigé l'ensemble de ces résultats sous forme d'un article qui sera prochainement soumis.

Article 2

A new family of structurally conserved fungal effectors displays epistatic interactions with plant resistance proteins

A new family of structurally conserved fungal effectors displays epistatic interactions with plant resistance proteins

Short title: A structural family of effectors displaying epistatic interactions

Author list

Noureddine Lazar¹, Carl H. Mesarich², Yohann Petit-Houdnot³, Nacera Talbi³, Ines Li de la Sierra-Gallay¹, Emilie Zélie¹, Karine Blondeau¹, Jérôme Gracy⁴, Bénédicte Ollivier³, Françoise Blaise³, Thierry Rouxel³, Marie-Hélène Balesdent³, Alexander Idnurm⁵, Herman van Tilbeurgh^{1,¥} and Isabelle Fudal^{3,¥}

¹ Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Gif-sur-Yvette, France

² Laboratory of Molecular Plant Pathology, School of Agriculture and Environment, Massey University, Palmerston North, New Zealand

³ Université Paris-Saclay, INRAE, UR BIOGER, 78850, Thiverval-Grignon, France

⁴ CNRS UMR 5048, INSERM U1054, Centre de Biochimie Structurale, Université Montpellier, 34090 Montpellier, France

⁵ School of BioSciences, The University of Melbourne, VIC 3010, Australia

¥ Corresponding authors:

Herman van Tilbeurgh

herman.van-tilbeurgh@i2bc.paris-saclay.fr

and

Isabelle Fudal

Isabelle.Fudal@inrae.fr

Abstract

Recognition of a pathogen avirulence (AVR) effector protein by a cognate plant resistance (R) protein triggers a set of immune responses that render the plant resistant. Pathogens can escape this so-called Effector-Triggered Immunity (ETI) by different mechanisms including the deletion or loss-of-function mutation of the AVR gene, the incorporation of point mutations that allow recognition to be evaded while maintaining virulence function, and the acquisition of new effectors that suppress AVR recognition. The Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*, causal agent of oilseed rape stem canker, is one of the few fungal pathogens where suppression of ETI by an AVR effector has been demonstrated. Indeed, AvrLm4-7 suppresses Rlm3- and Rlm9-mediated resistance triggered by AvrLm3 and AvrLm5-9, respectively. The presence of AvrLm4-7 does not impede AvrLm3 and AvrLm5-9 expression, and the three AVR proteins do not appear to physically interact. To decipher the epistatic interaction between these *L. maculans* AVR effectors, we determined the crystal structure of AvrLm5-9 and obtained a 3D model of AvrLm3, based on the crystal structure of Ecp11-1, a homologous AVR effector candidate from *Fulvia fulva*. Despite a lack of sequence similarity, AvrLm5-9 and AvrLm3 are structural analogues of AvrLm4-7 (structure previously characterized). Structure-informed sequence database searches identified a larger number of putative structural analogues among *L. maculans* effector candidates, including the AVR effector AvrLmS-Lep2, all produced during the early stages of oilseed rape infection, as well as among effector candidates from other phytopathogenic fungi. These structural analogues are named LARS (for *Leptosphaeria* *Avi*Rulence and *Sup*pressing) effectors. Remarkably, transformants of *L. maculans* expressing one of these structural analogues, Ecp11-1, triggered oilseed rape immunity in several genotypes carrying *Rlm3*. Furthermore, this resistance could be suppressed by AvrLm4-7. These results suggest that Ecp11-1 shares a common activity with AvrLm3 within the host plant which is detected by Rlm3, or that the Ecp11-1 structure is sufficiently close to that of AvrLm3 to be recognized by Rlm3.

Author summary

An efficient strategy to control fungal diseases in the field is genetic control using resistant crop cultivars. Crop resistance mainly relies on gene-for-gene relationships between plant resistance (*R*) genes and pathogen avirulence (*AVR*) genes, as defined by Flor in the 1940s. However, such gene-for-gene relationships can increase complexity over the course of plant-pathogen co-evolution. Resistance against the plant-pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans* by *Brassica napus* and other *Brassica* species relies on the recognition of effector (*AVR*) proteins by *R* proteins; however, *L. maculans* produces an effector that suppresses a subset of these specific resistances. Using a protein structure approach, we revealed structural analogy between several of the resistance-triggering effectors, the resistance-suppressing effector, and effectors from other plant-pathogenic species in the Dothideomycetes and Sordariomycetes classes, defining a new family of effectors called LARS. Notably, cross-species expression of one LARS effector from *Fulvia fulva*, a pathogen of tomato, in *L. maculans* resulted in recognition by several resistant cultivars of oilseed rape. These results highlight the need to integrate knowledge on effector structures to improve resistance management and to develop broad-spectrum resistances for multi-pathogen control of diseases.

Introduction

Fungi are the most devastating pathogens of plants, including crops of major economic importance. They represent a recurrent threat to agriculture and possess extreme adaptive abilities, resulting in the constant disease outbreaks [1,2]. Host invasion relies on effectors, key elements of pathogenesis, that modulate plant immunity and facilitate infection [3,4]. Fungal effector genes are diverse and typically encode small proteins, predicted to be secreted, with no or few homologues present in sequence databases, and an absence of known sequence motifs. In most phytopathogenic fungi, no large effector gene families have been identified [5]. Notably, effectors can have a dual role in plant-pathogen interactions, both targeting plant components and being targeted by plant resistance (*R*) proteins. Such dual-role effectors are known as avirulence (*AVR*) proteins because, in the presence of a corresponding *R* protein, they render the pathogen that produces them avirulent. Recognition of a pathogen *AVR* protein triggers a set of immune responses grouped under the term Effector-Triggered

Immunity (ETI), frequently leading to a rapid localized cell death termed the hypersensitive response (HR) [6]. Breeding cultivars carrying *R* genes against pathogens is a common and powerful tool to control disease. However, the massive deployment of single *R* genes in the field exerts a strong selection pressure against avirulent pathogens that can become virulent through evolution of their *AVR* gene repertoire. Mechanisms leading to virulence include deletion, inactivation or down-regulation of the *AVR* gene, point mutations allowing recognition to be evaded while maintaining the virulence function of the *AVR* protein, or the acquisition of new effectors that suppress ETI [6–8]. Suppression of ETI by a fungal effector represents an efficient way to evade the selection pressure exerted by *R* genes in the field while maintaining the function of non-dispensable effectors. In some cases, the effector that suppresses ETI can itself be recognized by an *R* protein. A few examples of such strategies have been described in fungi [9–11], but the underlying mechanisms for the suppression of ETI by fungal effectors remain unexplained.

The Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*, causal agent of oilseed rape stem canker or blackleg disease, is one of the fungal pathogens in which suppression of ETI by the presence of an *AVR* gene has been demonstrated. *L. maculans* can be controlled by combining qualitative and quantitative resistance of the host plant [12]. To date, ten *AVR* genes (called *AvrLm*) recognized by the products of *R* genes (called *Rlm*) from *Brassica napus* or other *Brassica* species have been identified [13–17] and share common characteristics: they encode small secreted proteins with no or low homologies in sequence databases, are located in repeat-rich regions of the genome, and are specifically expressed during the early stages of leaf infection. Among them, *AvrLm4-7* suppresses *Rlm3*-mediated resistance triggered by *AvrLm3* and *Rlm9*-mediated resistance triggered by *AvrLm5-9* [9,14]. How *AvrLm4-7* suppresses *Rlm9*- and *Rlm3*-mediated disease resistance is not known: the presence of *AvrLm4-7* does not impede *AvrLm3* and *AvrLm5-9* expression, and yeast two-hybrid (Y2H) assays suggest the absence of a physical interaction between *AvrLm4-7*, *AvrLm5-9* and *AvrLm3*. While *AvrLm5-9* and *AvrLm3* share 29 % of amino acid sequence identity, a very low level of identity was found with *AvrLm4-7* (15 %). *AvrLm4-7* confers a dual recognition specificity by two distinct *R* proteins of oilseed rape, *Rlm4* and *Rlm7* [18], and loss of *AvrLm4-7* is associated with a fitness cost [19,20]. *AvrLm5-9* and *AvrLm3*, on the other hand, are always present in *L. maculans* isolates, and only point mutation polymorphisms were reported, suggesting a high importance of these two effectors in pathogenicity towards *B. napus* [14,21,22]. Moreover, the silencing of *AvrLm3* led to a reduced aggressiveness [9].

Elucidation of the 3D structures of effectors may provide an effective strategy to resolve functional traits. Indeed, structure determination of effectors and the proteins with which they interact has provided key advances in our understanding of plant-pathogen interactions, including: the identification of protein functions that were not apparent from sequence analysis alone, the visualization of molecular interfaces of relevance to pathogen virulence and to plant immunity, and the identification of structural homologies in effectors that were not visible by sequence comparisons (reviewed in [23]). The crystal structure of AvrLm4-7 did not reveal similarities with documented effectors, but suggested a positively charged surface patch could be involved in AvrLm4-7 translocation into the cytoplasm of plant cells [24]. AvrLm4-7 escapes Rlm4-mediated recognition through a single point mutation [18] and Rlm7-mediated recognition through more drastic DNA changes (gene deletion, accumulation of mutations) or point mutations [25]. Blondeau *et al.* [24] identified a protein region involved in Rlm4-mediated recognition, and two regions involved in Rlm7-mediated recognition.

Here we describe the 3D structures of AvrLm5-9 and AvrLm3, whose recognition by Rlm9 and Rlm3, respectively, is masked by the presence of AvrLm4-7. Surprisingly, despite low sequence similarity, AvrLm5-9 and AvrLm3 are structural analogues of AvrLm4-7, sharing an anti-parallel β -sheet covered by α -helices. Structure-informed and pattern-based searches identified a larger number of putative structural analogues among AVR effectors and effector candidates of *L. maculans*, but also of other phytopathogenic fungi, including Ecp11-1 from the biotrophic tomato leaf mold fungus *Fulvia fulva* (formerly *Cladosporium fulvum*). Remarkably, transformants of *L. maculans* producing *F. fulva* Ecp11-1 triggered Rlm3-mediated immunity and this resistance could be suppressed by AvrLm4-7. These findings will enable hypotheses to be made about the way effectors suppress ETI and can guide recommendations on how to use plant R genes targeting AVRs belonging to structural families of effectors.

Results

- Determination of the 3D structures of AvrLm5-9 and AvrLm3

To explore the putative molecular relationships between AvrLm4-7, AvrLm5-9 and AvrLm3, we set out to determine the 3D structures of the AvrLm3 and AvrLm5-9 effectors. AvrLm5-9 and AvrLm3 are rich in cysteines and therefore are difficult to express in soluble form in *Escherichia coli*. For the recombinant production of AvrLm5-9 and AvrLm3, we therefore chose the well-established *Pichia pastoris* eukaryotic expression system. The genes coding

for the AvrLm5-9 and AvrLm3 proteins without their secretion signal peptides were cloned into expression vectors as fusion proteins with a purification His-tag and with thioredoxin. A TEV proteolytic cleavage site was inserted between thioredoxin and the effectors. The AvrLm5-9 fusion protein was well expressed and purified to homogeneity (Fig S1), but the yields of the AvrLm3 fusion protein were insufficient (*i.e.* about 50 mg of pure AvrLm5-9 per liter of cell culture against less than 1 mg of purified AvrLm3).

A small secreted protein with 37 % amino acid sequence identity with AvrLm3 was identified from *F. fulva* [26]. This protein, named Ecp11-1 (Extracellular protein 11-1), was found in apoplastic washing fluid samples harvested from compatible *F. fulva*–*Solanum lycopersicum* (tomato) interactions. Curiously, Ecp11-1 triggers an HR in multiple wild accessions of tomato. It is therefore likely that Ecp11-1 is an AVR effector recognized by a corresponding R protein (tentatively named Cf-Ecp11-1) in wild accessions of tomato [26]. We decided to produce Ecp11-1 using the same *P. pastoris*-based strategy as described for AvrLm5-9 and AvrLm3. The yields of Ecp11-1 production were sufficient to start structural studies (Fig S1, *i.e.* about 5 mg of purified Ecp11-1 per liter of cell culture).

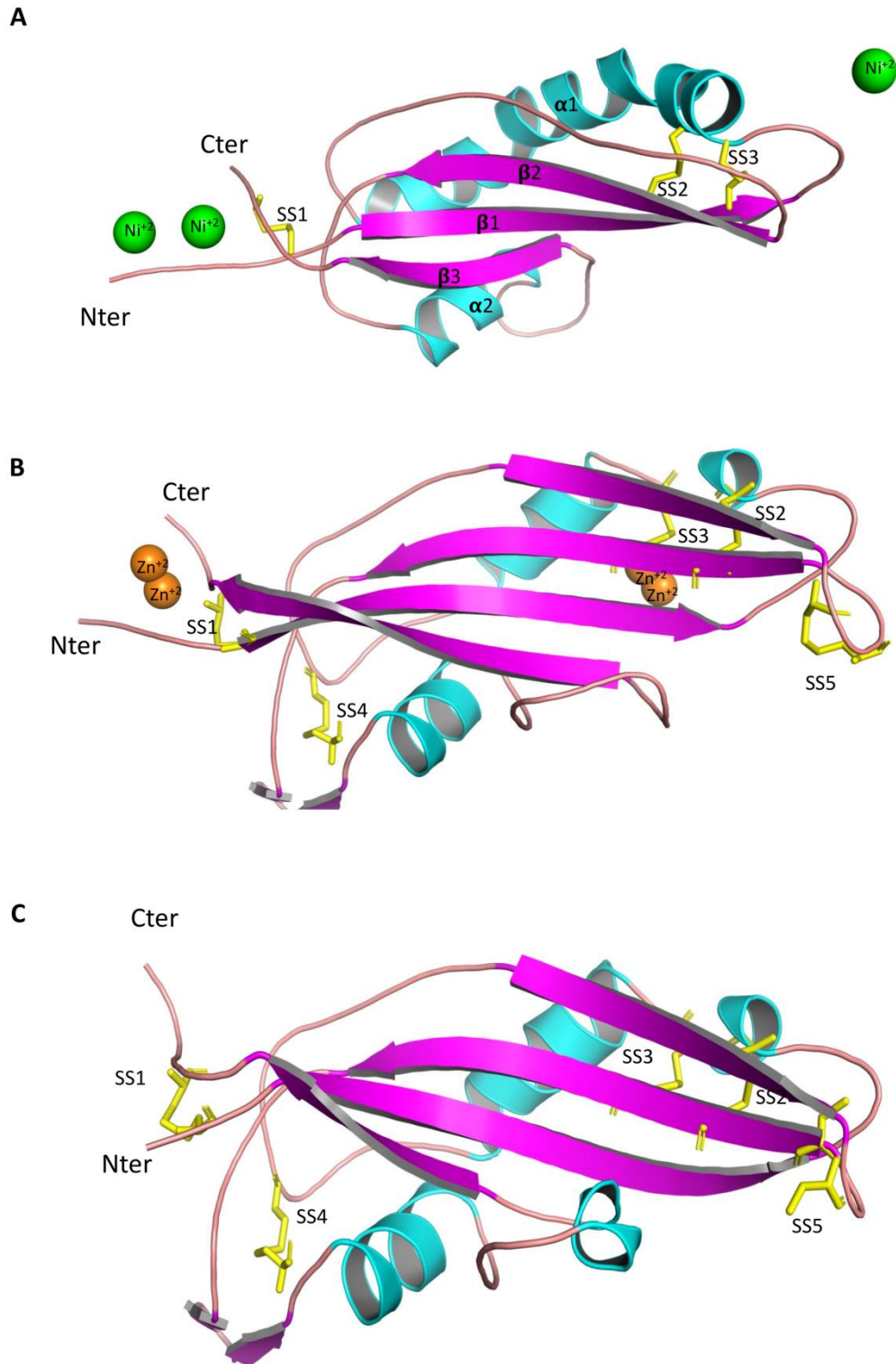


Fig 1. Crystal structures of AvrLm5-9 and Ecp11-1 and a 3D-model of AvrLm3.

The proteins are represented as cartoons and coloured by secondary structure (α -helix in cyan, β -strand in magenta). N- and C-termini are labelled. The S-S bonds are represented by yellow sticks, and are numbered (numbering refers to sequence alignment in figure 2A). (A) Structure of AvrLm5-9. Ni^{+2} ions involved in crystal packing are shown as green spheres. (B) Structure of ECP11-1. Zn^{+2} ions involved in crystal packing are shown as orange spheres. (C) Swiss-Model structure of AvrLm3. The AvrLm3 amino acid sequence and the Ecp11-1 X-ray structure were used to compute the AvrLm3 three-dimensional model.

After cleavage by the TEV protease and removal of thioredoxin, both AvrLm5-9 and Ecp11-1 provided good quality crystals. The structure of AvrLm5-9 was solved using iodine single wavelength anomalous diffraction (SAD) signal from a derivative crystal and then refined at 2.14 Å resolution using native data (Table S1). The crystallization liquor of AvrLm5-9 contained 80 mM of Ni²⁺ ions that proved mandatory for obtaining crystals. The structure revealed the presence of three Ni²⁺ ions that are involved in crystal contacts: two are found at the N- and C-termini of AvrLm5-9 as a ligand with two histidines from the native protein, by one histidine from a linker peptide and one from a crystal neighbor. The third Ni²⁺ ion is bound at the opposite end, and also interacts with histidines from two neighboring copies of AvrLm5-9 in the crystal. This suggests the bound Ni²⁺ ions are a crystallographic artefact. The complete AvrLm5-9 sequence could be placed into the electron density, which also accounted for two residues from the linker peptide at the N-terminus. The structure of AvrLm5-9 consists of a central β-sheet made of three anti-parallel β-strands (Fig 1A). An elongated peptide (residues 54 to 64) runs anti-parallel to β-strand 2, but only establishes a few main-chain H-bonds, and therefore is not categorized as a β-strand. One face of the β-sheet is covered by the long connections between the stands. The connection between the β1 and β2 strands is a curved α-helix and the connection between the β3 and β4 strands contains a shorter helix surrounded by two irregular peptide loops. AvrLm5-9 has three disulfide bridges, which are C³-C¹¹⁹, C²²-C⁶⁹ and C²⁶-C⁷¹, named SS1, SS2 and SS3, respectively, according to protein numeration without the signal peptide (Fig 2) or C²²-C¹³⁸, C⁴¹-C⁸⁸ and C⁴⁵-C⁹⁰ according to protein numeration with the signal peptide. The SS1 bridge knits the N- and C-termini together, while the other two disulfide bridges fix the long helix onto the β-sheet.

The presence of a metal, in this case Zn²⁺, was also mandatory for the crystallization of Ecp11-1. Speculating that the Ecp11-1 crystal would also bind a bivalent ion, we successfully solved its structure at 1.6 Å resolution by using the SAD-signal of Zn²⁺. The crystals contained one copy of Ecp11-1 in the asymmetric unit. The complete sequence could be positioned into the electron density. The analysis of the anomalous signal revealed the presence of two Zn-clusters in the structure that resemble those of the Ni-ions in AvrLm5-9. One Zn-cluster is bound near the N- and C-termini and involves histidines from the native protein and from the linker peptide and side chains from a crystal neighbor. Another Zn-cluster is found at the opposite end and is composed by residues emanating from neighboring Ecp11-1 molecules. Ecp11-1 forms an anti-parallel four-stranded β-sheet with (+2,-1,-2)

topology (Fig 1B and 2C). Strands $\beta 1$ and $\beta 2$ are connected by a peptide composed of a helical turn and a short helix surrounded by irregular peptides. The long connection between strands $\beta 3$ and $\beta 4$ contains a β -hairpin, a short helix and some irregular peptide stretches. Ecp11-1 contains five disulfide bridges: C³-C¹³⁷ (named SS1) that connects the N- and C-termini, C²²-C⁷¹ (named SS2) and C²⁶-C⁷³ (named SS3) that link the $\beta 1$ - $\beta 2$ connection to strand $\beta 3$. The two remaining disulfide bridges (C⁴⁴-C⁹⁶ and C⁶²-C⁶⁵, named SS4 and SS5) (according to protein numbering in Fig 2) are found in the irregular loop regions.

AvrLm3 and Ecp11-1 share 37 % identity and 59% similarity, and there are only minor insertions/deletions between the two sequences. We consequently constructed a 3D-model of AvrLm3 using the Swiss-Model web server (<https://swissmodel.expasy.org/>). The sequence alignment and structure superposition show conservation of all 10 cysteines, suggesting both proteins form an identical set of disulfide bridges (Fig 1B and C).

- AvrLm4-7, AvrLm5-9, AvrLm3 and Ecp11-1 form a structural family

The sequence similarity between AvrLm5-9 and Ecp11-1/AvrLm3 is weak. The sequence similarity between AvrLm4-7 on the one hand and AvrLm5-9 and Ecp11-1 on the other is even weaker than between the latter two (Fig.2A-B). Nevertheless the 3D structures of all these effectors are strongly related: AvrLm5-9 and Ecp11-1/AvrLm3 share the same fold with AvrLm4-7 (Fig 2B), while it displays suppressive interactions with AvrLm5-9 and AvrLm3. Both AvrLm4-7 ($\beta 4$) and AvrLm5-9 ($\beta 2$) have an irregular β -strand, but these are oriented and positioned in the same way as the corresponding strands in Ecp11-1. To fully appreciate the similarities between the three effectors, we superposed their structures using the DALI webserver (<http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi/dali/>). Superposition of Ecp11-1 and AvrLm5-9 gives a Z-score of 8.9 and an RMSD value of 3.3 Å (106 residues aligned) and superposition of Ecp11-1 and AvrLm4-7 gives a Z-score of 5.6 and an RMSD value of 3.8 Å (106 residues aligned). The main differences between the three proteins are found in the regions connecting the strands (Fig 2B and 2C). The structures of the three effectors are stabilized by disulfide bridges, two of which are overlapping in the three proteins. All three effectors have a disulfide bridge that connects the N- and C-termini, and also at least one disulfide bridge that links the helical connection between $\beta 1$ - $\beta 2$ and strand $\beta 3$.

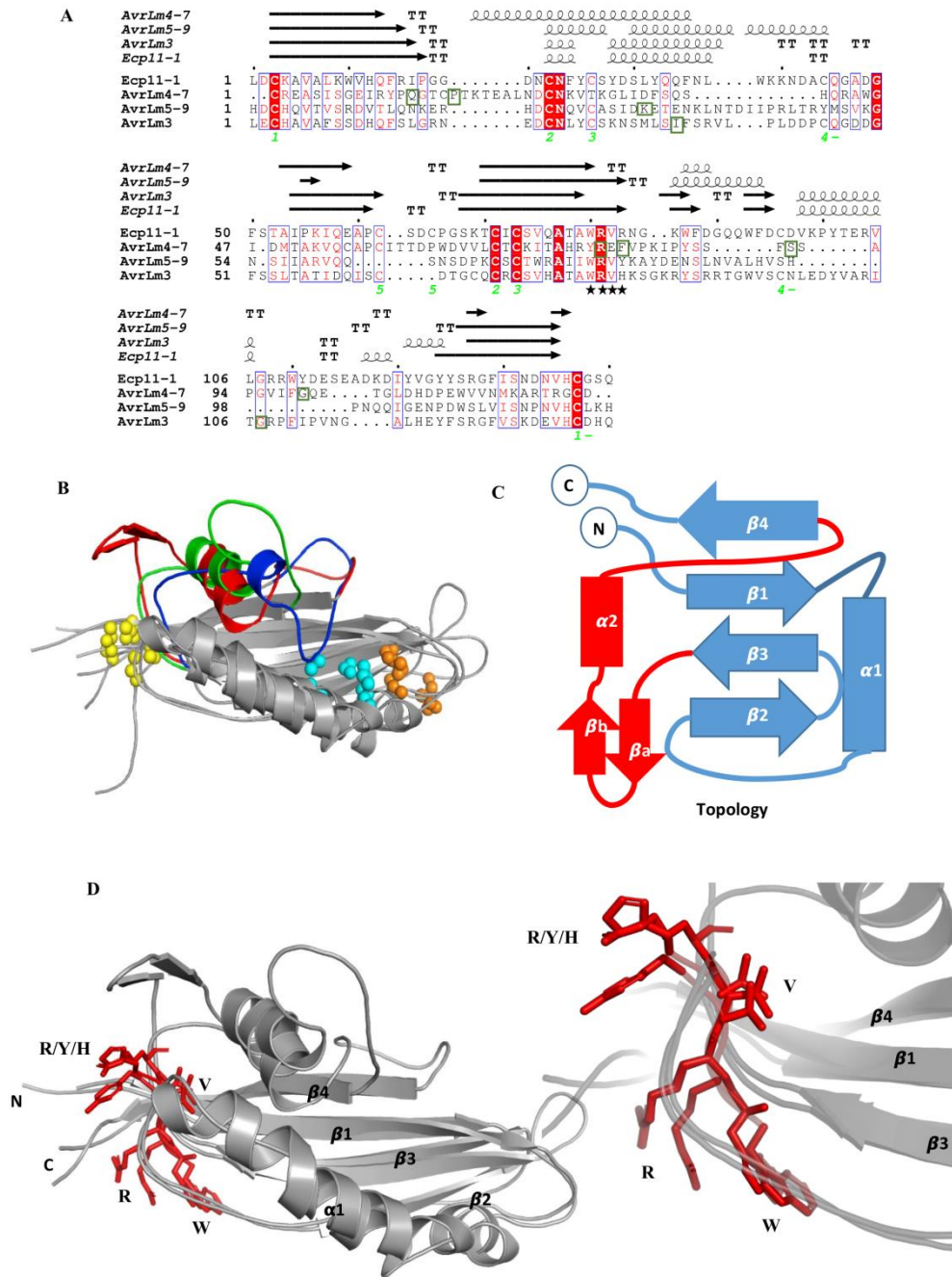


Fig 2. AvrLm4-7, AvrLm5-9, AvrLm3 and Ecp11-1 are structural analogues.

(A) Structure-based protein sequence alignment of AvrLm4-7, AvrLm5-9, AvrLm3 and Ecp11-1. The S-S bridges of Ecp11-1 are labelled green and numbered to show their connectivity. Secondary structure for each protein (β -sheets, α -helices, and β -turns are rendered as arrows, squiggles and TT letters respectively) is shown above the alignment. Identical residues are in red boxes and similar residues are in red. The conserved motif WR(F/L/V)(R/K) is labeled by black stars. The residues for whom mutations are associated with a switch to virulence are in green boxes. The Figure was made with the ESPript server [27]. (B) Superposition of AvrLm4-7, AvrLm5-9 and AvrLm3. The variable connections between β 3 and β 4 are coloured in red (AvrLm3), blue (AvrLm4-7) and green (AvrLm5-9). The conserved or neighbouring S-S bridges are indicated as yellow, orange and cyan spheres (indicated as 1, 2 and 3, respectively, in panel A). (C) Representation of conserved topology, with the variable connexion between β 3 and β 4 coloured in red. (D) Superposition of AvrLm5-9, Ecp11-1 and AvrLm3 (all in grey), with their conserved WR(F/L/V)(R/K) motif at the exit of β 3 represented by red sticks. A zoom on the motif is represented in the lower right corner.

A search in the Protein Data Bank (PDB) for structural analogues of Ecp11-1 and AvrLm5-9 using the DALI webserver returned AvrLm4-7 and the yeast elongation factor 1B. The latter protein (100 residues) indeed has the same β -sheet topology and similar connections, but shares no significant sequence identity with the effectors, has no disulfide bridges and the region of EF1B relevant for its function is not conserved in Ecp11-1 and AvrLm5-9. The similarity is therefore probably not biologically relevant.

- Polymorphic residues identified in *L. maculans* and *F. fulva* populations are mainly located on loop regions of AvrLm5-9, AvrLm3 and Ecp11-1

We then set out to identify regions putatively required for recognition by cognate R proteins by mapping polymorphic residues onto their respective structures. We therefore exploited previous population studies that had reported polymorphisms in AvrLm5-9, AvrLm3 and Ecp11-1. Only three polymorphic residues of AvrLm5-9 were reported in *L. maculans* populations [14,21]. One event caused a switch to virulence towards both *Rlm5* and *Rlm9* (R²⁹ to stop), a point mutation at residue R⁵⁵ to T or K leads to virulence towards *Rlm9* (K³⁶ according to the protein version and numbering in Fig 2, since the AvrLm5-9 protein whose structure was determined conferred virulence towards *Rlm9*). A third polymorphism had no effect on the interaction with *Rlm5* or *Rlm9* (R³⁸ to L) (R¹⁹ according to protein numbering in Fig 2). The stop mutation evidently leads to a truncated and non-functional protein. The two last polymorphic residues were mapped onto the AvrLm5-9 3D structure (Fig 3A). The mutation leading to virulence towards *Rlm9* is situated in the middle of the long helix, and the mutation having no effect on the interaction with *Rlm9* and *Rlm5* is in a loop connecting β 1 and β 2. Neither mutation is expected to perturb the 3D structure.

Sequencing of AvrLm3 in a collection of worldwide *L. maculans* isolates defined 22 different alleles, corresponding to 14 non-synonymous mutations leading to 11 isoforms of the protein [22]. We projected eight of the 11 polymorphic amino acids onto the AvrLm3 3D structure (the remaining three are located in the signal peptide and thus could not be plotted) (Fig 3B). Most of the AvrLm3 variants concern amino acid positions with surface-exposed side chains, and none of the variants affects the cysteines. Only one polymorphic substitution (L⁷⁸ to F) (L⁵⁴ according to protein numbering in Fig 2) is found in a residue involved in hydrophobic packing, but the mutation is conservative. These observations suggest that all alleles should lead to well-folded proteins. Six of the 11 AvrLm3 isoforms were only found in isolates avirulent towards *Rlm3*. These amino acids are scattered over the surface of the protein. Only two amino acid residues consistently differed between virulent and avirulent

isoforms: I/L⁵⁸H and G¹³¹R (I³⁴ and G¹⁰⁷ according to protein numbering in Fig 2). Of interest, amino acid residue I⁵⁸ is located in the same region of the structure in AvrLm3 as residue K⁵⁵ (responsible for the switch to virulence towards Rlm9) in the AvrLm5-9 structure. Similarly, residue G¹³¹ in AvrLm3 is located in the same region as residue G/R¹²⁰ in AvrLm4-7 (responsible for the switch to virulence towards Rlm4 [18]; Fig 3D; G⁹⁹ according to Fig 2).

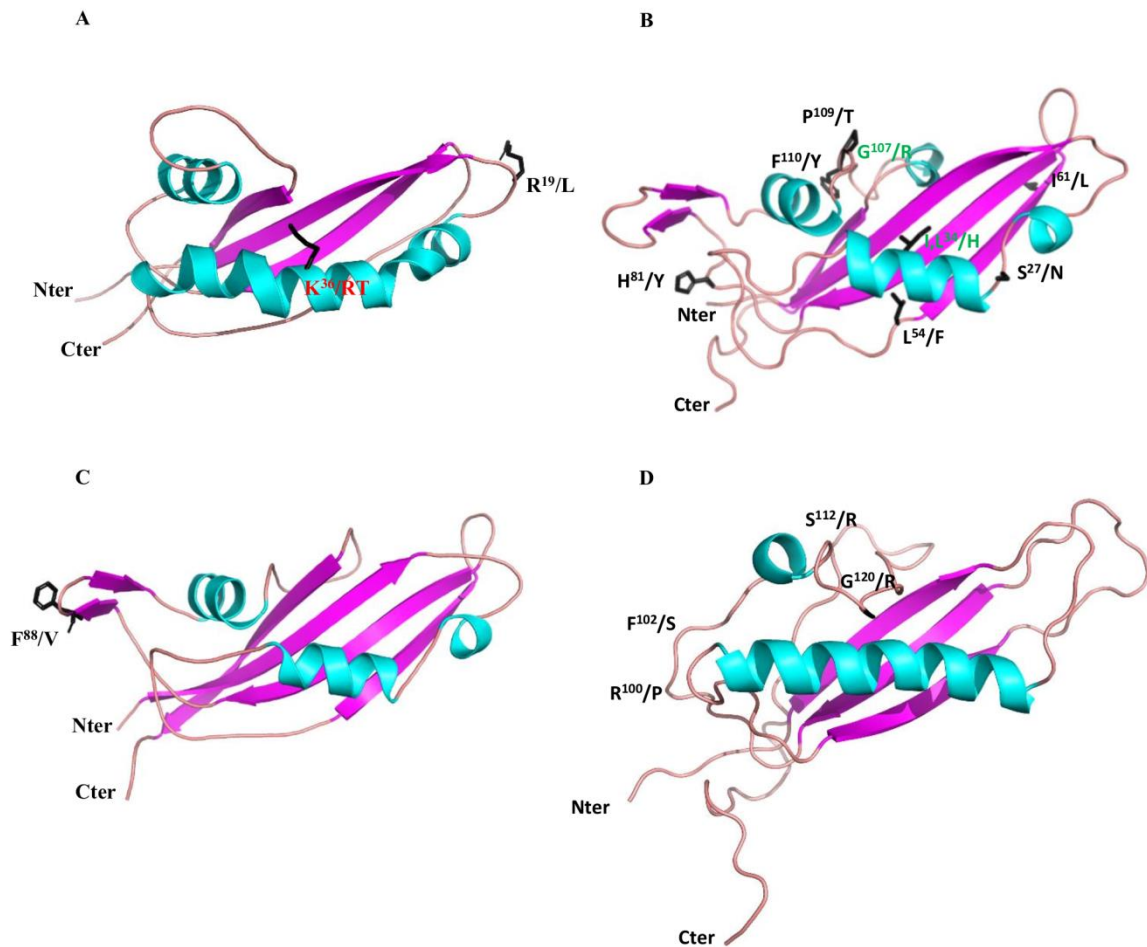


Fig 3. Localisation of polymorphic residues on the 3D structures of AvrLm5-9, AvrLm3, Ecp11-1 and AvrLm4-7.

Polymorphic residues were identified in populations of *L. maculans* ‘brassicae’ and *F. fulva*. (A) Positions of polymorphisms in AvrLm5-9 [14,21]. Amino acid change involved in virulence toward *Rlm9* is indicated in red. (B) Positions of polymorphisms in AvrLm3 [22]. Amino acid changes shared among isolates virulent toward *Rlm3* are indicated in green. (C) Polymorphism in Ecp11-1 [26]. It is currently unclear whether this variant impacts protein function. (D) Polymorphic positions in AvrLm4-7 leading to virulence towards *Rlm4* or *Rlm7* [18,24,25].

Interestingly, substitutions at I³⁴ and G¹⁰⁷ are always coupled and likely are responsible for the virulent phenotype towards *Rlm3*. They are positioned in the regions connecting the strands, and the folding brings them relatively close together in space, suggesting this site could be

important for its function. Remarkably, the positions in the 3D structures of the polymorphic residues G¹³¹R (AvrLm3, G¹⁰⁷ in Fig 3) and G¹²⁰R (AvrLm4-7; [24]) are very similar, suggesting the same protein regions could be involved in the virulence phenotype.

From a population study on a worldwide collection of *F. fulva* strains [26], a single non-synonymous F¹¹⁹V substitution was identified in Ecp11-1. W¹¹⁸, F¹¹⁹ and W¹²⁴ (W⁸⁷, F⁸⁸ and W⁹³ according to protein numbering in Fig 2) form an exposed hydrophobic surface patch contiguous to a conserved WR(F/L/V)(R/K) motif (see below for more information on this motif). It is not yet known whether this non-synonymous substitution affects the ability of Ecp11-1 to trigger an HR in tomato plants carrying the putative Cf-Ecp11-1 R protein (Fig 3C).

- Structural analogues of AvrLm4-7, AvrLm5-9 and Ecp11-1 are present in *Leptosphaeria maculans*

The strong structural similarities between AvrLm4-7, AvrLm5-9, AvrLm3 and Ecp11-1 suggest that these four proteins belong to a fungal effector family, characterized by a four-stranded β -sheet, an α -helix and three conserved disulfide bridges (Fig 2A and 2C). To identify other structurally related family members, a hidden Markov model (HMM)-based profile search was performed on the predicted protein repertoire from *L. maculans* (v23.1.3 isolate). An iterative search was carried out with each effector structure, using a cut-off E-value of 1 and an overlap cut-off of 50%. A total of three iterations were performed. At each iteration, proteins longer than 160 amino acids were removed. Seven potential structural analogues were found for AvrLm4-7, six for Ecp11-1 and four for AvrLm5-9. The search with Ecp11-1 retrieved both AvrLm3 and AvrLm4-7, the remaining four were also found with the search using AvrLm4-7. The search with AvrLm5-9 retrieved AvrLm3 together with other candidates that were not found with AvrLm4-7 or Ecp11-1, including the AVR protein AvrLmS-Lep2 (Table 1; [16]). A total of thirteen structural analogues were thus identified in *L. maculans* (Table 1).

Table 1. Characteristics of the structural analogues identified in *L. maculans*

Accession number ^a	Size (aa)	Cysteine number ^b	Localization ^c	Genomic context ^c	Signal peptide ^d	Structure allowing identification ^e		
						AvrLm5-9	Ecp11-1	AvrLm4-7
<i>Lmb_jn3_00001</i> (<i>AvrLm3</i>)	160	10	BAC01	TE-rich	Yes	X	X	
<i>Lmb_jn3_01426</i>	139	6	SC1	Gene-rich	Yes		X	X
<i>Lmb_jn3_01427</i>	137	8	SC1	Gene-rich	Yes		X	X
<i>Lmb_jn3_01428</i>	130	8	SC1	Gene-rich	Yes		X	X
<i>Lmb_jn3_03262</i> (<i>AvrLm4-7</i>)	143	8	SC3	TE-rich	Yes		X	X
<i>Lmb_jn3_03263</i>	142	8	SC3	Gene-rich	Yes			X
<i>Lmb_jn3_03815</i>	140	8	SC3	TE-rich	Yes	X		
<i>Lmb_jn3_08343</i> (<i>AvrLmS-Lep2</i>)	141	8	SC9	TE-rich	Yes	X		
<i>Lmb_jn3_08418</i>	138	6	SC10	TE-rich	Yes			X
<i>Lmb_jn3_08419</i>	174	8	SC10	TE-rich	No		X	X
<i>Lmb_jn3_08421</i>	127	8	SC10	TE-rich	Yes			X
<i>Lmb_jn3_10106</i> (<i>AvrLm5-9</i>)	141	7	SC12	TE-rich	Yes	X		
<i>Lmb_jn3_12986</i>	143	8	SC18	TE-rich	Yes	X		

^aWhen the gene corresponds to a known avirulence gene, it is indicated.

^bThe number of cysteines is calculated on the mature protein without the signal peptide.

^cThe localization of the different genes is based on the latest *L. maculans* genome assembly [28].

SC: Super Contig. BAC: Bacterial Artificial Chromosome. TE: Transposable Element.

^dSignal peptide was predicted using SignalP 4.1 [29].

^eStructure which allowed retrieval of the structural analogue through HMMER search [30].

We then wanted to confirm that the retrieved protein analogues have similar structures. We therefore constructed 3D structural models of the different analogues found by the HMM search using the alphaFold program via the colab server (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>; [31]). For all retrieved sequence analogues, alphaFold proposed models that had the same fold as AvrLm4-7 (with the exception of Lmb_jn3_08343 and Lmb_jn3_12986 for which no reliable models could be proposed; Fig S3). Moreover, the cysteine bridges in all these models were superposable. We conclude that these sequences possess the same fold characterized by an antiparallel β -sheet and a characteristic set of disulfide bonds. This suggests they form a homologous family that we will name from this point forward as the LARS (for Leptosphaeria AviRulence and Suppressing) effector family.

- LARS effectors of *L. maculans* share common characteristics and are expressed in *planta*

The characteristics of LARS structural analogues identified in *L. maculans* using a HMM search are summarized in Table 1. The genomic location of the genes encoding structural analogues was investigated using the latest assembly of the *L. maculans* genome [28]. The majority of these genes are located in genomic regions rich in remnants of transposable elements, with the exception of a group of three neighboring genes (*Lmb_jn3_01426*, *Lmb_jn3_01427* and *Lmb_jn3_01428*), located in a gene-rich region, and a gene that had been previously described as a paralogue of AvrLm4-7 (*Lmb_jn3_03263*; [18]), which is located at the border of a gene-rich region. These genes are mostly located on different Super Contigs. However, several genes are neighbours. This is the case for (i) *Lmb_jn3_01426*, *Lmb_jn3_01427* and *Lmb_jn3_01428*; (ii) *Lmb_jn3_08418*, *Lmb_jn3_08419* and *Lmb_jn3_08421*; (iii) *Lmb_jn3_03262* (AvrLm4-7) and *Lmb_jn3_03263*. The average size of these proteins is 140 amino acids, and they all have between six and 10 cysteines. For the whole family, apart from *Lmb_jn3_08419*, we were able to predict a signal peptide, suggesting that these proteins are secreted by the fungus.

RNAseq data corresponding to different stages of infection of oilseed rape cotyledons by *L. maculans* as well as during axenic growth of *L. maculans* on V8 solid medium were recently generated [32], and expression kinetics of the LARS effector genes analyzed (Fig 4). All the genes showed over-expression during the biotrophic / asymptomatic phase of cotyledon

infection. A closer examination of the expression profiles distinguished three different patterns.

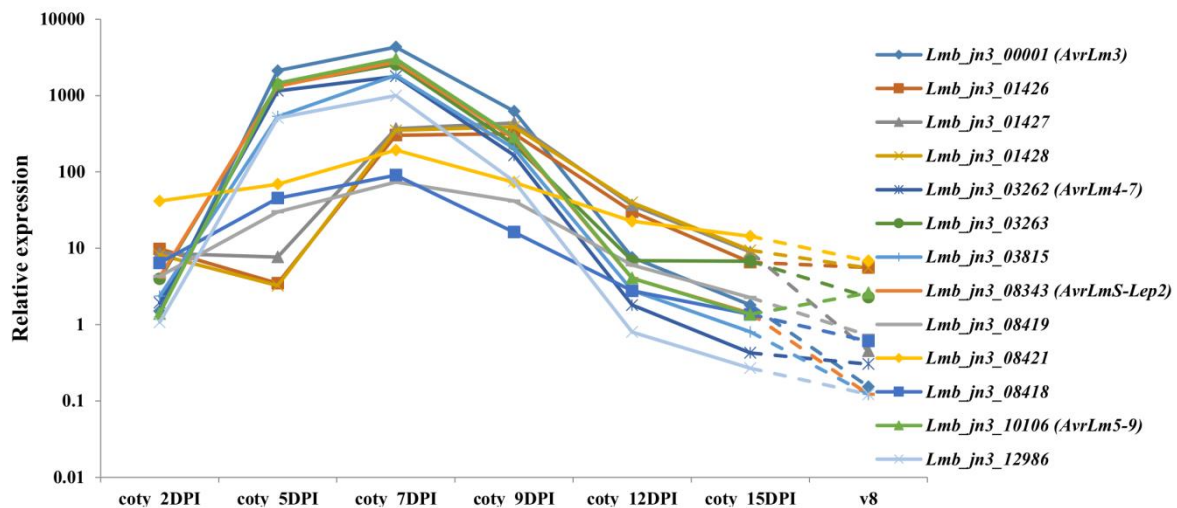


Fig 4. Expression kinetics of the LARS structural analogues identified in *L. maculans* ‘brassicae’.

Expression is based on RNAseq data described in [32] normalized by the total number of sequences per condition, counts per million (CPM), and represented on a logarithmic scale, following inoculation of cotyledons from a susceptible oilseed rape cultivar, Darmor-Bzh. Coty (cotyledons of the susceptible oilseed rape cultivar, Darmor-Bzh infected by *L. maculans* ‘brassicae’ 2, 5, 7, 9, 12 and 15 days post-inoculation (DPI)); v8 (growth on solid medium V8 for one week).

The first pattern represented genes that were highly expressed as early as 5 days post-inoculation(DPI) with a peak at 7 DPI, and included the AVR genes of the family: *Lmb_jn3_00001* (*AvrLm3*), *Lmb_jn3_03262* (*AvrLm4-7*), *Lmb_jn3_03263*, *Lmb_jn3_03815*, *Lmb_jn3_08343* (*AvrLmS-Lep2*), *Lmb_jn3_10106* (*AvrLm5-9*) and *Lmb_jn3_12986*. The second pattern of genes was characterized by a low expression at 5 DPI and a plateau between 7 and 9 DPI: *Lmb_jn3_01426*, *Lmb_jn3_01427* and *Lmb_jn3_01428*. The last pattern grouped genes whose expression peaked lower at 7 days post-inoculation: *Lmb_jn3_08418*, *Lmb_jn3_08419* and *Lmb_jn3_08421*. Of interest, genes with the same expression profile are neighbors in the *L. maculans* genome. Finally, on V8 medium, all the genes were very lowly expressed, which indicates that they are overexpressed during the primary infection of oilseed rape by *L. maculans*.

- LARS effectors are present in other phytopathogenic fungi

To find out whether the LARS effector family has members in other fungi, a new HMM-based profile search was performed on an in-house database, composed of annotated proteomes of 163 fungal strains, corresponding to 116 species, mostly Dothideomycetes and Sordariomycetes with contrasting lifestyles (phytopathogens, entomopathogens, endophytes, saprophytes, mycoparasites, Table S3). The in-house database was iteratively searched with each effector structure file, using a cut-off E-value of 1 and a cut-off overlap of 50 %. At each iteration, proteins longer than 160 amino acids were removed. This HMM-search identified, after three iterations, 34 potential structural analogues using AvrLm4-7, 32 with Ecp11-1 and two using AvrLm5-9. Interestingly, Ecp11-1 was found using AvrLm5-9 as a template, but not using AvrLm4-7. Combined with the analogues found in *L. maculans* 'brassicae', 49 non-redundant proteins were identified (Fig 5). These potential structural analogues originate from 13 fungal species, with the majority from species closely related to *L. maculans* 'brassicae' (*L. maculans* 'lepidii', *L. biglobosa* 'brassicae' and *L. biglobosa* 'thlaspii'), Dothideomycetes (*Macrophomina phaseolina*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *P. teres*, *Corynespora cassiicola*, *Stemphylium lycopersici* and *F. fulva*), and a few Sordariomycetes (*Colletotrichum orbiculare*, *C. gloeosporioides* and *C. higginsianum*; Fig 5A, Fig S2 and Table S3).

A sequence logo derived from the multiple alignment of the structural analogues highlighted conserved features of the LARS effectors (Fig 5B). Although the number of cysteines is variable between the different members, six cysteines can be aligned between the majority of the LARS members. The cysteines near the N- and C-termini form a disulfide bridge in all available structures, and this is likely the case for all of the proteins identified. The remaining aligned cysteines are not always involved in superimposable disulfide bridges in the three available structures. All structures have a putative disulfide bridge that connects α -helix 1 to β -strand 3. The third conserved cysteine pair establishes a different disulfide bridge, however, in AvrLm4-7 on the one hand and AvrLm5-9, Ecp11-1 and AvrLm3 on the other (Fig 2A). Apart from the cysteines, a WR(F/L/V)(R/K) sequence motif is very well conserved in all sequences (Fig 2D), positioned at the exit of the third β strand. The motif on one side crosses the disulfide bridge that connects the N- and C-termini, and on the other lies against the α -loop that precedes the second strand. Residues of this strand are less well conserved.

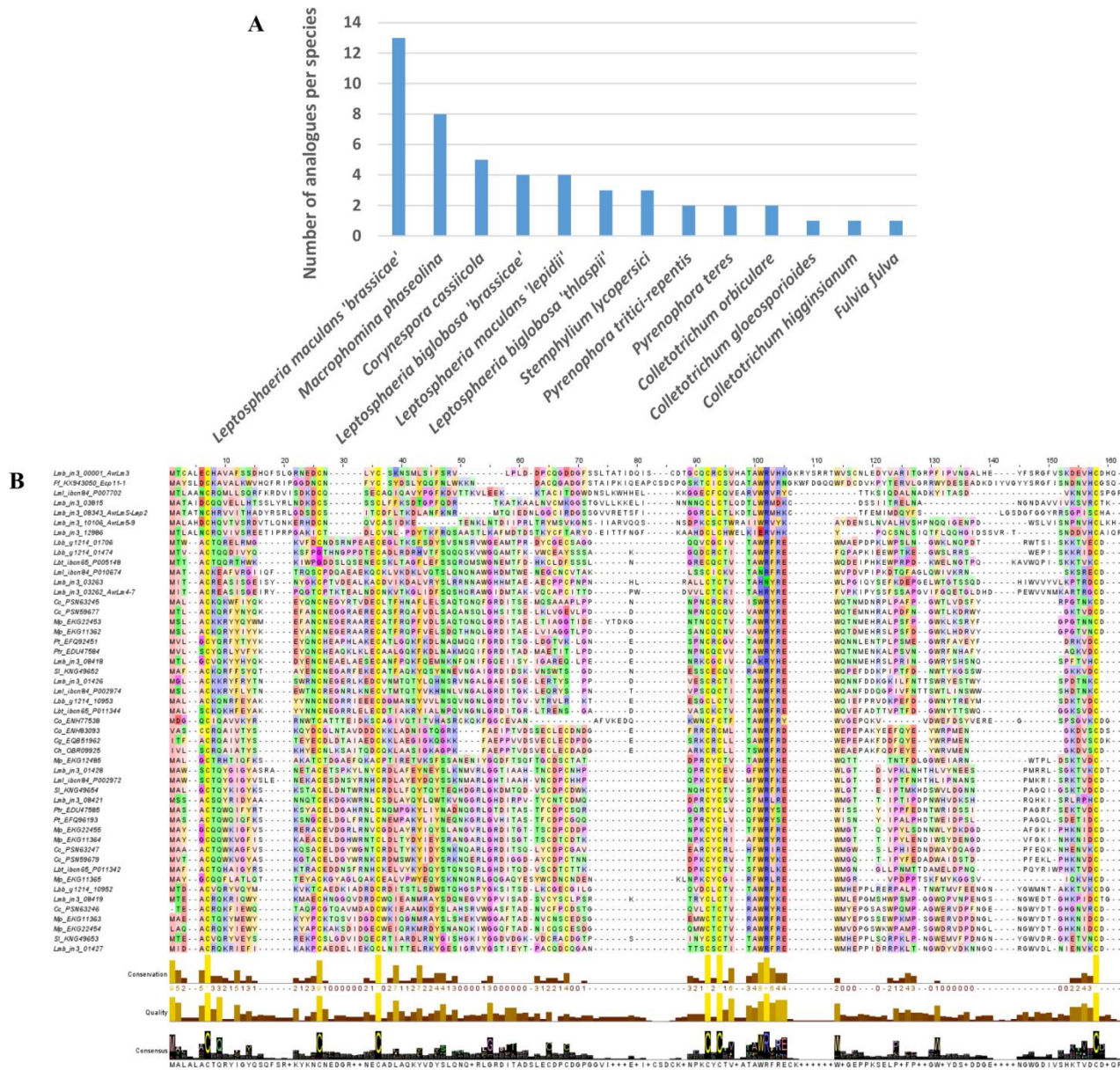


Fig. 5. Identification of LARS effector structural analogues in *L. maculans* ‘brassicae’ and other phytopathogenic fungi.

(A) Species distribution of number of structural analogues of AvrLm4-7, AvrLm5-9 and Ecp11-1 found with a low-stringency HMM search on a database encompassing 163 predicted proteomes of 116 fungal species. (B) Multiple sequence alignment of the 50 potential structural analogues and the sequences of the known structures (AvrLm4-7=4fprA / AvrLm5-9=0a59A / Ecp11-1=0cp1A). The secondary structures of the latter were calculated using the software STRIDE and were added at the bottom of the alignment (H=helix, G=3-10 helix, E=β strand, B=β bridge, C=coil, T=turn) above the residue conservation measure, the local alignment quality and the consensus logo. The alignment was displayed using the software Jalview. In the displayed alignment, amino acids which do not align with any of the three sequences AvrLm4-7, AvrLm5-9 and Ecp11-1 have been removed.

Cg, *Colletotrichum gloeosporioides*; Ch, *Colletotrichum higginsianum*; Co, *Colletotrichum orbiculare*; Cc, *Corynespora cassiicola*; Ff, *Fulvia fulva*; Lbb, *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’; Lbt, *Leptosphaeria biglobosa* ‘thlaspii’; Lmb, *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’; Lml, *Leptosphaeria maculans* ‘lepidii’; Mp, *Macrophomina phaseolina*; Pt, *Pyrenophora teres*; Ptr, *Pyrenophora tritici-repentis*; Sl, *Stemphylium lycopersici*

Remarkably, the tryptophan residue of the motif is fully exposed to the solvent. The F/L/V residue fits into the hydrophobic core of the protein. The conservation of the motif and its exposure on the surface suggest that it might be involved in a functional interaction.

- Mutations in the WR(F/L/V)(R/K) conserved motif in AvrLm4-7 contribute to abolish its ability to suppress Rlm3-mediated recognition, but only when AvrLm4-7 escapes both Rlm7 and Rlm4-mediated recognition

We investigated whether the WR(F/L/V)(R/K) sequence motif, which is well conserved within the LARS structural family, could be involved in the ability of AvrLm4-7 to suppress recognition of AvrLm3 by Rlm3. Previous studies performed site-directed mutagenesis on AvrLm4-7 residues to investigate its ability to suppress the recognition of AvrLm3 by Rlm3 and to trigger Rlm7 and Rlm4-mediated immunity [22,24]. We extended these data with additional mutagenesis experiments (Table 2 and Fig S4). Mutagenesis was performed on an allele of AvrLm4-7 conferring both Rlm7 and Rlm4-mediated recognition or only Rlm7-mediated recognition (G¹²⁰R mutation). Mutations R¹⁰⁰P and F¹⁰²S led to a switch to virulence towards *Rlm7* cultivar and abolished the ability of AvrLm4-7 to suppress Rlm3-mediated recognition of AvrLm3, but only in a G¹²⁰R context, suggesting that both R¹⁰⁰ or F¹⁰² and G¹²⁰ are necessary to mask AvrLm3 recognition and induce *Rlm7* immunity. In contrast, mutation S¹¹²R, located close to G¹²⁰, was sufficient to escape Rlm4 and Rlm7-mediated recognition and abolish the ability of AvrLm4-7 to suppress Rlm3-mediated recognition of AvrLm3.

Table 2: Interaction phenotypes on *Brassica napus* resistant genotypes of *Leptosphaeria maculans* wild-type or transformed isolates with different site-directed mutagenized alleles of *AvrLm4-7*

Isolate	Interaction Phenotype on			Reference
	<i>Rlm3</i>	<i>Rlm4</i>	<i>Rlm7</i>	
G06-E107	A	V	V	[25]
G06-E107-AvrLm4-7	V	A	A	[22]
G06-E107-AvrLm4-7 G ¹²⁰ R	V	V	A	[22]
G06-E107-AvrLm4-7R ¹⁰⁰ P	V	A	A	This study
G06-E107-AvrLm4-7R ¹⁰⁰ P G ¹²⁰ R	A	V	V	[22,24]
G06-E107-AvrLm4-7 F ¹⁰² S	V	A	A	This study
G06-E107-AvrLm4-7 F ¹⁰² S G ¹²⁰ R	A	V	V	[24]; this study
G06-E107-AvrLm4-7S ¹¹² R	A	V	V	This study
G06-E107-AvrLm4-7S ¹¹² R G ¹²⁰ R	A	V	V	[22,24]

- A structural analogue from *F. fulva* triggers recognition by oilseed rape R protein Rlm3, and this recognition is masked by the presence of AvrLm4-7

In an attempt to determine whether members of the LARS family from other phytopathogenic fungi are recognized by R proteins from oilseed rape and whether that recognition could be masked by AvrLm4-7, we set out to determine whether Rlm3 can recognize Ecp11-1 of *F. fulva*, and if so, whether AvrLm4-7 can ‘hide’ Ecp11-1 from Rlm3-mediated recognition.

As a first stage, a construct containing the *ECP11-1* coding sequence and terminator under the control of the *AvrLm4-7* promoter was introduced via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation into two isolates virulent towards *Rlm3*, *Rlm4* and *Rlm7*: Nz-T4 and v45.15. The corresponding transformants (10 Nz-T4-*ECP11-1* and 9 v45.15-*ECP11-1*) were inoculated onto *B. napus* cvs Pixel (*Rlm4*) and 15.22.4.1 (*Rlm3*; Fig 6). All transformants, as the wild type isolates, were virulent on Pixel. In contrast, and differing from their parental isolates, all transformants were avirulent on 15.22.4.1. We conclude that Ecp11-1, like AvrLm3, can be recognized by Rlm3. To confirm this result, we inoculated five transformants on two additional and unrelated oilseed rape cultivars carrying *Rlm3* (Grizzly and Columbus) and confirmed a resistance phenotype on these cultivars triggered by Ecp11-1 (Fig S5). Moreover, we also inoculated the transformants on the oilseed rape line 15.23.4.1, a sister line of 15.22.4.1 also issued from individual plants from cv. Rangi, carrying *Rlm7* instead of *Rlm3*, and obtained a susceptibility phenotype (Fig S5). These results support our conclusions that Ecp11-1 can be recognized by Rlm3.

At a second stage, we introduced *ECP11-1* into isolate IBCN18, which is virulent towards *Rlm3* and avirulent towards *Rlm4* and *Rlm7* (carrying a functional allele of *AvrLm4-7*) in order to test whether AvrLm4-7 was able to mask Ecp11-1 recognition by Rlm3. Nine IBCN18-*ECP11-1* transformants were obtained. All transformants, as IBCN18, were avirulent on Pixel and virulent on 15.22.4.1 (Fig 6), suggesting that AvrLm4-7 is masking Rlm3-mediated recognition of Ecp11-1.

Finally, we complemented one Nz-T4-*ECP11-1* transformant (number 3) with *AvrLm4-7*. Four Nz-T4-*ECP11-1-AvrLm4-7* transformants were obtained. They were avirulent on Pixel, confirming that *AvrLm4-7* was expressed in the transformants. Contrasting with Nz-T4-*ECP11-1* transformants, the Nz-T4-*ECP11-1-AvrLm4-7* transformants were able to cause disease on cultivar 15.22.4.1, confirming that the presence of *AvrLm4-7* is masking Rlm3-mediated recognition of Ecp11-1.

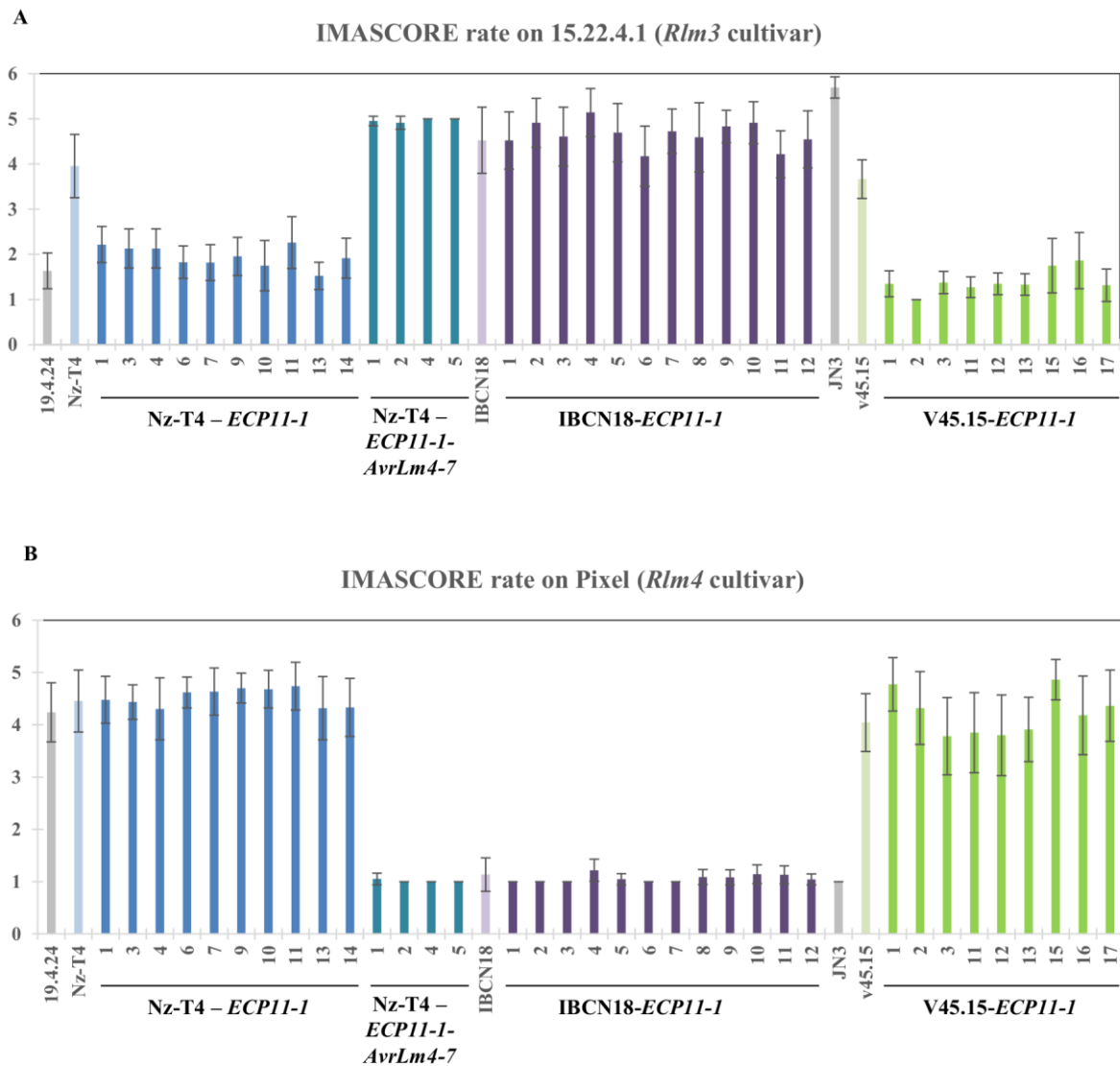


Fig 6. Ecp11-1 of *F. fulva* triggers Rlm3-mediated recognition in *L. maculans*, masked by AvrLm4-7.

Wild type isolates Nz-T4 (a3a4a7), IBCN18 (a3A4A7) and v45.15 (a3a4a7), as well as Nz-T4, IBCN18 and v45.15 transformants carrying *ECP11-1*, and Nz-T4 transformants carrying both *ECP11-1* and *AvrLm4-7* were inoculated onto cotyledons of a cultivar carrying *Rlm3* (15.22.4.1, A) or *Rlm4* (Pixel, B). Pathogenicity was measured 13 days post-inoculation. Results are expressed as a mean scoring using the IMASCORE rating comprising six infection classes (IC), where IC1 to IC3 correspond to resistance, and IC4 to IC6 to susceptibility [33]. Error bars indicate the standard deviation of technical replicates. 19.4.24 (A3a4a7) and JN3 (a3A4A7) were used as controls of the AvrLm3/Rlm3, and AvrLm4-7/Rlm4 and Rlm7 interaction phenotypes, respectively.

Discussion

In this study, we determined the crystal structure of *L. maculans* AvrLm5-9 and *F. fulva* Ecp11-1, and obtained a good quality model for AvrLm3 built via the crystal structure of Ecp11-1. Despite their poor sequence similarity, these three effectors are structural analogues of AvrLm4-7. All have a four-stranded β -sheet and helical connections with the same topology. The main differences reside in the conformations of the connections between the strands. Six cysteines involved in disulfide bridges are shared by the three effectors. One disulfide bridge ties together the N- and C-terminal regions, and two others connect the main helical region to the β -sheet. Structure-based pattern searches identified a large number of LARS effector candidates displaying sequence diversity, but likely sharing the same fold. Sequence alignment and 3D model superposition obtained using alphaFold of these candidates shows the strong conservation of six cysteines, which are involved in the aforementioned structure stabilizing disulfide bridges. All of the retrieved sequence analogues are likely compatible with the structures, as confirmed by the structure prediction server I-TASSER. The alignment of the putative analogues highlights a conserved sequence patch, WR(F/L/V)(R/K), with (F/L/V) being a hydrophobic/aromatic residue. These residues are situated at the end of the third β -strand, close to the N and C termini. The tryptophan and arginine are solvent exposed and could provide an interaction surface with plant targets. The hydrophobic (F/L/V) residue is involved in hydrophobic packing of this patch against the β -sheet. Interestingly, site-directed mutagenesis of R¹⁰⁰ or F¹⁰² residues resulted in the loss of Rlm7-mediated recognition and abolished the ability of AvrLm4-7 to mask the recognition of AvrLm3 by Rlm3. The latter, however, only occurred in combination with the G¹²⁰R mutation which allowed the effector to escape Rlm4-mediated recognition. In contrast to these results, a mutation at residue S¹¹² allowed AvrLm4-7 to escape Rlm4 and Rlm7-mediated recognition but also abolished the ability of this effector to mask AvrLm3 from Rlm3-mediated recognition. The polymorphic residues identified in AvrLm5-9 and AvrLm3 from *L. maculans* populations and on Ecp11-1 from *F. fulva* isolates are mainly located on the loop regions of the proteins, with the only exceptions being a few amino acid changes (putatively) involved in the switch to virulence towards cultivars with *Rlm3* or *Rlm9* R genes. Remarkably, the positions in the 3D structures of the polymorphic residues G¹³¹R in AvrLm3 and G¹²⁰R in AvrLm4-7 are very similar, as are I/L⁵⁸H in AvrLm3 and R⁵⁵K in AvrLm5-9, suggesting the same protein regions could be involved in the virulence phenotypes.

Structure-informed pattern searches specifically identified LARS-effectors in phytopathogenic ascomycetes from the Dothideomycetes and Sordariomycetes classes. One or two LARS-effector(s) per species were detected in the Sordariomycetes *Colletotrichum* sp. Two structural analogues were identified in the Dothideomycetes closely related to *L. maculans* ‘brassicae’, specifically *P. tritici repentis* and *P. teres*, while between three and four structural analogues were identified in the species from the complex comprising *L. maculans* ‘brassicae’, suggesting a recent expansion of the LARS family in the species complex. In *L. maculans* ‘brassicae’, thirteen LARS effectors could be detected and their expression during the primary biotrophic stages of oilseed rape cotyledon infection suggests they are *bona fide* effectors. They represent 14 % of the candidate effectors specifically overexpressed during the biotrophic stages of oilseed rape infection (nine LARS effectors among the 63 effector genes in Cluster 2 ‘biotrophy’ defined by Gay *et al.* [32]). The LARS family also comprises four out of the nine cloned AVR genes from *L. maculans*. Most of the *L. maculans* ‘brassicae’ LARS effectors are located in TE-rich regions (9/13) and eight are grouped in three genomic regions as neighbor genes, suggesting their expansion could be partly due to local duplications and that their location in TE-rich compartments could have led to their rapid diversification [34]. Expansions of the LARS family, comprising between 5 to 8 structural analogues, were also detected in two other Dothideomycetes, *M. phaseolina* and *C. cassicola*. We conclude that LARS effectors probably have a common evolutionary origin and that their expansion in some Dothideomycetes results from duplications, and, at least in the *L. maculans* ‘brassicae’ genome, diversification in TE-rich compartments. Two other structural families of effectors were reported in fungi: the RALPH effectors identified in *Blumeria graminis* and the MAX effectors identified in *Magnaporthe oryzae* (RALPH for RNase-Like Proteins Associated with Haustoria, [35]; MAX for *Magnaporthe* Avrs and ToxB like, [36]). The RALPH family represents about 25 % of the *B. graminis* predicted effectors and three out of the four AVR effectors identified to date, and most of them are highly expressed during plant infection [10,35,37,38]. Pedersen *et al.* [35] hypothesized that RALPH effectors originated from an ancestral gene, encoding a secreted ribonuclease, duplicated by TE-driven processes and recently diversified within the grass and cereal powdery mildew lineage. The same way, the MAX family represents between 5 to 10 % of the *M. oryzae* effectors and 25 % of the cloned AVR effectors, and most of them are expressed during early biotrophic stages of rice infection. De Guillen *et al.* [36] hypothesized that the expansion of the MAX family occurred in a common ancestor of *M. oryzae* and *M. grisea*. The scenario observed for the LARS, RALPH and MAX examples suggests that a wide variety of effectors, without any apparent

sequence relationship, could in fact constitute a limited set of structurally conserved effector families and that they have expanded in some fungal lineages or even in several fungal classes.

AvrLm4-7 suppresses Rlm3- and Rlm9-mediated disease resistance. Other cases of effectors with a suppressive function have been described in fungi. In *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, the Avr1 effector suppresses I-2 and I3 mediated resistance Avr2 and Avr3 by the I-2 and I-3 R proteins of tomato [11]. The structure of Avr2 has recently been determined [39], but is unrelated to the structures of AvrLm4-7, AvrLm5-9 or AvrLm3, and the 3D structures of Avr1 and Avr3 are unknown. In the necrotrophic fungus *P. tritici-repentis*, the Host Selective Toxin (HST) ToxA suppresses the activity of other HSTs [40]. Finally, *B. graminis* secretes a suppressor of avirulence (*SvrPm3*) acting on the interaction between the AVR gene *AvrPm3* and the barley R gene *Pm3* [10]. However, neither in *P. tritici-repentis*, in *B. graminis* nor in *F. oxysporum* have the mechanisms underlying suppressive function yet been determined. In non-fungal models, several mechanisms explaining suppressive interactions have been highlighted. (i) The AVR effector can act downstream of another AVR recognition by an R protein to suppress HR induction: in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, AvrBsT interacts in the plant cell with SnRK1, an SNF1-related kinase, to inhibit the HR induced by AvrBs1 recognition [41]. (ii) Effectors displaying suppressive interaction can share a common plant target, but differ in their actions on that target: in *Pseudomonas syringae*, the effector proteins AvrRpm1, AvrRpt2 and AvrB target the *Arabidopsis thaliana* protein RIN4, a key regulator of plant immunity [42,43]. While AvrB and AvrRpm1 trigger Rpm1-mediated recognition through phosphorylation of RIN4, AvrRpt2 triggers plant immunity through cleavage of RIN4, thus preventing recognition of AvrB and AvrRpm1 by Rpm1. (iii) Suppressive effectors can directly act on the R proteins: in *Phytophthora infestans*, the IPI-O4 effector suppresses the HR triggered by recognition of IPI-O1 by the potato RB R protein. IPI-O4 interacts with the coiled-coil domain of RB which is also the domain targeted by IPI-O1 [44]. Since AvrLm4-7, AvrLm3 and AvrLm5-9 share the same structural fold, we hypothesize that they could (i) target the same plant components or cellular processes and / or (ii) be recognized by the same R proteins. While we do not have any information on the plant components targeted by AvrLm3, AvrLm5-9 and AvrLm4-7, such a target could be guarded by the R proteins or, in the case of a direct interaction with the R proteins, could be Rlm9 or Rlm3 themselves. *Rlm9*, *Rlm4*, *Rlm7* and *Rlm3* were mapped to the same genetic cluster and could possibly be allelic [45]. *Rlm9* was cloned and found to

encode a wall-associated kinase-like (WAKL) protein, a newly described class of Receptor-Like Kinase (RLK) R protein [46]. Using a yeast two-hybrid (Y2H) assay, no direct interaction between the extracellular region of Rlm9 and AvrLm5-9 could be detected. However, a direct interaction between AvrLm5-9 and Rlm9 cannot be excluded since Y2H is not an optimal technique to test interaction with a membrane protein. Haddadi *et al.* [47] recently cloned *Rlm4* and *Rlm7* and found they corresponded to alleles of *Rlm9*, with the three encoded proteins only differing by a few amino acid residues in the extracellular receptor domain of the WAKL. Larkan *et al.* [46] had also previously identified at the *Rlm9* locus, in another resistant accession of oilseed rape, a WALK gene that could potentially correspond to *Rlm3*, and being allelic to *Rlm9*. Another example of an allelic R protein that is able to recognize sequence-unrelated AVR effectors with a predicted common fold was recently reported in barley [48], the specificity of recognition being conferred by amino-acid modifications in the LRR domain of the MLA R protein. However, it is currently unknown whether MLA directly interacts with *B. graminis* effectors. Based on the zig-zag model [6], we hypothesize that *Rlm4* and *Rlm7* evolved from *Rlm3* or *Rlm9* in response to the suppressive effect of AvrLm4-7 on AvrLm3 and AvrLm5-9 recognition. We propose a model in which Rlm3 and Rlm9 directly recognize the complex between AvrLm3 (and Ecp11-1) or AvrLm9 and their plant target (or AvrLm3 and AvrLm9 themselves after they have bound to their plant target). AvrLm4-7 would have a higher affinity for the same host target, thereby preventing interaction with AvrLm3 or AvrLm5-9, and thus masking their presence to Rlm3 and Rlm9. Although AvrLm4-7 binds the same host virulence target, we hypothesize that it does not possess the protein region recognized by Rlm3 and Rlm9. Instead, upon binding the plant target, AvrLm4-7 presents a protein region that is recognized by Rlm4 and Rlm7.

We have identified a large structural family of effectors that, in *L. maculans*, are expressed during the early stages of infection and are potentially targeted by R proteins. This structural information on effectors could be used to improve the management and durability of R genes in the field. Indeed, among the nine AVR genes identified to date in *L. maculans*, four belong to the LARS family. The corresponding R genes are, at least in part, present in commercial varieties currently used in the fields (*Rlm7*, *Rlm3*, *Rlm4*, *Rlm9*, *RlmS*). We hypothesize that the presence of R genes targeting members of the LARS family potentially exerts a selection pressure on the other members of the family, and that an efficient strategy to improve durability of R genes would consist in alternating or pyramiding R genes corresponding to

different structural classes of effectors. We have also determined that Ecp11-1, a homologue of AvrLm3 and AVR effector candidate from *F. fulva*, is able to trigger *Rlm3*-mediated resistance in oilseed rape. This finding significantly alters our understanding about the degree of host-microbe specificity as developed by Flor in the 1940s [49], in that this is one of the few examples of cross-species effector recognition, as previously mentioned by Stergiopoulos *et al.* [50] for the recognition of the Avr4 effector from *F. fulva* and of its orthologue in *Mycosphaerella fijiensis* by the Cf4 R protein of tomato. A next step will be to determine whether other homologues identified in Dothideomycetes and Sordariomycetes can also trigger recognition by R proteins of oilseed rape and, in the longer term, to evaluate the possible use of broad-spectrum resistances for multi-pathogen management of diseases.

Materials and Methods

***Leptosphaeria maculans*, bacteria and plant growth conditions**

The v23.1.3 isolate (also known as JN3) belongs to the race Av1-4-5-6-7-8-10-11-S, i.e. is avirulent towards *Rlm1*, *Rlm4-Rlm8*, *Rlm10-11* and *RlmS*, and is the reference isolate whose genome was sequenced [34] and recently re-assembled and re-annotated [28]. Nz-T4 is a field isolate from New Zealand, IBCN18 is a field isolate from Australia [33], and v45.15 is progeny from a cross between isolates v29.3.1 and 19.2.1 [51]. Nz-T4, IBCN18 and v45.15 were used as recipient isolates for genetic transformation. All fungal cultures were maintained on V8 juice agar medium, and highly sporulating cultures were obtained on V8 juice, as previously described [52].

E. coli strain DH5 α (Invitrogen) was grown in LB medium at 37 °C. *Agrobacterium tumefaciens* strain C58::pGV2260 was grown in LB medium at 28 °C. Antibiotics were used at the following concentrations: rifampicin 25 μ g/ml, ampicillin 50 μ g/ml, kanamycin, 100 μ g/ml.

Brassica napus plants were grown in growth chambers with 16 h of day (22 °C, 80 % humidity) and 8 h of night (18 °C, 100 % humidity).

Fungal transformation

A. tumefaciens-mediated transformation (ATMT) was performed on *L. maculans* as described [53]. Transformants were selected on minimal medium supplemented with 50 μ g/ml nourseothricin or 50 μ g/ml hygromycin, purified by single conidium isolation and maintained on selective medium.

Inoculation tests on oilseed rape

All *L. maculans* isolates and transformants were phenotyped for their virulence towards *Rlm3* and *Rlm4* oilseed rape genotypes using a cotyledon-inoculation test [54]. Spore suspensions of each isolate or transformant were inoculated on 10-12 plants of each of the *B. napus* cvs or lines Pixel (*Rlm4*), 15.22.4.1 and 18.22.6.1 (*Rlm3*), Grizzly (*Rlm3*), Columbus (*Rlm1*, *Rlm3*) and 15.23.4.1 (*Rlm7*) [18,22,54,55]. 15.23.4.1 and 18.22.6.1 are two sister lines issued from individual plants from cv. Rangi, that showed a contrasted behavior when inoculated with AvrLm7 or AvrLm3 isolates, respectively. The original lines 23.1.1 and 22.1.1 were generated by three round of selfing of individual plants to reach an homogeneous behaviors of the line [54]. The current lines 15.23.4.1 and 18.22.6.1 results from additional rounds of selfing to multiply and maintain the genotype. Symptoms were scored 12-21 days post-inoculation (DPI) using a semi-quantitative 1 (avirulent) to 6 (virulent) rating scale in which scores 1-3 represent different levels of resistance (from typical HR to delayed resistance) and 4-6 different levels of susceptibility (mainly evaluated by the intensity of sporulation on lesions; [33]). Inoculation tests were repeated twice.

Bacterial and yeast strains and DNA manipulation

For protein production, all synthetic gene constructs were obtained from Genscript (Piscataway, USA). The DNA sequences coding for AvrLm5-9, AvrLm3 and Ecp11-1 were cloned into a pPICZ α A backbone using the *EcoRI* and *NotI* restriction sites in frame with the *Saccharomyces cerevisiae* α -mating factor signal sequence, and under the control of the alcohol oxidase *AOX1* promoter that allows methanol-inducible expression in *P. pastoris*. *E. coli* strain Top10F' was used for the amplification of recombinant plasmids. *E. coli* transformants were selected on LBLS plates with 10 mg/ml tetracycline and 25 mg/L ZeocinTM. The AvrLm5-9, AvrLm3 and Ecp11-1 constructs were expressed in the eukaryotic expression system *P. pastoris* strain X33 using the EasySelect *Pichia* expression kit (Invitrogen Life Technologies, cat K1740-01) according to the manufacturer's instructions. These plasmids were used to express AvrLm5-9, AvrLm3 and ECP11-1 with a N-terminal 6His-Trx-tag followed by a TEV proteolytic recognition site to remove the 6His-Trx-tag.

In order to be expressed in *L. maculans*, *ECP11-1* from *F. fulva* was placed under the control of *AvrLm4-7* promoter. The promoter of the *AvrLm4-7* gene was amplified with the primers promAvrLm4-7_Up (GTTTTGGTTAGGTTTAGGGTCT) and promAvrLm4-7_Down BamHI (GAGAGAGGATCCGTTGTTAACTGTCAAAGGGTT). It was then digested with

NheI and *BamHI* and ligated into a *SpeI-BamHI*-digested pPZPNat1 vector. *ECP11-1* was amplified from its starting codon to its terminator region using primers Ecp11_ATG_EcoU (GAGAGAGAATTCATGTTGTCGTCAGCGAAGACC) and Ecp11_3UTR_XhoL (GAGAGACTCGAGCGACTCCGTAAACTAAGAGATCC) and then digested with *EcoRI* and *XhoI*. This fragment was ligated into the pPZPNat1 vector containing the *AvrLm4-7* promoter and digested with the same enzymes, to obtain the vector pPZPNat1-pAvrLm4-7-Ecp11-1.

A plasmid pPZPNat1 containing *AvrLm4-7* (including its promoter and terminator regions) had been constructed previously [18]. *AvrLm4-7*, from its promoter to its terminator, was transferred into the binary vector pBht2, which carries a hygromycin cassette [56]. pBht2 and pPZPNat1-*AvrLm4-7* were digested by *SacI* and *SalI*. *AvrLm4-7* was ligated into the pBht2 vector to obtain the vector pBht2-*AvrLm4-7*.

PCR-mediated site-directed mutagenesis was performed on the plasmid pPZPNat1-*AvrLm4-7* that carries v23.1.3 allele of *AvrLm4-7* [18]. Using the pPZPNat1-*AvrLm4-7* construct as template, the primers MD1-Up (with a C²⁹⁹ instead of G²⁹⁹), MD2-Up (with a C³⁰⁵ instead of T³⁰⁵) or MD3-Up (with a A³³⁶ instead of C³³⁶) were used in combination with primer AVR47-JN3-Lo (Table S4) in a PCR reaction using the high fidelity DNA polymerase *Taq* Phusion (Finnzymes) to generate respectively 487-bp fragment MP1, 484-bp fragment MP2 or 452-bp fragment MP3. MP1, MP2 or MP3 was then used as a megaprimer in combination with AVR47-JN3-Up in a *Taq* Phusion PCR reaction to generate 1843-bp products termed v23.1.3-R^{100P}, v23.1.3-F^{102S} and v23.1.3-S^{112R}. Following restriction with *SnaBI* and *BstXI* and gel purification, the fragments were used to replace the excised corresponding sequence of pPZPNat1-*AvrLm4-7*. The constructs, termed pPZPNat1-*AvrLm4-7*- R^{100P}, pPZPNat1-*AvrLm4-7*- F^{102S} and pPZPNat1-*AvrLm4-7*- S^{112R} were cloned in *E. coli*, extracted and accuracy of the point mutations checked by sequencing.

Protein production using *Pichia pastoris* and purification

Proteins were produced in the *P. pastoris* expression system by fed-batch cultivation. Upon transformation of *P. pastoris* with pPICZ α A-6His-Trx-*AvrLm5-9*, pPICZ α A-6His-Trx-*AvrLm3* and pPICZ α A-6His-Trx-Ecp11-1, transformants were screened for zeocin resistance in shake-flask cultures. A clone secreting a protein of ~30 kDa (as judged by SDS-PAGE) was selected for large-scale production using a fed-batch mode of cultivation. Recombinant protein was collected from the supernatant, and concentrated. For purification, supernatant

was applied onto Ni-NTA resin (Qiagen, Inc.) column affinity chromatography previously equilibrated with Tris-HCl buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 5 % glycerol). Resin was washed with 40 ml of the same buffer and the proteins were eluted using three fractions of 6 ml of the previous buffer supplemented with 100, 200 and 400 mM imidazole. Fractions containing the proteins of interest were pooled and concentrated by ultra-filtration and loaded on Superdex 75 (GE-Healthcare) equilibrated in buffer (20 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl, 5 % glycerol, 0.5 mM EDTA). The purified fusion proteins were cleaved overnight at 4 °C using the TEV protease. The sample was further purified using an ion exchange column (HiTrap Q HP 5 ml) and the fraction containing the proteins of interest were loaded on a Superdex 75 (GE-Healthcare) gel filtration column equilibrated in buffer (20 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl, 5 % glycerol). Purified proteins were analyzed by SDS-PAGE (14 %) under denaturing and reducing conditions and protein concentrations were determined with a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). Finally, fractions containing the proteins of interest were concentrated to 7.2 mg·ml⁻¹ or 6 mg·ml⁻¹ for AvrLm5-9 and Ecp11-1, respectively. The identity of the recombinant proteins was confirmed by mass spectrometry.

Crystallization and resolution of the protein structures

Crystals for the AvrLm5-9 protein were obtained at 18 °C from a 0.1 µl:0.2 µl mixture of a 2.7 mg/ml protein solution (stored in 20 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl and 5 % glycerol) with crystallization liquor composed of 0.7 M sodium acetate, 80 mM nickel sulfate, 0.1 M HEPES pH 7.5. Native crystals were soaked for 10 seconds in 1.2 M sodium acetate, 50 mM nickel sulfate, 0.1 M HEPES pH 7.5 supplemented with 0.2 M sodium iodine and then transferred to a solution composed of 1.25 M sodium acetate, 50 mM nickel sulfate, 0.1 M HEPES pH 7.5 and 30 % of glycerol before flash-cooling in liquid nitrogen. Diffraction data at 2.7 Å resolution were recorded on beam line FIP-BM30A (synchrotron ESRF, France). The space group was P6₁22 and the asymmetric unit contained one copy of AvrLm5-9 (solvent content of the crystals was 66 %). The structure was determined by the SAD method using the anomalous signal of the iodine atoms and the automated structure solution pipeline implemented in ccp4 with the program CRANK2 [57]. Data were processed using the XDS package [58]. Two iodine sites were located using the program SHELXD [59]. The iterative substructure improvement and phasing of these Iodine sites as well as phasing and hand determination was performed using the REFMAC5, PEAKMAX, MAPRO, Solomon and

Multicomb programs. The model was built semi-automatically after density modification using Parrot, REFMAC5 and BUCCANEER [60]. At this step, 123 residues were placed in the electron density with a FOM value of 0.85 and $R/R_{\text{free}}=31/35$. The model was further improved by iterative cycles of manual rebuilding using COOT [61] and refinement using REFMAC5 program [62]. Refinement was pursued using 2.14 Å resolution native data recorded on beam line PROXIMA 2 (synchrotron SOLEIL, France). The space group native data (different from those of the I-soaked crystals) was $P4_12_12$ with one copy of AvrLm5-9 per asymmetric unit. The structure was solved by molecular replacement using the PHASER program [63] and this model was refined using REFMAC5 (R/R_{free} was 22/28 %). The final model contains residues -2 to 121, three nickel atoms, two acetates and 72 water molecules. Statistics for data collection and refinement are summarized in Table S1. The atomic coordinates and structure factors have been deposited into the Brookhaven Protein Data Bank under the accession numbers 7B76 (AvrLm5-9 I-derivative) and 7AD5 (AvrLm5-9 native).

Crystals for the Ecp11-1 protein were obtained at 4 °C from a 0.1 µl:0.2 µl mixture of a 6 mg/ml protein solution (stored in 20 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl and 5 % glycerol) and crystallization liquor composed of 21 % of PEG550MME, 10 mM zinc sulfate, 0.09 M MES pH 6.5 and 15 % glycerol. Native crystals were flash-cooled in liquid nitrogen and 1.94 Å resolution data were collected on beam line PROXIMA 2 (synchrotron SOLEIL, France). Data were processed using the XDS package [58]. The space group was $P2_12_12_1$ with one Ecp11-1 molecule per asymmetric unit (solvent content of the crystal was 57 %). The structure was determined by the SAD method using the anomalous signal of the zinc atoms and the automated structure solution pipeline implemented in ccp4 with the program CRANK2 [57]. Two Zinc sites were located using the program SHELXD [59]. The iterative substructure improvement and phasing of these zinc sites as well as phasing and hand determination was performed using the REFMAC5, PEAKMAX, MAPRO, Solomon and Multicomb programs. The model was built semi-automatically after density modification using Parrot, REFMAC5 and BUCCANEER [60]. The initial model contained 142 residues with a FOM value of 0.90 and $R/R_{\text{free}}=26/27$. The model was further improved by iterative cycles of manual rebuilding using COOT [61] and refinement using REFMAC5 [62]. A native set data at 1.62 Å resolution was recorded on beam line PROXIMA 2 (synchrotron SOLEIL, France) and the model was refined using REFMAC5. This yielded a R/R_{free} factor of 19/20 %. Statistics for data collection and refinement are summarized in Table S1. The atomic coordinates and structure factors have been deposited into the Brookhaven Protein

Data Bank under the accession numbers 6ZUQ (Ecp11-1 Zn-derivative) and 6ZUS (Ecp11-1 native).

Expression analyses using RNAseq data

RNAseq data were previously generated [32]. The expression levels of structural family members were analyzed in *L. maculans* after extraction of RNAseq data corresponding to the following stages of infection: 2, 5, 7, 12 and 15 days after infection of oilseed rape cotyledons (susceptible cultivar Darmor-Bzh). Growth in V8 axenic medium was used as a control. Two biological replicates per condition were tested. We measured the number of RNAseq reads aligned on the different genes after normalization according to the library size (Counts Per Million, CPM). All the genes were detected as being differentially expressed in at least one infection condition compared to the *in vitro* growth condition on V8 solid medium, according to the criterion: $\text{Log}_2(\text{Fold change}) > 2.0$ and $p\text{-value} < 0.05$.

Bio-informatics analyses

For the HMM searches, a homemade database of 163 fungal proteomes was used (the list of the proteomes used can be found in Table S2). The analyses were performed separately for AvrLm4-7, AvrLm5-9 and Ecp11-1. The HMMER search program from the HMMER package v 3.0 was used to perform four iterations with a cut-off E-value of 1 and a minimum overlap of 50 % [30]. The full sequences of the proteins detected by each of these three homology searches were retrieved. Proteins longer than 160 residues were removed. The remaining sequences were aligned with the MAFFT program using parameters `--localpair --maxiterate 1000`. This final list of sequences was used to build diversity trees using the Neighbor-Joining method using the MEGA6 package. In order to confirm that the retrieved protein analogues have similar structures we used the alphaFold program via the colab server (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>; [31]) to predict their 3D structure.

Signal peptide predictions were performed using SignalP version 4.1 software [29].

Acknowledgments

Authors wish to thank all members of the “Effectors and Pathogenesis of *L. maculans*” group. We thank the beamline staff at the ESRF synchrotron (Grenoble France, beamline FIP-BM30A) and Synchrotron SOLEIL (Saclay France, beamline PROXIMA1 and PROXIMA2) for assistance and advice during data collection. David Cobessi (FIP-BM30A beamline) is gratefully acknowledged for his valuable help in the AvrLm5-9 data collection and analysis.

Funding

YPH was funded by a “Contrat Jeune Scientifique” grant from INRAE. The “Effectors and Pathogenesis of *L. maculans*” group benefits from the support of Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-17-EUR-0007). This work was supported by the French National Research Agency projects StructuraLEP (ANR-14-CE19-0019 to IF and HVT) and Ln23 (ANR-13-BS07-0007-01 to EG), the Plant Health and Environment division of INRAE (Resistrans Project to IF), the Australian Grains Research and Development Corporation (UM00050 to AI), French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) ANR-10-INBS-05, and by funds from the Centre National de la Recherche Scientifique and the University of Paris-Saclay.

References

1. Fones HN, Fisher MC, Gurr SJ. Emerging fungal threats to plants and animals challenge agriculture and ecosystem resilience. *Microbiol Spect.* 2017;5: 5.2.16. doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0027-2016
2. Fisher MC, Hawkins NJ, Sanglard D, Gurr SJ. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science.* 2018;360: 739–742. doi:10.1126/science.aap7999
3. Oliva R, Win J, Raffaele S, Boutemy L, Bozkurt TO, Chaparro-Garcia A, *et al.* Recent developments in effector biology of filamentous plant pathogens. *Cell Microbiol.* 2010;12: 705–715. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01471.x
4. Rocafort M, Fudal I, Mesarich CH. Apoplastic effector proteins of plant-associated fungi and oomycetes. *Curr Opin Plant Biol.* 2020;56: 9–19. doi:10.1016/j.pbi.2020.02.004
5. Lo Presti L, Lanver D, Schweizer G, Tanaka S, Liang L, Tollot M, *et al.* Fungal effectors and plant susceptibility. *Annu Rev Plant Biol.* 2015;66: 513–545. doi:10.1146/annurev-arplant-043014-114623
6. Jones JDG, Dangl JL. The plant immune system. *Nature.* 2006;444: 323–329. doi:10.1038/nature05286
7. Guttman DS, McHardy AC, Schulze-Lefert P. Microbial genome-enabled insights into plant–microorganism interactions. *Nat Rev Genet.* 2014;15: 797–813. doi:10.1038/nrg3748

8. Sánchez-Vallet A, Fouché S, Fudal I, Hartmann FE, Soyer JL, Tellier A, *et al.* The Genome Biology of Effector Gene Evolution in Filamentous Plant Pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* 2018;56: 21–40. doi:10.1146/annurev-phyto-080516-035303
9. Plissonneau C, Daverdin G, Ollivier B, Blaise F, Degrave A, Fudal I, *et al.* A game of hide and seek between avirulence genes *AvrLm4-7* and *AvrLm3* in *Leptosphaeria maculans*. *New Phytol.* 2016;209: 1613–1624. doi:10.1111/nph.13736
10. Bourras S, McNally KE, Ben-David R, Parlange F, Roffler S, Praz CR, *et al.* Multiple avirulence loci and allele-specific effector recognition control the Pm3 race-specific resistance of wheat to powdery mildew. *Plant Cell.* 2015;27: 2991–3012. doi:10.1105/tpc.15.00171
11. Houterman PM, Cornelissen BJC, Rep M. Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. *PLOS Pathog.* 2008;4: e1000061. doi:10.1371/journal.ppat.1000061
12. Brun H, Chèvre A-M, Fitt BDL, Powers S, Besnard A-L, Ermel M, *et al.* Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytol.* 2010;185: 285–299. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.03049.x
13. Rouxel T, Balesdent M-H. Life, death and rebirth of avirulence effectors in a fungal pathogen of Brassica crops, *Leptosphaeria maculans*. *New Phytol.* 2017;214: 526–532. doi:10.1111/nph.14411
14. Ghanbarnia K, Ma L, Larkan NJ, Haddadi P, Fernando WGD, Borhan MH. *Leptosphaeria maculans* AvrLm9: a new player in the game of hide and seek with AvrLm4-7. *Mol Plant Pathol.* 2018;19: 1754–1764. doi:10.1111/mpp.12658
15. Petit-Houdenot Y, Degrave A, Meyer M, Blaise F, Ollivier B, Marais C-L, *et al.* A two genes - for - one gene interaction between *Leptosphaeria maculans* and *Brassica napus*. *New Phytol.* 2019;223: 397–411. doi:10.1111/nph.15762
16. Neik TX, Ghanbarnia K, Ollivier B, Scheben A, Severn-Ellis A, Larkan NJ, *et al.* Two independent approaches converge to the cloning of a new *Leptosphaeria maculans* avirulence effector gene, *AvrLmS-Lep2*. *Mol Plant Pathol.* 2022. doi:10.1111/mpp.13194
17. Degrave A, Wagner M, George P, Coudard L, Pinochet X, Ermel M, *et al.* A new avirulence gene of *Leptosphaeria maculans*, *AvrLm14*, identifies a resistance source in American broccoli (*Brassica oleracea*) genotypes. *Mol Plant Pathol.* 2021;22: 1599–1612. doi:10.1111/mpp.13131
18. Parlange F, Daverdin G, Fudal I, Kuhn M-L, Balesdent M-H, Blaise F, *et al.* *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm4-7* confers a dual recognition specificity by the *Rlm4* and *Rlm7* resistance genes of oilseed rape, and circumvents Rlm4-mediated recognition through a single amino acid change. *Mol Microbiol.* 2009;71: 851–863. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06547.x
19. Huang YJ, Li Z-, Evans N, Rouxel T, Fitt B, Balesdent M. Fitness cost associated with loss of the AvrLm4 avirulence function in *Leptosphaeria maculans* (Phoma stem canker of oilseed rape). *Eur J Plant Pathol.* 2006. doi:10.1007/s10658-005-2643-4
20. Nováková M, Šašek V, Trdá L, Krutinová H, Mongin T, Valentová O, *et al.* *Leptosphaeria maculans* effector AvrLm4-7 affects salicylic acid (SA) and ethylene (ET) signalling and hydrogen peroxide (H₂O₂) accumulation in *Brassica napus*. *Mol Plant Pathol.* 2016;17: 818–831. doi:10.1111/mpp.12332

21. Van de Wouw AP, Lowe RGT, Elliott CE, Dubois DJ, Howlett BJ. An avirulence gene, *AvrLmJ1*, from the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, confers avirulence to *Brassica juncea* cultivars. *Mol Plant Pathol.* 2014;15: 523–530. doi:10.1111/mpp.12105
22. Plissonneau C, Blaise F, Ollivier B, Leflon M, Carpezat J, Rouxel T, *et al.* Unusual evolutionary mechanisms to escape effector-triggered immunity in the fungal phytopathogen *Leptosphaeria maculans*. *Mol Ecol.* 2017;26: 2183–2198. doi:10.1111/mec.14046
23. Franceschetti M, Maqbool A, Jiménez-Dalmaroni MJ, Pennington HG, Kamoun S, Banfield MJ. Effectors of filamentous plant pathogens: commonalities amid diversity. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2017;81: e00066-16. doi:10.1128/MMBR.00066-16
24. Blondeau K, Blaise F, Graille M, Kale SD, Linglin J, Ollivier B, *et al.* Crystal structure of the effector *AvrLm4-7* of *Leptosphaeria maculans* reveals insights into its translocation into plant cells and recognition by resistance proteins. *Plant J.* 2015;83: 610–624. doi:10.1111/tpj.12913
25. Daverdin G, Rouxel T, Gout L, Aubertot J-N, Fudal I, Meyer M, *et al.* Genome structure and reproductive behaviour influence the evolutionary potential of a fungal phytopathogen. *PLOS Pathog.* 2012;8: e1003020. doi:10.1371/journal.ppat.1003020
26. Mesarich CH, Ökmen B, Rovenich H, Griffiths SA, Wang C, Karimi Jashni M, *et al.* Specific hypersensitive response-associated recognition of new apoplastic effectors from *Cladosporium fulvum* in wild tomato. *Mol Plant Microbe Interact.* 2018;31: 145–162. doi:10.1094/MPMI-05-17-0114-FI
27. Robert X, Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.* 2014;42: W320-324. doi:10.1093/nar/gku316
28. Dutreux F, Da Silva C, d’Agata L, Couloux A, Gay EJ, Istace B, *et al.* *De novo* assembly and annotation of three *Leptosphaeria* genomes using Oxford Nanopore MinION sequencing. *Sci Data.* 2018;5: 180235. doi:10.1038/sdata.2018.235
29. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods.* 2011;8: 785–786. doi:10.1038/nmeth.1701
30. Potter SC, Luciani A, Eddy SR, Park Y, Lopez R, Finn RD. HMMER web server: 2018 update. *Nucleic Acids Res.* 2018;46: W200–W204. doi:10.1093/nar/gky448
31. Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M. ColabFold - Making protein folding accessible to all. *bioRxiv.* 2022. p. 2021.08.15.456425. doi:10.1101/2021.08.15.456425
32. Gay EJ, Soyer JL, Lapalu N, Linglin J, Fudal I, Da Silva C, *et al.* Large-scale transcriptomics to dissect 2 years of the life of a fungal phytopathogen interacting with its host plant. *BMC Biol.* 2021;19: 55. doi:10.1186/s12915-021-00989-3
33. Balesdent MH, Barbetti MJ, Li H, Sivasithamparam K, Gout L, Rouxel T. Analysis of *Leptosphaeria maculans* race structure in a worldwide collection of isolates. *Phytopathology.* 2005;95: 1061–1071. doi:10.1094/PHYTO-95-1061
34. Rouxel T, Grandaubert J, Hane JK, Hoede C, van de Wouw AP, Couloux A, *et al.* Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by Repeat-Induced Point mutations. *Nat Commun.* 2011;2: 202. doi:10.1038/ncomms1189

35. Pedersen C, Ver Loren van Themaat E, McGuffin LJ, Abbott JC, Burgis TA, Barton G, *et al.* Structure and evolution of barley powdery mildew effector candidates. *BMC Genomics*. 2012;13: 694. doi:10.1186/1471-2164-13-694
36. de Guillen K, Ortiz-Vallejo D, Gracy J, Fournier E, Kroj T, Padilla A. Structure analysis uncovers a highly diverse but structurally conserved effector family in phytopathogenic fungi. *PLOS Pathog*. 2015;11: e1005228. doi:10.1371/journal.ppat.1005228
37. Lu X, Kracher B, Saur IML, Bauer S, Ellwood SR, Wise R, *et al.* Allelic barley MLA immune receptors recognize sequence-unrelated avirulence effectors of the powdery mildew pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113: E6486–E6495. doi:10.1073/pnas.1612947113
38. Praz CR, Bourras S, Zeng F, Sánchez-Martín J, Menardo F, Xue M, *et al.* *AvrPm2* encodes an RNase-like avirulence effector which is conserved in the two different specialized forms of wheat and rye powdery mildew fungus. *New Phytologist*. 2017;213: 1301–1314. doi:10.1111/nph.14372
39. Di X, Cao L, Hughes RK, Tintor N, Banfield MJ, Takken FLW. Structure-function analysis of the *Fusarium oxysporum* *Avr2* effector allows uncoupling of its immune-suppressing activity from recognition. *New Phytol*. 2017;216: 897–914. doi:10.1111/nph.14733
40. Manning VA, Ciuffetti LM. Necrotrophic effector epistasis in the *Pyrenophora tritici-repentis*-wheat interaction. *PLOS One*. 2015;10: e0123548. doi:10.1371/journal.pone.0123548
41. Szczesny R, Büttner D, Escolar L, Schulze S, Seiferth A, Bonas U. Suppression of the *AvrBs1*-specific hypersensitive response by the *YopJ* effector homolog *AvrBsT* from *Xanthomonas* depends on a SNF1-related kinase. *New Phytol*. 2010;187: 1058–1074. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03346.x
42. Mackey D, Holt BF, Wiig A, Dangl JL. RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell*. 2002;108: 743–754. doi:10.1016/s0092-8674(02)00661-x
43. Axtell MJ, Staskawicz BJ. Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the *AvrRpt2*-directed elimination of RIN4. *Cell*. 2003;112: 369–377. doi:10.1016/s0092-8674(03)00036-9
44. Chen Y, Liu Z, Halterman DA. Molecular determinants of resistance activation and suppression by *Phytophthora infestans* effector IPI-O. *PLOS Pathog*. 2012;8: e1002595. doi:10.1371/journal.ppat.1002595
45. Delourme R, Pilet-Nayel ML, Archipiano M, Horvais R, Tanguy X, Rouxel T, *et al.* A cluster of major specific resistance genes to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *Phytopathology*. 2004;94: 578–583. doi:10.1094/PHYTO.2004.94.6.578
46. Larkan NJ, Ma L, Haddadi P, Buchwaldt M, Parkin IAP, Djavaheri M, *et al.* The *Brassica napus* wall-associated kinase-like (WAKL) gene *Rlm9* provides race-specific blackleg resistance. *Plant J*. 2020;104: 892–900. doi:10.1111/tpj.14966
47. Haddadi P, Larkan NJ, Wouw AV de, Zhang Y, Neik TX, Beynon E, *et al.* *Brassica napus* genes *Rlm4* and *Rlm7*, conferring resistance to *Leptosphaeria maculans*, are alleles of the *Rlm9* wall-associated kinase-like resistance locus. *bioRxiv*. 2021. p. 2021.12.11.471845. doi:10.1101/2021.12.11.471845

48. Bauer S, Yu D, Lawson AW, Saur IML, Frantzeskakis L, Kracher B, *et al.* The leucine-rich repeats in allelic barley MLA immune receptors define specificity towards sequence-unrelated powdery mildew avirulence effectors with a predicted common RNase-like fold. *PLOS Pathogens*. 2021;17: e1009223. doi:10.1371/journal.ppat.1009223
49. Flor H. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology*. 1942: 653–669.
50. Stergiopoulos I, van den Burg HA, Ökmen B, Beenen HG, van Liere S, Kema GHJ, *et al.* Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107: 7610–7615. doi:10.1073/pnas.1002910107
51. Leflon M, Brun H, Eber F, Delourme R, Lucas MO, Vallée P, *et al.* Detection, introgression and localization of genes conferring specific resistance to *Leptosphaeria maculans* from *Brassica rapa* into *B. napus*. *Theor Appl Genet*. 2007;115: 897–906. doi:10.1007/s00122-007-0616-z
52. Ansan-Melayah D, Balesdent M-H, Buee MM, Rouxel TT. Genetic characterization of *AvrLm1*, the first avirulence gene of *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology*. 1995;85: 1525–1529.
53. Gout LL, Fudal IF-G, Kuhn M-L, Blaise FF, Eckert M, Cattolico L, *et al.* Lost in the middle of nowhere: the *AvrLm1* avirulence gene of the dothideomycete *Leptosphaeria maculans*. *Mol Microbiol*. 2006;60: 67–80. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05076.x
54. Balesdent MH, Attard A, Kühn ML, Rouxel T. New avirulence genes in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology*. 2002;92: 1122–1133. doi:10.1094/PHYTO.2002.92.10.1122
55. Dilmaghani A, Balesdent MH, Didier JP, Wu C, Davey J, Barbetti MJ, *et al.* The *Leptosphaeria maculans* – *Leptosphaeria biglobosa* species complex in the American continent. *Plant Pathol*. 2009;58: 1044–1058. doi:10.1111/j.1365-3059.2009.02149.x
56. Mullins ED, Chen X, Romaine P, Raina R, Geiser DM, Kang S. Agrobacterium-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology*. 2001;91: 173–180. doi:10.1094/PHYTO.2001.91.2.173
57. Skubák P, Pannu NS. Automatic protein structure solution from weak X-ray data. *Nat Commun*. 2013;4: 2777. doi:10.1038/ncomms3777
58. Kabsch W. XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010;66: 125–132. doi:10.1107/S0907444909047337
59. Schneider TR, Sheldrick GM. Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2002;58: 1772–1779. doi:10.1107/s0907444902011678
60. Cowtan K. The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2006;62: 1002–1011. doi:10.1107/S0907444906022116
61. Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2004;60: 2126–2132. doi:10.1107/S0907444904019158
62. Murshudov GN, Skubák P, Lebedev AA, Pannu NS, Steiner RA, Nicholls RA, *et al.* REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2011;67: 355–367. doi:10.1107/S0907444911001314

63. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr.* 2007;40: 658–674.
doi:10.1107/S0021889807021206

Supporting information captions

Available on the link: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.12.17.423041v3.full>

Fig S1. Purification of the recombinant AvrLm5-9 and Ecp11-1 proteins.

(A) Size-exclusion chromatogram (Superdex 75 16/60 column; GE Healthcare); elution with 20 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl, 5 % glycerol. (B) SDS-PAGE gel analysis of the peak fractions of the gel-filtration step. Protein sizes are shown in kDa.

Fig S2. Diversity of LARS effector structural analogues identified by HMM analyses in *L. maculans* ‘brassicae’ and other phytopathogenic fungi.

The multiple sequence alignment generated in Figure 5 was used to generate a diversity tree using the Neighbor-joining method. Branch supports are based on 1000 bootstraps and horizontal branch length reflects sequence divergence.

Cg, *Colletotrichum gloeosporioides*; Ch, *Colletotrichum higginsianum*; Co, *Colletotrichum orbiculare*; Cc, *Corynespora cassiicola*; Ff, *Fulvia fulva*; Lbb, *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’; Lbt, *Leptosphaeria biglobosa* ‘thlaspii’; Lmb, *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’; Lml, *Leptosphaeria maculans* ‘lepidii’; Mp, *Macrophomina phaseolina*; Pt, *Pyrenophora teres*; Ptr, *Pyrenophora tritici-repentis*; Sl, *Stemphylium lycopersici*

Fig S3. 3D models of the LARS effectors identified in *L. maculans*

The 3D structures of the different LARS effectors found by the HMM search were modeled using AlphaFold [31]. Cysteines are presented as sticks and colored in red. No reliable models could be obtained neither for Lmb_jn3_08343 nor for Lmb_jn3_12986.

Fig S4. Effect of mutations in AvrLm4-7 on the ability to suppress Rlm3-mediated recognition and to induce Rlm4 and Rlm7-mediated recognition

Wild type isolates G06-E107 (A3a4a7), JN3 (a3A4A7) and JN2 (a3a4A7), as well as G06-E107 transformants carrying AvrLm4-7 alleles with mutations at amino acids R¹⁰⁰, F¹⁰², S¹¹² and / or G¹²⁰ were inoculated onto cotyledons of cultivars carrying *Rlm3* (15.22.4.1), *Rlm7* (15.23.4.1) or *Rlm4* (Pixel). Pathogenicity was measured 10 and 14 days post-inoculation (DPI). Results are expressed as a mean scoring using the IMAScore rating comprising six infection classes (IC), where IC1 to IC3 correspond to resistance, and IC4 to IC6 to susceptibility [33]. Error bars indicate the standard deviation of technical replicates.

Fig S5. Ecp11-1 of *F. fulva* triggers Rlm3-mediated recognition in *L. maculans*

Wild type isolates Nz-T4 (a1a3a4a7), JN3 (A1a3A4A7) and 19.4.24 (A1A3a4a7), as well as Nz-T4 transformants carrying *ECP11-1* or *AvrLm3* were inoculated onto cotyledons of three cultivars carrying *Rlm3* (15.22.4.1, Grizzly and Columbus), *Rlm7* (15.23.4.1) or *Rlm4* (Pixel). 15.23.4.1 is a sister line of 15.22.4.1 issued from individual plants from cv. Rangi, carrying *Rlm7* instead of *Rlm3*. Pathogenicity was measured 15 days post-inoculation. Results are expressed as a mean scoring using the IMAScore rating comprising six infection classes (IC), where IC1 to IC3 correspond to resistance, and IC4 to IC6 to susceptibility [33]. Error bars indicate the standard deviation of technical replicates.

Table S1. Data collection and refinement statistics for crystal structures of AvrLm5-9 and Ecp11-1

Table S2. Fungal proteome databases used for the HMM analysis

Table S3. Characteristics of LARS structural analogues identified in fungi

Materials and Methods S1: Selection of efficient protein producer clones of AvrLm5-9 and Ecp11-1

Materials and Methods S2: Conditions for native protein production and extraction using *P. pastoris* in fed-batch cultivation

Article 3

**Molecular investigation of the broad-spectrum
resistance Rlm3 from oilseed rape against fungal
pathogens**

Molecular investigation of the broad-spectrum resistance Rlm3 from oilseed rape against fungal pathogens

Nacera Talbi¹, Simine Pakzad¹, Françoise Blaise¹, Bénédicte Ollivier¹, Thierry Rouxel¹, Marie-Hélène Balesdent¹, Carl Mesarich², Karine Blondeau³, Nouredine Lazar³, Herman van Tilbeurgh³ and Isabelle Fudal^{1*}

¹UR BIOGER, INRAE, Université Paris-Saclay, Thiverval-Grignon, France

²Laboratory of Molecular Plant Pathology, School of Agriculture and Environment, Massey University, Palmerston North, New Zealand

³Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Gif-sur-Yvette, France

* Corresponding author: Isabelle Fudal (Isabelle.Fudal@inrae.fr)

Abstract:

Recognition of a pathogen avirulence (AVR) effector protein by a cognate plant resistance (R) protein triggers a set of immune responses that render the plant resistant. In *Leptosphaeria maculans* / oilseed rape (*Brassica napus*) interaction, specific resistances are widely used in combination with a good level of quantitative resistance that can maximize the lifetime of specific resistances. However, sources of specific resistance are scarce in oilseed rape and studies aim either at the identification and introgression of resistances from other Brassicas to diversify the available resources, or at optimizing the durability of available resistances by implementing alternation and/or pyramiding strategies aiming at sustainable disease control. Thirteen *L. maculans* AVR genes have been cloned, highlighting unconventional interactions between AVR genes and R genes. Most of these AVR genes, as is often the case for effector-encoding genes in fungi, are species-specific or even genotype-specific and therefore have few or no homologs in the databases. Recently, however, genes homologous to the AvrLm3 AVR protein have been identified in other fungal species, including an AVR protein from *Fulvia fulvum* called Ecp11-1 and putative effectors from *Fusarium oxysporum* and *Zymoseptoria ardabiliae*. Ecp11-1 is recognized by oilseed rape varieties carrying the *Rlm3* resistance gene, and this recognition is masked by the presence of another AVR gene,

AvrLm4-7. In this study we were able to show that also another effector from *F. oxysporum f.sp. narcissi* is able to confer recognition by Rlm3 in *L. maculans*, this recognition being masked by the presence of *AvrLm4-7*. We were also able to identify amino acids necessary for the recognition of AvrLm3 and Ecp11-1 by Rlm3. This analysis is a first step towards the development of broad-spectrum resistances that could allow recognition of several pathogen effectors and conferring multi-pathogen disease management, identification of new resistance sources in other plants, or even edition of resistance genes to allow multi-pathogen resistance.

Introduction

During plant infection, pathogens secrete molecules commonly called effectors that can modulate plant immunity and facilitate infection (Oliva *et al.*, 2010; Rocafort *et al.*, 2020). Through these molecules, adapted pathogens are able to overcome the PAMP-Triggered Immunity (PTI), triggered by the recognition of highly conserved pathogen molecules (Pathogen-Associated Molecular Patterns: PAMP). In plants carrying major resistance (*R*) genes, some of these effectors can be specifically recognized, triggering ETI (Effector-Triggered Immunity; Jones & Dangl, 2006), and are then called avirulence (AVR) proteins. Thus, breeding cultivars carrying major *R* genes against pathogens is a common and powerful tool to control disease (McDonald & Linde, 2002). However, the extensive deployment of single *R* genes in the fields may exert strong selection pressure against the pathogens to become virulent through the evolution of their AVR gene repertoire (McDonald and Stukenbrock, 2016).

Many cases of resistance breakdown soon after deployment of new specific *R* genes have been observed in the fields, for example, when using specific *R* genes against fungi responsible for cereal rusts (Kolmer, 1996; McIntosh and Brown, 1997), cereal powdery mildews (Brown, 1997; Wolfe and McDermott, 1994) or oilseed rape stem canker (Rouxel *et al.*, 2003). Different mechanisms have been reported allowing pathogens to escape recognition by *R* genes including acquisition of new effectors that suppress ETI, AVR gene deletion, inactivation, or down-regulation and point mutations that allow maintaining the virulence function of the AVR protein (Jones and Dangl, 2006; Guttman *et al.*, 2014; Sanchez-Vallet *et al.*, 2018).

The sustainable management of specific *R* genes is therefore a major challenge to develop genetic control as an efficient mean to limit disease and avoid the rapid emergence of virulent strains. Several strategies can be used to optimize the management of these resistances and limit their overcoming. A first strategy is the setup of pathogen population surveys in order to rapidly detecting the emergence of virulent strains and analyzing the mechanisms associated with switch to virulence. Depending on the dynamics of virulent isolates emergence and their frequency in populations, recommendations for combinations or alternations of resistances in the field can be proposed. This strategy, although efficient, remains difficult to apply on a large scale. Indeed, it is a real race against time between the moment of emergence of virulent

isolates and the proposal of resistance management strategies in the field. Another efficient way to increase the durability of a major *R* gene is to combine it with quantitative resistance. Brun *et al.* (2010) showed that, in the pathosystem *L. maculans* / oilseed rape, a qualitative resistance was less frequently overcome when expressed in cultivars with a genetic background of quantitative resistance. Finally, the durability of a resistance depends on the AVR protein it targets and on its involvement in pathogenicity. It has been postulated that resistances targeting effectors that are highly conserved among pathogens (called ‘core effectors’), which are supposed to be strongly involved in pathogenesis, would potentially be more difficult to breakdown, as the switch to virulence would be associated with a high fitness cost for the pathogen (Depotter and Doehlemann, 2019). Furthermore, *R* genes recognizing core effectors could be able to confer resistance to a wide range of pathogens. This is notably the case of the tomato resistance gene *Cf4* which is able to recognize the *Fulvia fulvum* (formerly called *Cladosporium fulvum*) effector AVR4 but also its orthologue in *Mycosphaerella fijiensis*, or *Cf2* that confers resistance to both *F. fulvum* and the nematode *Globodera rostochiensis* via their respective AVR genes, AVR2 and Gr-VAP1, targeting the same tomato protease guarded by *Cf2* (Rooney *et al.*, 2005; Lozano-Torres *et al.*, 2012; Stergiopoulos *et al.*, 2012).

The Dothideomycete *Leptosphaeria maculans* is the causal agent of stem canker (blackleg) of Brassica, notably oilseed rape (*Brassica napus*). During its infection cycle, *L. maculans* alternates between saprophytic, biotrophic and necrotrophic lifestyles and produces waves of effectors specific to the different stages of plant colonization (Rouxel and Balesdent, 2005; Gay *et al.*, 2021). Genetic control is the main strategy to fight *L. maculans*, at least in Continental Europe, and, as such, identification of new resistance sources within Brassica species is essential. Twenty-four *R* genes against *L. maculans* (mostly called *Rlm* genes) have been genetically identified (Cantila *et al.*, 2021; Degraeve *et al.*, 2021; Jiquel *et al.*, 2021) and five of them have been cloned: *LepR3* (Larkan *et al.*, 2013) and *Rlm2* (Larkan *et al.*, 2015) which are allelic variants encoding Receptor-Like Proteins, and *Rlm9*, *Rlm4* and *Rm7* (Larkan *et al.*, 2020; Haddadi *et al.*, 2021), which are three allelic variants encoding Wall-Associated Kinases. Among these *R* genes, several have already been introduced in commercial varieties and overcome, more or less rapidly, showing a remarkable ability of *L. maculans* to switch to virulence using a great diversity of mechanisms (Rouxel & Balesdent, 2017), but also contrasting situations according to the *R* gene, the oilseed rape genotype in which it was

introduced and the targeted effector. *Rlm1*, the first *R* gene deliberately deployed in the fields, that targeted an AVR effector, *AvrLm1*, which had a limited effect on fungal fitness (Huang *et al.*, 2010), was overcome in three years in French fields, as fungal populations shifted from 15% of virulent isolates towards *Rlm1* in 1997 to 93% in 1999 (Rouxel *et al.*, 2003). In contrast, the *Rlm7* resistance which was deployed in the fields in 2004 and extensively used (e.g. up to 50 to 70 % of *Rlm7* cultivars in the French fields in 2013; Balesdent *et al.* 2015) remained efficient during more than ten years (Balesdent *et al.*, 2022.). Evolution of *L. maculans* populations to virulence towards *Rlm7* was a long process: while in 2010 only 4 % of the French isolates were virulent towards *Rlm7*, the ratio of virulent isolates increased to 19 % in 2013 (Balesdent *et al.* 2015, in prep.). The durability of *Rlm7* resistance was possibly due to the importance of *AvrLm4-7* for fungal fitness and aggressiveness (Huang *et al.*, 2006; Nováková *et al.*, 2016) but also to the introduction of *Rlm7* in cultivars with a high level of quantitative resistance (Balesdent *et al.* 2015) and to the antagonistic effect of *AvrLm4-7* on *AvrLm3 / Rlm3* interaction (Plissonneau *et al.*, 2016).

Thirteen *L. maculans* AVR genes have been cloned (Gout *et al.*, 2006; Fudal *et al.*, 2007; Parlange *et al.*, 2009; Balesdent *et al.*, 2013; van de Wouw *et al.*, 2014; Ghanbarnia *et al.*, 2015; Plissonneau *et al.*, 2016; Ghanbarnia *et al.*, 2018; Petit-Houdenot *et al.*, 2019; Jiquel *et al.*, 2021 ; Degrave *et al.*, 2021; Neik *et al.*, 2022) some of them being highly conserved in field populations and sharing protein homologies or structural analogies with effectors from other plant pathogenic fungi. *AvrLm6* shares homologies with several *AvrLm6*-like effectors from two *Venturia* species, *V. inaequalis* and *V. pirina* (Shiller *et al.*, 2015). *AvrLm3* is homologous to an AVR protein from *F. fulvum*, *Ecp11-1* (Mesarich *et al.*, 2018) and *AvrLm10A/AvrLm10B* are conserved in several plant pathogenic fungi from the *Dothideomycetes* and *Sordariomycetes* species (Petit-Houdenot *et al.*, 2019; Talbi *et al.*, 2022). These data provide us a real opportunity to investigate the possible use of resistance sources from distantly related plant species to develop broad-spectrum resistance to a wide range of pathogens.

AvrLm3 is present in all *L. maculans* isolates collected in the field, thus suggesting a central role of this effector in fungal pathogenicity (Plissonneau *et al.* 2017). The main mechanism allowing *L. maculans* to escape *Rlm3*-mediated recognition is the presence of another effector *AvrLm4-7* able to suppress recognition of *AvrLm3* by *Rlm3* without a direct physical interaction between the two AVR proteins (Plissonneau *et al.*, 2016). *L. maculans* population

surveys after the deployment of *Rlm7* resistance was a crucial step in the identification of the suppressive interaction between *AvrLm3* and *AvrLm4-7*. Indeed, the masking of *AvrLm3* by *AvrLm4-7* had allowed *AvrLm3* to escape recognition by *Rlm3*. However, the massive use of *Rlm7* resistance led to the emergence of virulent isolates that present for part of them drastic changes in *AvrLm4-7* such as accumulation of inactivating mutations or deletion, thus abolishing the masking of *AvrLm3*. As a result, due to increased growing of cultivars carrying both *Rlm3* and *Rlm7*, isolates virulent towards *Rlm3* are now appearing (Plissonneau *et al.*, 2017; Balesdent *et al.*, in prep.), *AvrLm3* being always present in these isolates but showing sequence polymorphisms. Recently, an *AvrLm3* homologue was identified in *F. fulvum*, encoded by an AVR gene called *Ecp11-1* that is recognized by wild tomato accessions carrying the resistance gene *CfECP11-1*. The *AvrLm3* and *Ecp11-1* sequences share 37% identity and 59% similarity (Mesarich *et al.*, 2018) with only minor insertions/deletions. Lazar *et al.* (2020) recently showed that *Ecp11-1* and *AvrLm3* were structural analogues with five conserved disulfide bridges. Surprisingly, *Ecp11-1* was able to trigger *Rlm3*-mediated recognition when introduced into a virulent *L. maculans* isolate and recognition was masked by the presence of *AvrLm4-7* (Lazar *et al.*, 2020). These data suggest that *Rlm3* could be a broad-spectrum resistance source.

The aim of the present work was to go further into the characterization of *Rlm3* interaction with *AvrLm3* and *ECP11-1* and to determine whether *Rlm3* could recognize effectors from other plant pathogenic fungi. For this purpose, we analyzed *AvrLm3* polymorphism in field isolates according to their phenotypic behavior towards *Rlm3*. We then further tested amino-acids of *AvrLm3* and *Ecp11-1* potentially involved in the interaction with *Rlm3* by site-directed mutagenesis. We also identified putative *AvrLm3* homologues in fungal proteomes and tested whether these homologues could also induce *Rlm3*-mediated recognition and if that recognition could be masked by the presence of *AvrLm4-7*. Finally, combining our functional data with 3D-structural predictions for these *AvrLm3* homologues, we proposed a model regarding *Rlm3*-mediated recognition.

Results

Two amino-acid changes in AvrLm3 are sufficient to escape *Rlm3*-mediated resistance

We took advantage of a large survey of *AvrLm3* polymorphism within worldwide populations of *L. maculans* performed by Plissonneau *et al.* (2017) and Balesdent *et al.* (in prep.) to decipher the interaction between AvrLm3 and its cognate resistance gene *Rlm3*. Polymorphism of *AvrLm3* was assessed in a collection of 238 *L. maculans* isolates, revealing an important allelic diversity of AvrLm3 with 28 polymorphic nucleotides in the coding sequence, defining 17 different alleles that corresponded to 22 non-synonymous mutations and to 17 isoforms of the protein termed AvrLm3-A to AvrLm3-R (Figure 1A). Among the polymorphic amino-acid residues, three correlated quite well with the virulent and avirulent phenotypes towards *Rlm3*: I/L⁵⁸H, G¹³¹R and F¹³⁴Y (Figure 1A and B). G¹³¹R change was found in all the virulent alleles, while I/L⁵⁸H and F¹³⁴Y were found in all except one virulent allele (AvrLm3-Q and AvrLm3-H, respectively). Two of these polymorphic amino-acids are located on an external loop of the AvrLm3 protein (G¹³¹R and F¹³⁴Y) and one is on the larger α -helix (I/L⁵⁸H; Figure 1B).

To determine the role of these three residues in the induction of *Rlm3*-mediated resistance, we performed site-directed mutagenesis and generated two single mutants (AvrLm3_I58H and AvrLm3_G131R), two double mutants (AvrLm3_I58H_G131R and AvrLm3_G131R_F134Y) and one triple mutant (AvrLm3_I58H_G131R_F134Y). These mutations involved surface exposed residues and are hence not expected to affect the global structure of AvrLm3 (Figure 2A). We generated plasmid constructs containing the different mutated versions of AvrLm3 under the control of the *AvrLm4-7* promoter and fused to the *ECP11-1* terminator in the binary vector pPZPnat1. The different constructs were introduced through *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation into Nz-T4, an *L. maculans* isolate virulent towards *Rlm3*, *Rlm4* and *Rlm7*. We obtained six Nz-T4-AvrLm3_I58H, Nz-T4-AvrLm3_G131R and Nz-T4- AvrLm3_I58H_G131R transformants and five Nz-T4- AvrLm3_G131R_F134Y and Nz-T4- AvrLm3_I58H_G131R_F134Y transformants. The transformants were inoculated onto *B. napus* cvs Pixel (*Rlm4*) and 15.22.4.1 (*Rlm3*). All the transformants, as Nz-T4, were virulent on Pixel. All the transformants expressing AvrLm3 with the single mutations (AvrLm3_I58H or AvrLm3_G131R) and AvrLm3 with the double mutation AvrLm3_I58H_G131R were avirulent on the *Rlm3* cultivar, indicating that the mutations of the amino acids I⁵⁸H and G¹³¹R were not sufficient to escape *Rlm3*-mediated recognition (Figure 3A). In

contrast, all the transformants expressing AvrLm3 with the double mutation G¹³¹R _F¹³⁴Y (AvrLm3_G131R _F134Y) or with the triple mutation I⁵⁸H_G¹³¹R _F¹³⁴Y (AvrLm3_I58H_G131R _F134Y) were virulent on *Rlm3* cultivar.

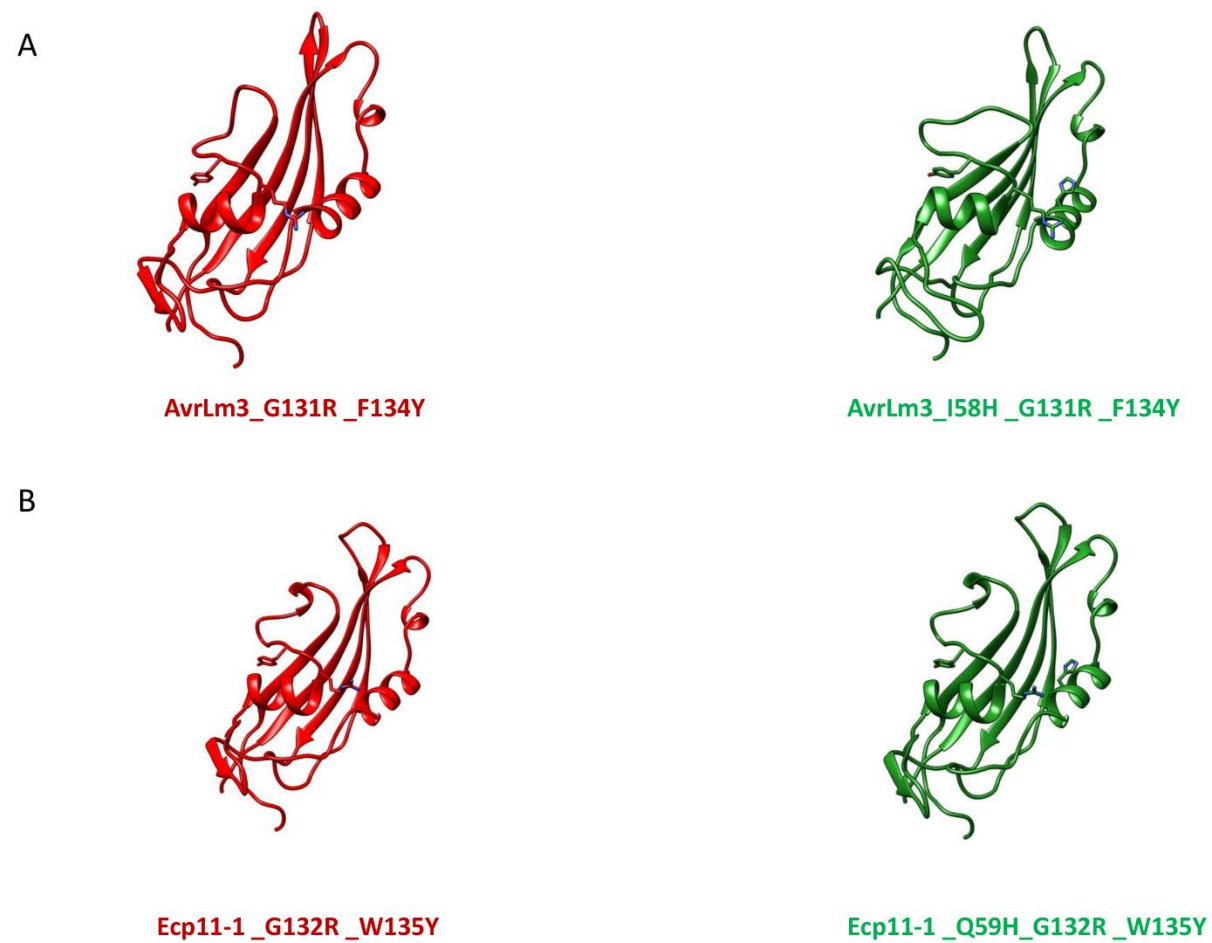


Figure 2. Protein structure prediction of AvrLm3 and Ecp11-1 mutated at different amino acid residues

- A.** Protein structure of mutated alleles of AvrLm3 (double mutation AvrLm3_G131R_F134Y and triple mutation AvrLm3_I58H_G131R_F134Y).
- B.** Protein structure of mutated alleles of Ecp11-1 (double mutation Ecp11-1_G132R_W135Y and triple mutation Ecp11-1_Q59H_G132R_W135Y).

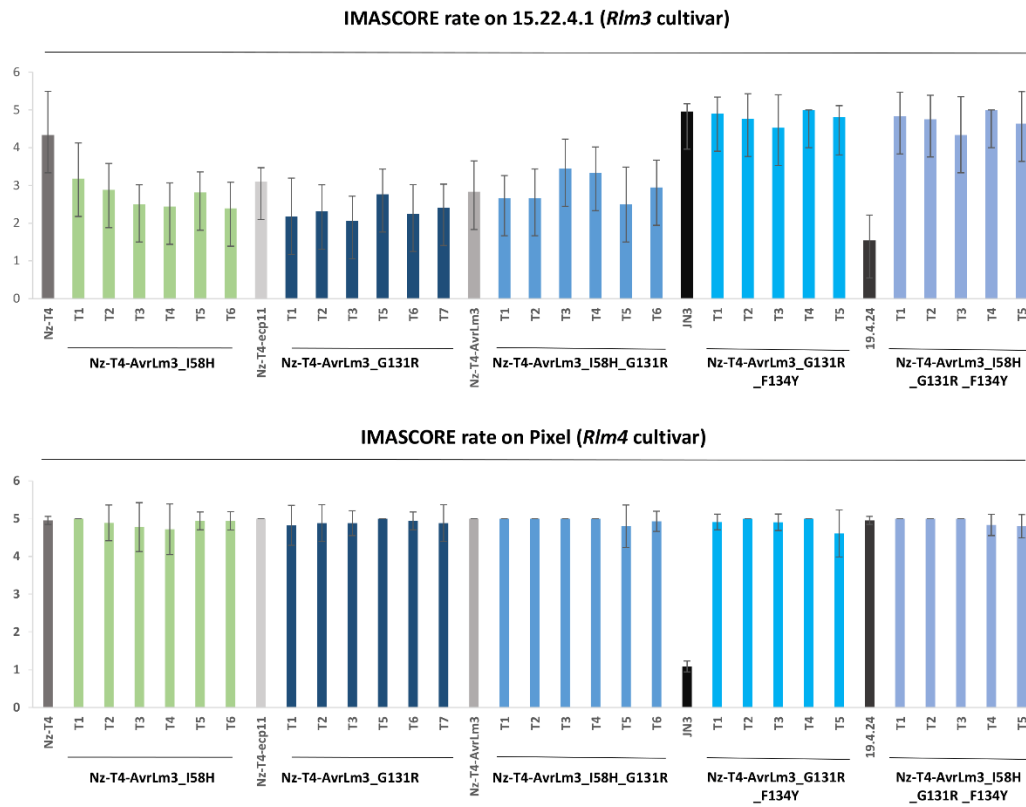
Taken together, these results suggest that the combined changes at G¹³¹ and F¹³⁴ residues in AvrLm3 are sufficient to escape *Rlm3*-mediated recognition. In order to confirm these results, we wanted to assure that the mutated versions of AvrLm3 leading to virulence towards *Rlm3* were expressed in Nz-T4. However, since Nz-T4 (a3a7) isolate possesses a virulent allele of the *AvrLm3* gene which is expressed *in planta*, we checked the expression level of the mutated version of *AvrLm3* in the transformants that were virulent on the *Rlm3* cultivar (Nz-T4-AvrLm3_G131R _F134Y and Nz-T4-AvrLm3_ I58H_G131R _F134Y) using High Resolution Melting (HRM) in order to distinguish the two copies of *AvrLm3*. The expression levels of *AvrLm3* on two transformants obtained from Nz-T4-AvrLm3_G131R _F134Y and Nz-T4-AvrLm3_ I58H_G131R _F134Y were tested using HRM analysis on cDNA of the susceptible cultivar Yudal infected by *L. maculans* 7 days after inoculation. Excepted for one transformant of Nz-T4-AvrLm3_ I58H_G131R _F134Y, both the wild type *AvrLm3* and mutated *AvrLm3* were expressed in all the transformants tested as revealed by the intermediate melting curves obtained compared to the wild type isolates JN2 and Nz-T4 (Figure S1B and C).

Three amino-acid changes in Ecp11-1 are necessary to escape *Rlm3*-mediated recognition

Ecp11-1 shares 37% identity with AvrLm3 with only minor insertions/deletions between the two sequences. The polymorphic residues identified in AvrLm3 that are postulated to be involved in *Rlm3*-mediated recognition correspond to changes I⁵⁸H (Q⁵⁹ in Ecp11-1), G¹³¹R (G¹³² in Ecp11-1) and F¹³⁴Y (W¹³⁵ in Ecp11-1) (Figure 4A). I⁵⁸ is located in the middle of the first α -helix and G¹³²/F¹³⁴ are in a loop that connects the second helix to the last strand (Figures 1B and 4B). In order to assess the involvement of Ecp11-1 residues Q⁵⁹, G¹³² and W¹³⁵ in the induction of *Rlm3*-mediated recognition, we performed site-directed mutagenesis and generated a double mutant (Ecp11-1 _G132R _W135Y) and a triple mutant (Ecp11-1 Q59H _G132R _W135Y). These mutations concern surface residues and are therefore not expected to affect the global structure of Ecp11-1 (Figure 2B). As previously, constructs containing the different *ECP11-1* alleles under the control of the *AvrLm4-7* promoter and the *ECP11-1* terminator in the pPZPnat1 binary vector were introduced via *A. tumefaciens*-mediated transformation into Nz-T4 isolate. Four Nz-T4-Ecp11-1_G132R _W135Y and Nz-T4-Ecp11-1 Q59H _G132R _W135Y transformants were obtained. The transformants were

inoculated onto *B. napus* cvs Pixel (*Rlm4*) and 15.22.4.1 (*Rlm3*). All the transformants, as Nz-T4, were virulent on Pixel. The transformants expressing Ecp11-1 with the double mutation Ecp11-1_G132R_W135Y were avirulent on the *Rlm3* cultivar, indicating that the mutations G¹³²R and W¹³⁵Y were not sufficient to escape *Rlm3*-mediated recognition (Figure 3B).

A



B

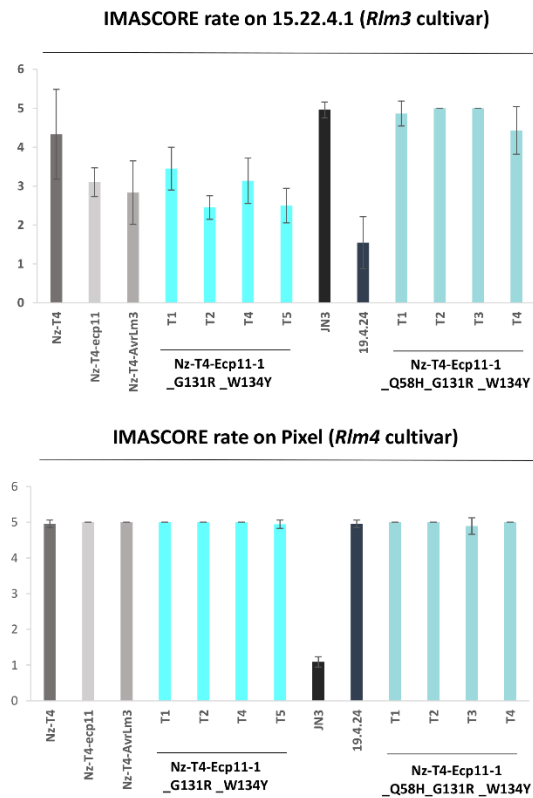
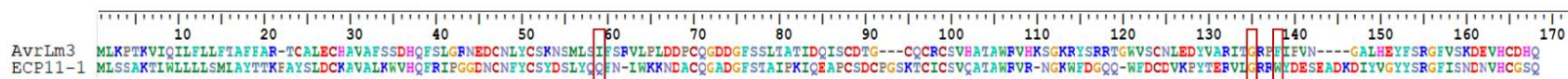


Figure 3. Effect of site-directed mutagenesis on AvrLm3 and Ecp11-1 on the induction of *Rlm3*-mediated recognition

Nz-T4 transformants carrying AvrLm3 mutated at different amino acid residues (single mutants AvrLm3_I58H or AvrLm3_G131R, double mutants AvrLm3_I58H_G131R or AvrLm3_G131R_F134Y and triple mutant AvrLm3_I58H _G131R _F134Y) and B. Nz-T4 transformants carrying Ecp11-1 mutated at different amino acid residues (double mutant Ecp11-1 _G132R _W135Y and triple mutant Ecp11-1_Q59H _G132R _W135Y) were inoculated onto cotyledons of a cultivar carrying *Rlm3* (15.22.4.1) or *Rlm4* (Pixel).

Wild type isolates 19.4.24 (A3a4a7), Nz-T4 (a3a4a7) and JN3 (a3A4A7) as well as Nz-T4 transformants carrying AvrLm3 or Ecp11-1 were used as controls. Pathogenicity was measured 12 days post infection. Results are expressed as a mean scoring using the IMAScore rating comprising six infection classes (IC), where IC1 to IC3 correspond to resistance, and IC4 to IC6 to susceptibility (Balesdent *et al.*, 2005). Error bars indicate the standard deviation of technical replicates.

A



B

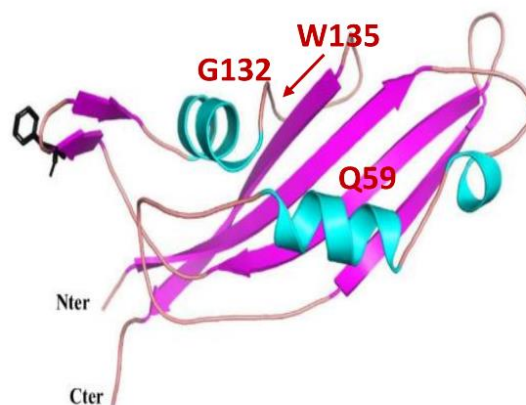


Figure 4. Alignment of AvrLm3 and Ecp11 protein sequences and localization of polymorphic residues on the Ecp11-1 3D structure

A. Alignment of AvrLm3 and ECP11 protein sequences using BioEdit software.

B. 3D structure of Ecp11-1. The residues highlighted in red correspond to the amino acids that were mutated in our study.

In contrast, all the transformants expressing the Ecp11-1 triple mutant Q⁵⁹H_G¹³²R_W¹³⁵Y (Ecp11-1_ Q59H_G132R _W135Y) were virulent on *Rlm3* cultivar. For these last transformants, the expression of Ecp11-1 was validated by qRT-PCR for two of the transformants, confirming that the gene is expressed and the protein unable to be recognized by Rlm3 (Figure S1A). Taken together, these results suggest that the cumulated changes at Q⁵⁹, G¹³² and F¹³⁵ residues in Ecp11-1 are necessary to escape *Rlm3*-mediated recognition.

Homologues of AvrLm3 and Ecp11-1 are present in two other phytopathogenic fungal species.

As previously mentioned, Ecp11-1 is a homologue of AvrLm3 sharing 37 % identity and able to trigger *Rlm3*-mediated resistance in oilseed rape. This encouraged us to search for other AvrLm3 homologues capable of triggering *Rlm3*-mediated recognition. We performed a psi-blast (Position-Specific Iterative Basic Local Alignment Search Tool), with 5 iterations on the NCBI nr database and identified, in addition to Ecp11-1, two more homologues, one from *Fusarium oxysporum* f. sp. cepae and one from f. sp. narcissi. We also performed a tblastn against fungal genomes available on the JGI's Mycocosm database and on Ensembl Fungi and identified additional homologues in *Zymoseptoria ardabiliae* and *Setosphaeria turcica*. The homologues identified in *Setosphaeria turcica* corresponded to pseudo-genes and were not kept for further analysis. In final, we found four AvrLm3/Ecp11-1 homologues from Dothideomycetes and Sordariomycetes species. Two of them were found in the Sordariomycetes *F. oxysporum* f.sp. narcissi and *F. oxysporum* f. sp. cepae respectively pathogenic on basal rot of *Narcissus* and onion. The two other homologues were found in the Dothideomycete *Z. ardabiliae*, a species closely related to the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*, isolated from two distinct grass species: *Lolium perenne* (Ray grass) and *Dactylis glomerata* (Orchard grass). The size of three of the homologues, named *Zymoseptoria_ardabiliae_STIR04_1*, *Zymoseptoria_ardabiliae_STIR04_2*, and *Fusarium_oxysporum_narcissi_BFJ63_g18418* ranges from 160 to 167 amino acids, while the fourth, *Fusarium_oxysporum_cepae_BFJ70_g16777* has a size of 145 amino acids. All are enriched in cysteine residues (10 cysteines in the mature proteins) and endowed with a secretion signal peptide (Table 1).

The homologues shared between 24% and 46% protein sequence identity with AvrLm3 and between 27% and 40% with Ecp11-1 (Table 2). The highest percentage of identity (48%) was found for the two proteins from *Zymoseptoria_ardabiliae* (Table 2).

Table 1. Characteristics of AvrLm3 and Ecp11-1 homologous proteins identified in *Fusarium_oxysporum* and *Zymoseptoria_ardabiliae*.

Protein name	Size (aa)	Cysteine number^a	Identity with AvrLm3	Identity with ECP11-1	Signal peptide^b
AvrLm3	160	10	-	36%	yes
Ecp11-1	165	10	36%	-	yes
<i>Fusarium_oxysporum_narcissi</i>_BFJ63_g18418	163	10	46%	40%	yes
<i>Fusarium_oxysporum_cepae</i>_BFJ70_g16777	145	10	24%	29%	yes
<i>Zymoseptoria_ardabiliae</i>_STIR04_1	160	10	33%	27 %	yes
<i>Zymoseptoria_ardabiliae</i>_STIR04_2	167	10	35%	32%	yes

^a Cysteine number is calculated on the mature protein, without signal peptide.

^b Prediction using SignalP 3.0 software (*Bendtsen et al., 2004*).

Table 2. Percentage of identity (similarity) between AvrLm3, Ecp11-1 and their homologous proteins identified in *Fusarium_oxysporum* and *Zymoseptoria ardabiliae*

	Ecp11-1	Fusarium_oxysporum_na rcissi_BFJ63_g18418	Fusarium_oxysporum_cep ae_BFJ70_g16777	Zymoseptoria_ ardabiliae_STIR04_1	Zymoseptoria_ ardabiliae_STIR04_2
AvrLm3	36% (53%)	46% (60%)	24% (42%)	33% (46%)	35% (49%)
Ecp11-1		40% (57%)	29% (41%)	27% (43%)	32% (48%)
Fusarium_oxysporum_n arcissi_BFJ63_g18418			26% (40%)	35% (51%)	41% (54%)
Fusarium_oxysporum_c epae_BFJ70_g16777				30% (39%)	26% (39%)
Zymoseptoria_ ardabiliae_STIR04_1					48% (65%)

The identity (similarity) matrix was obtained by performing a reciprocal blastp using the BioEdit sequence alignment editor (matrix: BLOSUM62, Evalue = 1)

The recently developed protein modeling softwares RoseTTafold and AlphaFold2 now offer a great opportunity to accurately predict the 3D-structure of proteins by utilizing novel machine-learning algorithms using amino acid sequences as their only input. To get deeper insight into the structure-function relationship of the AvrLm3/Ecp11-1 homologues, we used ColabFold, the freely accessible AlphaFold2 server. We started by generating a model for AvrLm3 which has 36% sequence identity with Ecp11-1. AlphaFold2 generated a model for AvrLm3 that was close to the Ecp11-1 structure (Figure 5). The AvrLm3 model has a four stranded β -sheet fold covered on one side by 2 helical connections. This fold is characteristic of the LARS family and was observed in the crystal structures of AvrLm4-7, AvrLm5-9 and Ecp11-1. The alphaFold model of AvrLm3 was also very similar to the template based AvrLm3 model obtained from the Ecp11-1 crystal structure (Swiss-model server; Lazar *et al.*, 2020).

We further generated AlphaFold models for *Zymoseptoria_ardabiliae_STIR04_1*, *Zymoseptoria_ardabiliae_STIR04_2*, and *Fusarium_oxysporum_BFJ63_g18418*. AlphaFold2 failed to generate an accurate model for *Fusarium_oxysporum_BFJ70_g16777* and we used for this protein RobettaFold instead. All models displayed the mentioned LARS fold (Figure 5). The root mean square deviation (rmsd) values for the structural superposition of all these models with each other and with the Ecp11-1 crystal structure are gathered in Table S2. The rmsd values vary between 1.5 and 2.2 Å, confirming that the overall structures of these effectors are very similar. All the homologues possess ten cysteines that form superposable disulfide bridges with those from Ecp11-1. *Zymoseptoria_ardabiliae_STIR04_1* has one single cysteine that does not align with the cysteines from the other homologues but it forms a disulfide bridge that superposes on those of the others (Figure 5). We can therefore safely conclude that all the homologues are members of the LARS family with very similar 3D structures. Divergences in the structure between the homologues are however observed in the regions that connect the β -strands.

The AvrLm3 homologue identified in *Fusarium oxysporum* f. sp. *narcissi* triggers *Rlm3*-mediated recognition

We generated constructs containing *Zymoseptoria_ardabiliae_STIR04_1*, *Zymoseptoria_ardabiliae_STIR04_2*, *Fusarium_oxysporum_BFJ63_g18418* and *Fusarium_oxysporum_BFJ70_g16777* under the control of *AvrLm4-7* promoter and *ECP11-1* terminator that were introduced via *A. tumefaciens*-mediated transformation into the Nz-T4 isolate.

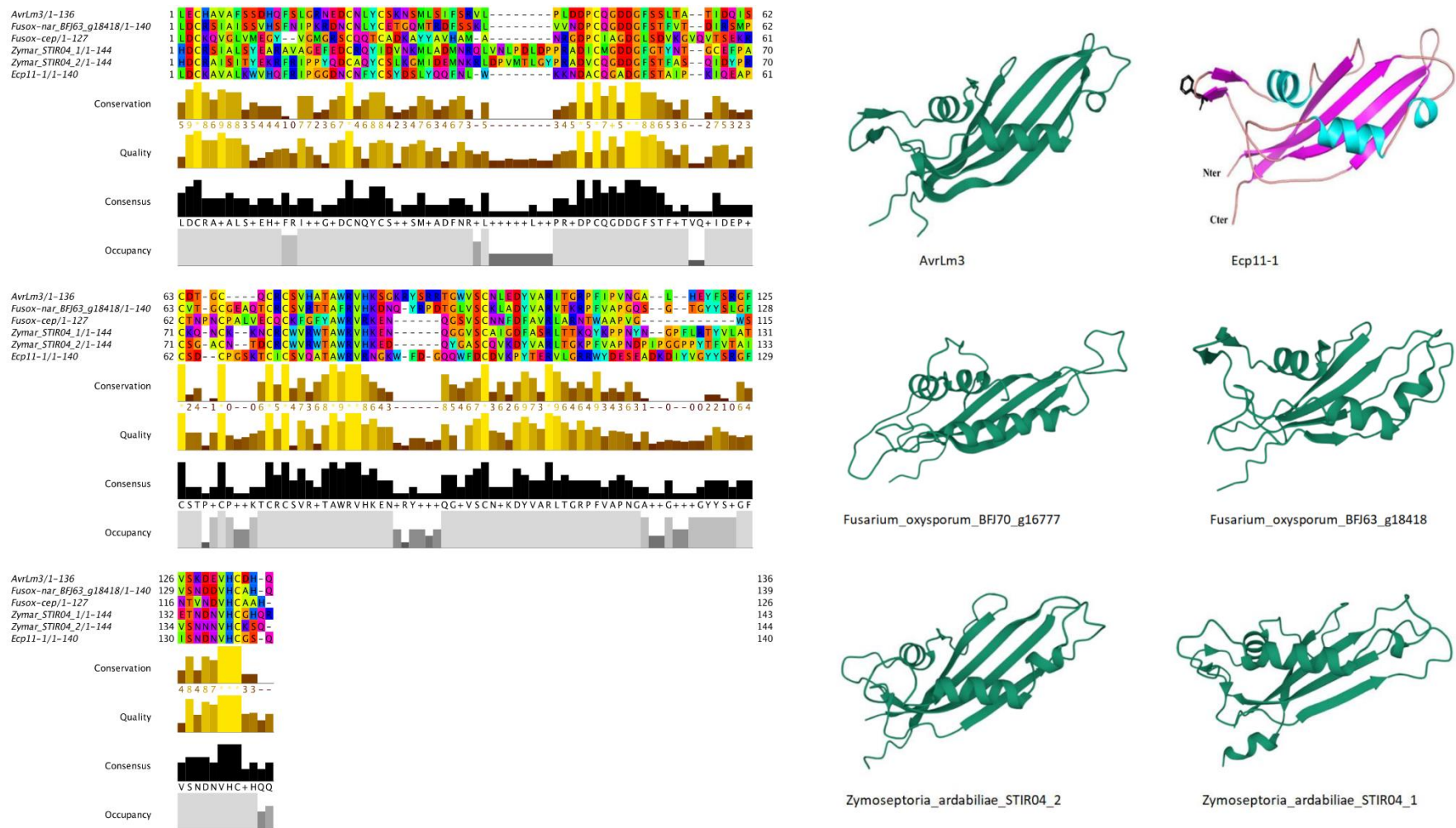
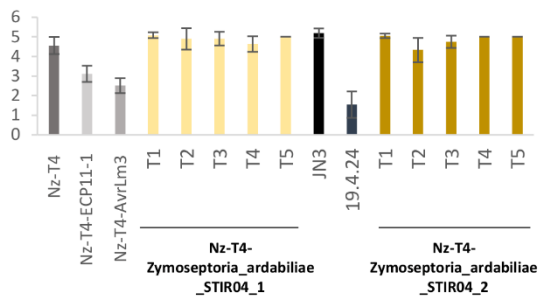


Figure 5. Multiple sequence alignment of AvrLm3/Ecp11-1 and their homologues and prediction of their 3D Structure.

The alignment was displayed using the software Jalview. The 3D structure predictions were performed using either alphaFold or Rosettafold. Ribbon diagrams of the models are presented in the same orientation.

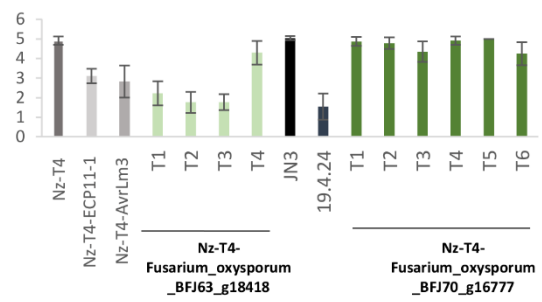
A

IMASCORE rate on 15.22.4.1 (*Rlm3* cultivar)

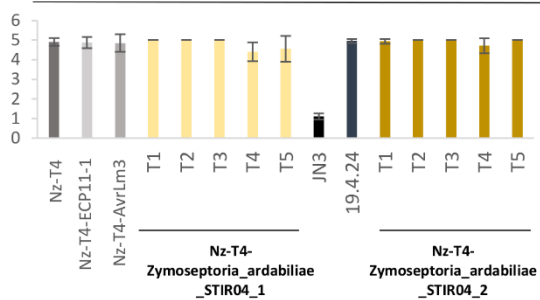


B

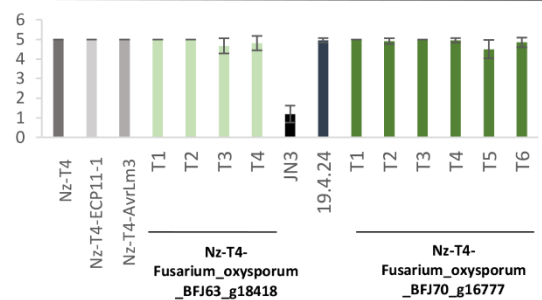
IMASCORE rate on 15.22.4.1 (*Rlm3* cultivar)



IMASCORE rate on Pixel (*Rlm4* cultivar)

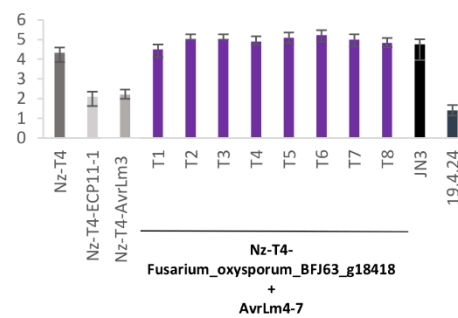


IMASCORE rate on Pixel (*Rlm4* cultivar)



C

IMASCORE rate on 15.22.4.1 (*Rlm3* cultivar)



IMASCORE rate on Pixel (*Rlm4* cultivar)

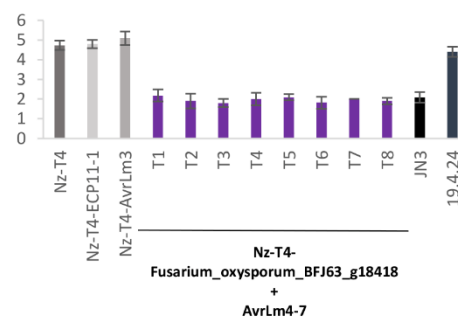


Figure 6. *Fusarium oxysporum narcissi* BFJ63_g18418 triggers *Rlm3*-mediated recognition that is masked by the presence of *AvrLm4-7*. Nz-T4 transformants expressing A. *Zymoseptoria ardabiliae*_STIR04_1 or *Zymoseptoria ardabiliae*_STIR04_2 or B. *Fusarium oxysporum*_BFJ63_g18418 or *Fusarium oxysporum*_BFJ70_g16777 under the control of *AvrLm4-7* promoter were inoculated onto cotyledons of a cultivar carrying *Rlm3* (15.22.4.1) or *Rlm4* (Pixel). C. Nz-T4 transformants carrying both *Fusarium oxysporum*_BFJ63_g18418 and *AvrLm4-7* were inoculated onto cotyledons of a cultivar carrying *Rlm3* (15.22.4.1) or *Rlm4* (Pixel). For all inoculation tests, wild type isolates 19.4.24 (A3a4a7), Nz-T4 (a3a4a7) and JN3 (a3A4A7) as well as Nz-T4 transformants carrying *AvrLm3* or ECP11-1 were used as controls. Pathogenicity was measured 12 days post infection. Results are expressed as a mean scoring using the IMAScore rating comprising six infection classes (IC), where IC1 to IC3 correspond to resistance, and IC4 to IC6 to susceptibility (Balesdent *et al.*, 2005). Error bars indicate the standard deviation of technical replicates

We obtained four transformants for Nz-T4-*Fusarium oxysporum narcissi*_BFJ63_g18418, five transformants both for Nz-T4-*Zymoseptoria ardabiliae*_STIR04_1 and *Zymoseptoria ardabiliae*_STIR04_2 and six transformants for Nz-T4-*Fusarium oxysporum*_BFJ70_g16777. The transformants were inoculated onto *B. napus* cvs Pixel (*Rlm4*) and 15.22.4.1 (*Rlm3*). All transformants, as well as Nz-T4, were virulent on Pixel (Figures 6A and B). When tested on the *Rlm3* cultivar, the Nz-T4-*Fusarium oxysporum narcissi*_BFJ63_g18418 transformants were avirulent, while the other transformants remained virulent (Figures 6A and B). Gene expression of all the homologues was validated by qRT-PCR for one or two of the transformants, confirming that the virulence phenotype is not due to the absence or a low expression of the different genes (Figure S1A). We conclude that *Fusarium oxysporum narcissi*_BFJ63_g18418, as *AvrLm3* and *Ecp11-1*, is able to trigger *Rlm3*-mediated recognition.

The *Rlm3*-mediated recognition triggered by the *AvrLm3* homologue from *Fusarium oxysporum* f. sp. *narcissi* is masked by the presence of *AvrLm4-7*

Lazar *et al.* (2020) previously showed that the presence of *AvrLm4-7* suppressed the ability of *Ecp11-1* to trigger *Rlm3*-mediated recognition. We assessed whether the presence of *AvrLm4-7* was also able to suppress the ability of *Fusarium oxysporum*_BFJ63_g18418 to induce *Rlm3*-mediated recognition. Thus, we complemented a Nz-T4-*Fusarium oxysporum*_BFJ63_g18418 transformant (transformant T3) with *AvrLm4-7* using the plasmid pBht2-*AvrLm4-7* previously constructed by Lazar *et al.* (2020). We obtained eight Nz-T4-*Fusarium oxysporum*_BFJ63_g18418 transformants for which the presence of

AvrLm4-7 was confirmed by PCR (data not shown). We inoculated the transformants on the *B. napus* cultivars Pixel (*Rlm4*), 15.22.4.1 (*Rlm3*) and on a *Rlm7* cultivar (Figure 6C and data not shown). While Nz-T4 was virulent on Pixel (*Rlm4*) and *Rlm7* cultivars, the transformants were avirulent on both cultivars (Figure 6C and data not shown), confirming that *AvrLm4-7* was expressed in the transformants. While the transformants expressing *Fusarium_oxysporum_BFJ63_g18418* were avirulent on *Rlm3* cultivar, the Nz-T4-*Fusarium_oxysporum_BFJ63_g18418-AvrLm4-7* transformants were virulent (Figure 6B-C). We conclude that the presence of *AvrLm4-7* suppresses *Rlm3*-mediated recognition of *Fusarium_oxysporum_BFJ63_g18418*.

Discussion

In this study, we investigated the ability of oilseed rape *R* gene *Rlm3* to recognize *AvrLm3* and its homologues. Using site-directed mutagenesis, we identified amino acids involved in *Rlm3*-mediated recognition of *AvrLm3* and *Ecp11-1*. We further demonstrated the ability of *Rlm3* to recognize a homologue of *AvrLm3* found in *F. oxysporum f. sp. narcissi*, as well as the ability of *AvrLm4-7* to suppress that recognition. These data strongly suggest that *Rlm3* which targets *AvrLm3*, a ‘core’ effector conserved in *L. maculans* isolates and in several plant pathogenic fungi, could be used for broad-spectrum resistance.

Making use of data on *AvrLm3* polymorphism collected in the natural population of *L. maculans*, several polymorphic residues correlating with the avirulent or virulent phenotype towards *Rlm3* were identified. Three polymorphic residues (I/L⁵⁸H, G¹³¹R and F¹³⁴Y) were found in all the virulent alleles except for two (*AvrLm3-Q* and *AvrLm3-H*) which did not have the I/L⁵⁸H or F¹³⁴Y polymorphism respectively. Interestingly, projection of the polymorphic amino acid positions of *AvrLm4-7* and *AvrLm5-9* in *L. maculans* populations onto their 3D structure proved to be informative. Only three polymorphic alleles of *AvrLm5-9* were reported in *L. maculans* populations (Ghanbarnia *et al.*, 2018), including two point mutations at residue R⁵⁵ to either T or K leading to virulence towards *Rlm9*. Similarly, Parlange *et al.* (2009) identified one point mutation in *AvrLm4-7* at residue G¹²⁰ to R that is responsible for virulence towards *Rlm4*. Residue I⁵⁸ is located in the same region of the *AvrLm3* structure as residue R⁵⁵ in *AvrLm5-9*. The same way, residue G¹³¹ is located in the same region of the *AvrLm3* structure as residue G¹²⁰ (responsible for the switch to virulence towards *Rlm4*) in the *AvrLm4-7* structure, suggesting the same protein regions could be involved in the virulence phenotypes. These residues could be part of regions that are in contact with the corresponding resistance proteins. Furthermore, Haddadi *et al.* (2021) recently cloned *Rlm4*

and *Rlm7* and found they were allelic to *Rlm9* (Larkan *et al.*, 2020), *Rlm3* being also closely linked to them and possibly allelic (Delourme *et al.*, 2004). This suggests that all these R proteins will have almost identical 3D structures and therefore could interact similarly with their respective cognate AVR proteins. We demonstrated that the double mutation G¹³¹R/F¹³⁴Y was sufficient to escape *Rlm3*-mediated recognition. Consequently, residue I/L⁵⁸ does not appear to be necessary to induce recognition of AvrLm3 by Rlm3, which is consistent with the polymorphism in *L. maculans* populations, since a virulent allele (AvrLm3-Q) of AvrLm3 carried L⁵⁸ residue. However, we found that the corresponding residue in Ecp11-1 (Q⁵⁹) was involved in the recognition of Ecp11-1 by Rlm3. Indeed, only the triple mutant Q⁵⁹H/G¹³²R/W¹³⁵Y allowed Ecp11-1 to escape Rlm3-mediated recognition and not the G¹³²R/W¹³⁵Y double mutant. This last result comforts our choice to test the involvement of three residues in the interaction with Rlm3 and shows the importance of combining polymorphism data, phenotypic characterization as well as structural information to characterize R/AVR interactions. The involvement of a third amino acid in the recognition of Ecp11-1 by Rlm3 could be explained by a slightly different interacting region allowing a less efficient recognition by Rlm3, whether that interaction is direct or indirect. Indeed, although the mutations are not predicted to affect the global structure of Ecp11-1, they could, nevertheless, reduce the interacting surface. An example of a single plant protein that is targeted by two different AVR proteins is provided by the tomato protein Pto. The latter is a serine/threonine protein kinase guarded by the R protein Prf and is targeted by two AVR proteins from *Pseudomonas syringae* pv. tomato, AvrPto and AvrPtoB (Kim *et al.*, 2002). AvrPto and AvrPtoB are no homologues and their 3D structures are different. Nevertheless, the crystal structure of the complexes between AvrPtoB and Pto and between AvrPto and Pto revealed that both AVR proteins bind to the same surface of Pto but that the detailed interactions are not similar (Dong *et al.*, 2009). Another example is given by the AVR protein AvrL567 from *Melampsora lini*. Distinct alleles of AvrL567 are recognized by the R proteins L5, L6 and L7 from flax through a direct interaction. 3-D structures of two alleles of AvrL567 revealed that polymorphic amino acids were located at the protein surface, changing their affinity for R proteins in a cumulative manner (Wang *et al.*, 2007).

We found four homologues of AvrLm3 and Ecp11-1, with no predicted function, in other plant pathogenic fungal species: two in *Z. ardabiliae* and two in two *forma specialis* of *F. oxysporum*. Even if distantly related, *Z. ardabiliae*, *L. maculans* and *F. fulvum*, belong to the Dothideomycetes, and the presence of AvrLm3 homologues in these three species could more or less be expected. It was more of a surprise to find homologues in a much more distant

species as *F. oxysporum* belonging to the Sordariomycetes. Nevertheless, this is not the first time that homologous effector/AVR proteins of *L. maculans* are found in *F. oxysporum*: AvrLm2 showed sequence homologies with Six1 (also known as Avr3; Ghanbarnia *et al.*, 2015) and the AvrLm10A/AvrLm10B pair of *L. maculans* AVR effectors was found conserved in several *Fusarium* species (Petit-Houdenot *et al.*, 2019; Talbi *et al.*; 2022). It is interesting to notice that all four species, *L. maculans*, *F. fulvum*, *F. oxysporum* and *Z. ardabiliae* share the same hemibiotrophic and apoplastic / vascular lifestyle, which may influence their effector repertoire, and the conservation of common effectors acting during the asymptomatic colonization. The sequence identity levels (between 23 and 43%) are highly significant considering these effectors are under strong selection pressure and evolve rapidly. Moreover, the alphaFold/RosettaFold predictions of the 3D structure of these homologues confirm they all have the LARS fold consisting of a four stranded β -sheet covered by helices and loops on one side. All the AvrLm3 homologues have 10 cysteines involved in superposable disulfide bridges. These observations establish their common evolutionary origin.

Among the four homologous proteins expressed into *L. maculans*, only *Fusarium_oxysporum_narcissi_BFJ63_g18418*, was recognized by Rlm3. This is not surprising since the protein shares the highest sequence identity with AvrLm3 and Ecp11-1 (46% and 40% respectively). However, *Fusarium_oxysporum_narcissi_BFJ63_g18418* shares only one of the residues we found involved in the recognition by Rlm3, F¹²² (corresponding to F¹³⁴ in AvrLm3 and to W¹³⁵ in Ecp11-1). Focusing on the residues involved in the recognition by Rlm3, *Zymoseptoria_ardabiliae_STIR04_2* appears as a good candidate since it shares two of these residues with AvrLm3 (G¹³¹ and F¹³⁴). However, although all the homologues transformed into *L. maculans* were highly expressed, *Zymoseptoria_ardabiliae_STIR04_2* was not able to induce Rlm3-mediated recognition, suggesting that conservation of the overall 3D-structure is also crucial for recognition. The structure of *Zymoseptoria_ardabiliae_STIR04_2* is very similar to the crystal structure of Ecp11-1 and to the model of AvrLm3. Although all homologues possess the same fold, notable differences exist in the conformations of the connections between the strands, where many of the polymorphic positions are situated. Sequence alignment of the AvrLm3 homologues revealed some highly conserved peptides (⁴⁸DGV, ⁸⁰WRV and ¹³⁵VH, Ecp11-1 numbering). Interestingly these sequences form a conserved patch on one side of the β -sheet, opposite to the side covered by the connections. This patch is not near the residues that were identified to be important for the Rlm3-mediated recognition, but could hint a region that is involved in

effector-target interaction. In absence of structures of complexes with their target or R proteins, it remains very difficult to speculate why one homologue is recognized by Rlm3 but not the others.

Recognition of AvrLm3, Ecp11-1 and *Fusarium_oxysporum_narcissi_BFJ63_g18418* by Rlm3 was suppressed by the presence of *AvrLm4-7*. *AvrLm4-7* also suppresses recognition of *AvrLm5-9* by Rlm9. *AvrLm4-7* does not interact directly with *AvrLm3* nor with *AvrLm5-9* but shares the same protein fold (Lazar *et al.*, 2020), as does Ecp11-1 and, according to our prediction, *Fusarium_oxysporum_narcissi_BFJ63_g18418*. Lazar *et al.* (2020) hypothesized that, since these proteins had very similar 3D structures, they could target the same plant components or cellular processes or be recognized by the same R proteins. *Rlm9*, *Rlm4* and *Rlm7*, all allelic, were reported as encoding a Wall Associated Kinase-Like (WAKL) protein (Larkan *et al.*, 2020; Haddadi *et al.*, 2021). *AvrLm3*, *AvrLm5-9* and *AvrLm4_7* could target the same plant protein but with a higher affinity in the case of *AvrLm4-7*, this interaction being detected by their cognate R proteins. That higher affinity would be responsible for the suppression of recognition of *AvrLm3*, and *AvrLm5-9* by the Rlm3 and Rlm9 respectively.

In summary, we have now identified three effectors from three distinct plant pathogenic fungal species able to induce recognition by Rlm3, suggesting *Rlm3* could be used as a broad-spectrum resistance. However, neither *F. fulvum* nor *F. oxysporum* f. sp. *narcissi* are pathogenic of oilseed rape, but, interestingly, the genus *Fusarium* and *Cladosporium* have been identified in the microbiota associated with oilseed rape during *L. maculans* infection (Kerdran *et al.*, 2019, 2020). As soon as the corresponding genomes will have been sequenced, it will be interesting to look for *AvrLm3* homologues in these species and study their interaction with Rlm3. Homologues of *AvrLm3* in different plant pathogenic fungi could also be used to identify R genes in the corresponding host plants, as potential new sources of resistance. Hypothesizing that *Rlm3* could potentially be allelic to *Rlm4*, *Rlm7* and *Rlm9*, and encode a WAKL protein, the R proteins recognizing *AvrLm3* homologues in other host plants, such as Cf-ecp11-1 in wild tomatoes, could also correspond to WALK proteins, which would help identifying these proteins among R protein candidates. Alternatively, Rlm3 could be transferred from oilseed rape into host plant of pathogens carrying *AvrLm3* homologues.

Materials and Methods

***Leptosphaeria maculans*, bacteria and plant growth conditions**

The *L. maculans* Nz-T4 isolate (virulent towards *Rlm3*, *Rlm4* and *Rlm7*) is a field isolate from New Zealand (Parlange *et al.*, 2009) that was used to perform all the *A. tumefaciens*-mediated transformations. The v23.1.3 isolate (avirulent towards *Rlm4* and *Rlm7*, and virulent towards *Rlm3*; also known as JN3) originated from *in vitro* cross #23 (Balesdent *et al.*, 2001) and was used as a control in the pathogenicity tests. Fungal cultures were maintained on V8 juice agar medium (Vegetable juice) at 25°C for 7 days in the dark for mycelial growth and between 10 and 14 days under a mixture of white and near UV light for sporulation and conidial production (Ansan-Melayah *et al.*, 1995). *L. maculans* spores were harvested for transformation and incubated in Fries liquid medium (yeast extract 5 g/L, NH₄ 5 g/L, sucrose 30 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, NH₄NO₃ 1 g/L, MgSO₄ 500 mg/L, CaCl₂ 130 mg/L, NaCl 100 mg/L) for germination 24 h at 28°C under agitation (200 rpm).

Escherichia coli strain DH5 α and *A. tumefaciens* strain C58 pGV2260 were grown on LB medium (peptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L) containing the appropriate antibiotics at the appropriate concentration: rifampicin 25 μ g/ml, ampicillin 50 μ g/ml, kanamycin 100 μ g/ml. The *E. coli* strains were incubated for 24 hours at 37°C, while the *A. tumefaciens* strains were incubated for 48 hours at 28°C.

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

Fungal transformation

A. tumefaciens-mediated transformation was performed on *L. maculans* as described by Gout *et al.* (2006). Transformants were selected on minimal medium with nourseothricin (50mg/mL) or 50 μ g/ml hygromycin and Cefotaxime (250mg/mL), and purified by isolating individual pycnidia on selective medium after sporulation.

Inoculation tests on oilseed rape

A cotyledon-inoculation test as describe by Balesdent *et al.* (2002) was used to phenotype the *L. maculans* isolates and transformants generated for their virulence towards *Rlm3*, *Rlm7* and *Rlm4* oilseed rape genotypes. Spore suspensions (10⁷ pycnidiospores/ml) of each isolate or transformant were inoculated on 10-12 plants of the *B. napus* Pixel (*Rlm4*), 15.22.4.1 (*Rlm3*) and 18.22.6.1 (*Rlm7*) cultivars. Symptoms were scored 12-21 days post-inoculation (dpi) using a semi-quantitative 1 (avirulent) to 6 (virulent) rating scale with a score 1 to 3 that

represents different levels of resistance (from typical HR to delayed resistance) and 4 to 6 different levels of susceptibility (mainly evaluated by the intensity of sporulation on lesions; Balesdent *et al.*, 2005). Pathogenicity tests were repeated twice.

Plasmid constructs and DNA manipulation

The sequences of interest (*AvrLm3* and *ECP11-1* with mutations in one to three residues of interest, and the 4 *AvrLm3* homologues identified in *F. oxysporum* and *Z. ardabiliae*) were synthesized and cloned into a pTwist_amp vector by Twist Bioscience (San Francisco, California, USA). Restriction sites were integrated on both sides of the different genes of interest by the supplier (*EcoRI/XhoI* or *SalI/XhoI*).

The plasmid pPZPnat1-prom*AvrLm4-7* was used for both cloning of constructs and transformation of *L. maculans*. It corresponds to the plasmid pPZPnat1 which contains a kanamycin resistance cassette for the selection of transformed bacteria (*A. tumefaciens* and *E. coli*) and a nourseothricin resistance gene used for the selection of fungal transformants (Gardiner *et al.*, 2005) to which the *AvrLm4-7* promoter was added (Lazar *et al.*, 2020).

Constructs allowing expression of the genes of interest under the control of the *AvrLm4-7* promoter and the *ECP11-1* terminator were generated using the GIBSON cloning kit (New-England Biolabs, Evry, France). The pPZPnat1-prom*AvrLm4-7* vector was digested with *EcoRI* and *XhoI* or *SalI* and *XhoI* (in the case of *Zymoseptoria_ardabiliae_STIR04_1*) according to the supplier's recommendations. In parallel, the inserts corresponding to the genes of interest and the terminator of *ECP11-1* were amplified by PCR using Phusion Taq polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA) under suitable PCR conditions and specific primers constructed according to the recommendations of the cloning kit (Table S1). The inserts were then integrated into the pPZPnat1-prom*AvrLm4-7* vector using the NEBuilder GIBSON DNA assembly according to the supplier's recommendations. The plasmid pBht2-*AvrLm4-7* containing *AvrLm4-7* gene, promoter and terminator and containing an hygromycin resistance gene used for the selection of fungal transformants was previously constructed by Lazar *et al.* (2020).

RNA extraction, reverse transcription and qRT-PCR analysis

RNA of infected cotyledons was extracted using the TRIzol® Reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and cDNA was generated using oligo-dT primed reverse transcription with PrimeScript Reverse Transcriptase (Clontech, Palo Alto, CA, U.S.A.) as described by Plissonneau *et al.* (2016). Quantitative RT-PCR was performed using a Bio-Rad CFX96

Touch Real-Time PCR Detection System and ABsolute SYBR Green ROX dUTP Mix (ABgene, Courtaboeuf, France) as described by Fudal *et al.* (2007) for expression analysis in transformed isolates. To evaluate the expression level, Ct values were analysed as described by Muller *et al.* (2002). For each value measured, two technical replicates and two biological replicates were done. All primers used for qRT-PCR are detailed in **Table S1**.

HRM experiments and analyses

HRM was performed to analyze expression levels in transformed isolates containing to copies of *AvrLm3* differing by a few nucleotides. The HRM mix was composed of 2 μ L of cDNA template, 4 μ L of each primer (2 μ M, Table S1) and 10 μ L of SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, United States). PCR amplification was done with a Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System according to the manufacturer's instructions: an initial denaturation step at 98°C for two minutes, followed by 40 cycles at 98°C for 5 seconds, 60°C for 5 seconds and a final melting step from 60°C to 95°C with an increase of 0.2°C every 5 seconds. HRM curve analysis was performed by collecting data from the melting step and results were analysed with the Bio-Rad Melt Curve Analysis™ Software.

Bioinformatics analysis and structure prediction

To search for *AvrLm3* homologues, a psi-blast analysis was performed against the NCBI nr database. The analysis was completed with a tblastn search against fungal genomes available on the JGI's Mycocosm database and on Ensembl Fungi.

We generated 3D structural models for the *AvrLm3* analogues with AlphaFold and/or RoseTTAFold using the Colab server:

<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/%20main/RoseTTAFold.ipynb>

This server predicts protein structures starting from their sequences using a slightly simplified version of AlphaFold v2.0 that does not consider existing structural templates. The reliability of the structure predictions was assessed by the Local Distance Difference Test (LDDT) score, as reported by the programs.

Structural models were analyzed with PyMOL version 2.5.1 (Schrödinger, LLC) or Chimera.

It should be mentioned that the crystal structures of Ecp11-1 and *AvrLm5-9* were not in the PDB database. Curiously, AlphaFold2 was unable to create a satisfactory model for *Fusarium_oxysporum_BFJ70_g16777*. For this case, we used the RoseTTAFold software.

Sequence alignment used the web service functionalities of the Jalview platform

To identify putative functional amino acids and estimate their evolutionary conservation profile, we used the web server tool ConSurf. The conservation grades were mapped onto the query structure and specified using the ConSurf color-code, with cyan-through-purple corresponding to grades 1 (most evolving) through 9 (most evolutionary conserved).

Acknowledgements

Authors wish to thank all members of the “Effectors and Pathogenesis of *L. maculans*” group, Anaïs Pitarch and Alicia Noly for help with plasmid cloning and QPCR. N. Talbi was funded by a PhD salary from the University Paris-Saclay. The “Effectors and Pathogenesis of *L. maculans*” group benefits from the support of Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-17-EUR-0007). This work was supported by the Plant Health and Environment Division of INRAE (AAP 2019 Resistrans) and the French National Research Agency project STARlep (ANR-20-CE20-0026).

References

- Ansan-Melayah, D., Balesdent, M. H., Buee, M., Rouxel, T. (1995) Genetic characterization of AvrLm1, the first avirulence gene of *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology*, 85 : 1525-1529.
- Ashkenazy, H., Abadi, S., Martz, E., Chay, O., Mayrose, I., Pupko, T. *et al.* (2016) ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic acids research*, 44:344-350.
- Balesdent, M. H., Attard, A., Ansan-Melayah, D., Delourme, R., Renard, M., *et al.* (2001) Genetic control and host range of avirulence toward Brassica napus cultivars Quinta and Jet Neuf in *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology*, 91: 70-76.
- Balesdent, M. H., Attard, A., Kühn, M. L., & Rouxel, T. (2002) New avirulence genes in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology*, 92: 1122-1133.
- Balesdent, M. H., Fudal, I., Ollivier, B., Bally, P., Grandaubert, J., Eber, F. *et al.* (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. *et al.* (2015). Résistance du colza au phoma: où en est l'efficacité de Rlm7?. *Phytoma la Défense des Végétaux*, 684:20-24.

- Brun, H., Chèvre, A. M., Fitt, B. D., Powers, S., Besnard, A. L., Ermel, M. *et al.* (2009) Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytologist*, 185:285-299.
- Cantila, A. Y., Saad, N. S. M., Amas, J. C., Edwards, D., *et al.* (2020) Recent findings unravel genes and genetic factors underlying *Leptosphaeria maculans* resistance in *Brassica napus* and its relatives. *International Journal of Molecular Sciences*, 22: 313.
- Degrave A, Wagner M, George P, Coudard L, Pinochet X, Ermel M, *et al.* (2021) A new avirulence gene of *Leptosphaeria maculans*, AvrLm14, identifies a resistance source in American broccoli (*Brassica oleracea*) genotypes. *Molecular Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1111/mpp.13131>
- Delourme, R., Pilet-Nayel, M. L., Archipiano, M., Horvais, R., Tanguy, X., Rouxel, T. *et al.* (2004) A cluster of major specific resistance genes to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *Phytopathology*, 94:578-583.
- Depotter, J. R., *et al.* (2020) Target the core: durable plant resistance against filamentous plant pathogens through effector recognition. *Pest Management Science*, 76:426-431.
- Dong, J., Xiao, F., Fan, F., Gu, L., Cang, H., Martin, G. B., *et al.* (2009) Crystal structure of the complex between Pseudomonas effector AvrPtoB and the tomato Pto kinase reveals both a shared and a unique interface compared with AvrPto-Pto. *The Plant Cell*, 21:1846-1859.
- Fudal, I., Ross, S., Gout, L., Blaise, F., Kuhn, M. L., Eckert, M. R., *et al.* (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.
- Gardiner, D. M., Jarvis, R. S., & Howlett, B. J. (2005) The ABC transporter gene in the sirodesmin biosynthetic gene cluster of *Leptosphaeria maculans* is not essential for sirodesmin production but facilitates self-protection. *Fungal genetics and biology*, 42: 257-263.
- Gay, E. J., Soyer, J. L., Lapalu, N., Linglin, J., Fudal, I., Da Silva, C. *et al.* (2021) Large-scale transcriptomics to dissect 2 years of the life of a fungal phytopathogen interacting with its host plant. *BMC biology*, 19:1-27.
- Ghanbarnia, K., Fudal, I., Larkan, N. J., Links, M. G., Balesdent, M. H., Profotova, B. *et al.* (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, N. J., Haddadi, P., Fernando, W. G. D., *et al.* (2018) *Leptosphaeria maculans* AvrLm9: a new player in the game of hide and seek with AvrLm4-7. *Molecular plant pathology*, 19 :1754-1764.
- Gout, L., Fudal, I., Kuhn, M. L., Blaise, F., Eckert, M., Cattolico, L. *et al.* (2006) Lost in the middle of nowhere: the *AvrLm1* avirulence gene of the *Dothideomycete* *Leptosphaeria maculans*. *Molecular microbiology*, 60: 67-80.
- Haddadi, P., Larkan, N. J., Van de Wouw, A., Zhang, Y., Neik, T. X., Beynon, E. *et al.* (2021) *Brassica napus* genes *Rlm4* and *Rlm7*, conferring resistance to *Leptosphaeria maculans*, are alleles of the *Rlm9* wall-associated kinase-like resistance locus. *bioRxiv*.
- Huang, Y. J., Balesdent, M. H., Li, Z. Q., Evans, N., Rouxel, T., *et al.* (2010) Fitness cost of virulence differs between the *AvrLm1* and *AvrLm4* loci in *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker of oilseed rape). *European Journal of Plant Pathology*, 126: 279-291.
- Huang, Y. J., Evans, N., Fitt, B. D. L., Li, Z. Q., Rouxel, T., *et al.* (2006) Fitness cost associated with loss of the *AvrLm4* avirulence function in *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker of oilseed rape). In *Sustainable strategies for managing Brassica napus* (oilseed rape) resistance to *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) (pp. 77-89). Springer, Dordrecht.
- Jiquel, A., Gervais, J., Geistodt-Kiener, A., Delourme, R., Gay, E. J., Ollivier, B. *et al.* (2021) A gene-for-gene interaction involving a ‘late’ effector contributes to quantitative resistance to the stem canker disease in *Brassica napus*. *New Phytologist*.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006) The plant immune system. *nature*, 444:323-329.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O. *et al.* (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596: 583-589.
- Kerdraon, L., Barret, M., Balesdent, M. H., Suffert, F., *et al.* (2020) Impact of a resistance gene against a fungal pathogen on the plant host residue microbiome: The case of the *Leptosphaeria maculans*–*Brassica napus* pathosystem. *Molecular plant pathology*, 21:1545-1558.
- Kerdraon, L., Balesdent, M. H., Barret, M., Laval, V., *et al.* (2019) Crop residues in wheat-oilseed rape rotation system: a pivotal, shifting platform for microbial meetings. *Microbial ecology*, 77: 931-945.
- Kim, J. H., & Castroverde, C. D. M. (2020) Diversity, function and regulation of cell surface and intracellular immune receptors in Solanaceae. *Plants*, 9: 434.

- Larkan, N. J., Lydiate, D. J., Parkin, I. A. P., Nelson, M. N., Epp, D. J., Cowling, W. A. *et al.* (2013) The *Brassica napus* blackleg resistance gene *LepR3* encodes a receptor-like protein triggered by the *Leptosphaeria maculans* effector AvrLm 1. *New Phytologist*, 197: 595-605.
- Larkan, N. J., Ma, L., & Borhan, M. H. (2015) The *Brassica napus* receptor-like protein RLM 2 is encoded by a second allele of the *LepR3/Rlm2* blackleg resistance locus. *Plant Biotechnology Journal*, 13:983-992.
- Larkan, N. J., Ma, L., Haddadi, P., Buchwaldt, M., Parkin, I. A., Djavaheri, M., *et al.* (2020) The *Brassica napus* wall-associated kinase-like (WAKL) gene *Rlm9* provides race-specific blackleg resistance. *The Plant Journal*, 104 :892-900.
- Lazar, N., Mesarich, C. H., Petit-Houdenot, Y., Talbi, N., de la Sierra-Gallay, I. L., Zélie, E. *et al.* (2021) A new family of structurally conserved fungal effectors displays epistatic interactions with plant resistance proteins. *bioRxiv*, 2020-12.
- Lozano-Torres, J. L., Wilbers, R. H., Warmerdam, S., Finkers-Tomczak, A., Diaz-Granados, A., van Schaik, C. C. *et al.* (2014) Apoplastic venom allergen-like proteins of cyst nematodes modulate the activation of basal plant innate immunity by cell surface receptors. *PLoS pathogens*, 10: e1004569.
- McDonald, B. A., & Linde, C. (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual review of phytopathology*, 40:349-379.
- McDonald, B. A., & Stukenbrock, E. H. (2016) Rapid emergence of pathogens in agro-ecosystems: global threats to agricultural sustainability and food security. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371:20160026.
- Muller, P. Y., Janovjak, H., Miserez, A. R., & Dobbie, Z. (2002) Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT PCR. *Biotechniques*, 33: 514-514.
- Neik, T. X., Ghanbarnia, K., Ollivier, B., Scheben, A., Severn-Ellis, A., Larkan, N. J. *et al.* (2020) Two independent approaches converge to the cloning of a new *Leptosphaeria maculans* avirulence effector gene, *AvrLmS-Lep2*. *Biorxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.02.322479>
- Mesarich, C. H., Ökmen, B., Rovenich, H., Griffiths, S. A., Wang, C., Karimi Jashni, M. *et al.* (2018) Specific hypersensitive response-associated recognition of new apoplastic effectors from *Cladosporium fulvum* in wild tomato. *Molecular plant-microbe interactions*, 31:145-162.
- Nováková, M., Šašek, V., Trdá, L., Krutinová, H., Mongin, T., Valentová, O. *et al.* (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.

Oliva R, Win J, Raffaele S, Boutemy L, Bozkurt T.O, Chaparro-Garcia A, Segretin M.E, Stam R, Schornack S, Cano L.M, *et al.* (2010) Recent developments in effector biology of filamentous plant pathogens. *Cell. Microbiol.* 12 : 705–715.

Parlange, F., Daverdin, G., Fudal, I., Kuhn, M. L., Balesdent, M. H., Blaise, F. *et al.* (2009). *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm4-7* confers a dual recognition specificity by the *Rlm4* and *Rlm7* resistance genes of oilseed rape, and circumvents Rlm4-mediated recognition through a single amino acid change. *Molecular microbiology*, 71 : 851-863.

Petit-Houdenot, Y., Degrave, A., Meyer, M., Blaise, F., Ollivier, B., Marais, C. L. *et al.* (2019) A two genes–for–one gene interaction between *Leptosphaeria maculans* and *Brassica napus*. *New Phytologist*, 223 : 397-411.

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. *et al.* (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25 :1605-1612.

Plissonneau, C., Blaise, F., Ollivier, B., Leflon, M., Carpezat, J., Rouxel, T., *et al.* (2017) Unusual evolutionary mechanisms to escape effector-triggered immunity in the fungal phytopathogen *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Ecology*, 26: 2183-2198.

Plissonneau, C., Daverdin, G., Ollivier, B., Blaise, F., Degrave, A., Fudal, I. *et al.* (2016) A game of hide and seek between avirulence genes *AvrLm4-7* and *AvrLm3* in *Leptosphaeria maculans*. *New Phytologist*, 209 : 1613-1624.

Rocafort, M., Fudal, I., & Mesarich, C. H. (2020) Apoplasmic effector proteins of plant-associated fungi and oomycetes. *Current opinion in plant biology*, 56:9-19.

Rooney, H. C., Van't Klooster, J. W., van der Hoorn, R. A., Joosten, M. H., Jones, J. D., *et al.* (2005) *Cladosporium* Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science*, 308: 1783-1786.

Rouxel T, and Balesdent M.H. (2005) The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era. *Mol. Plant Pathol.* 6:225–241.

Rouxel, T., Penaud, A., Pinochet, X., Brun, H., Gout, L., Delourme, R. *et al.* (2003) A 10-year survey of populations of *Leptosphaeria maculans* in France indicates a rapid adaptation towards the Rlm1 resistance gene of oilseed rape. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 871-881.

Sánchez-Vallet, A., Fouché, S., Fudal, I., Hartmann, F. E., Soyer, J. L., Tellier, A., *et al.* (2018) The genome biology of effector gene evolution in filamentous plant pathogens. *Annual review of phytopathology*, 56:21-40.

Shiller, J., Van de Wouw, A. P., Taranto, A. P., Bowen, J. K., Dubois, D., Robinson, A. *et al.* (2015) A large family of AvrLm6-like genes in the apple and pear scab pathogens, *Venturia inaequalis* and *Venturia pirina*. *Frontiers in plant science*, 6 :980.

Van de Wouw, A. P., Lowe, R. G., Elliott, C. E., Dubois, D. J., *et al.* (2014) An avirulence gene, *AvrLmJ1*, from the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, confers avirulence to *Brassica juncea* cultivars. *Molecular Plant Pathology*, 15: 523-530.

Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G. *et al.* (2022) AlphaFold Protein Structure Database: Massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic acids research*, 50:439-444.

Wang, C. I. A., Gunc̆ar, G., Forwood, J. K., Teh, T., Catanzariti, A. M., Lawrence, G. J., *et al.* (2007) Crystal structures of flax rust avirulence proteins AvrL567-A and-D reveal details of the structural basis for flax disease resistance specificity. *The Plant Cell*, 19: 2898-2912.

Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009) Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25:1189-1191.

Supporting information legends

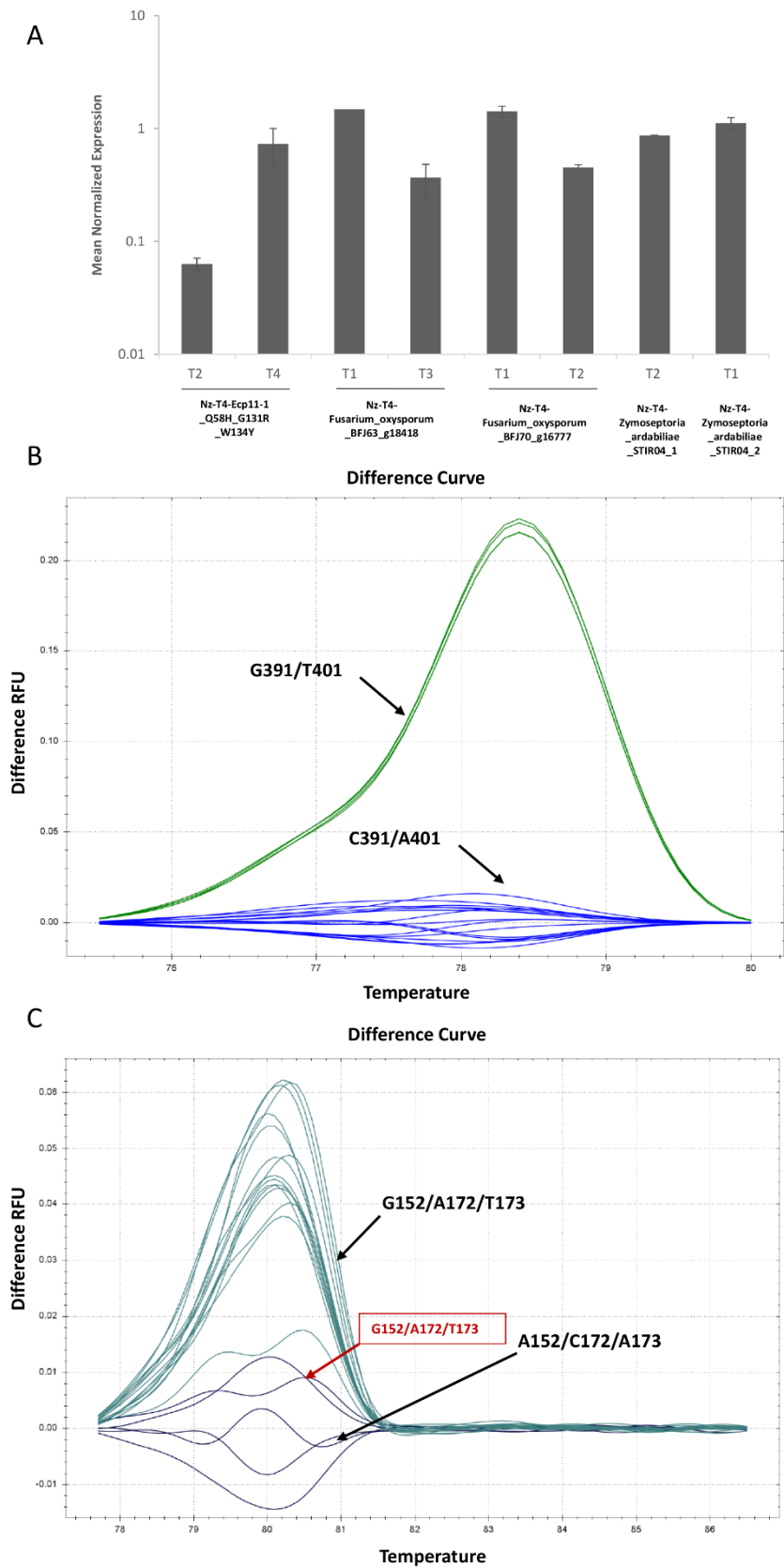


Figure S1: Relative expression of *AvrLm3* and its homologues in *L. maculans* transformants.

- A.** Relative expression of *AvrLm3* homologues in Nz-T4 transformants. RNA extractions were performed on infected cotyledons of cv. Yudal, 7dpi by *L. maculans* Nz-T4 isolate transformed with Ecp11-1_Q58H_G131R_W134Y, *Fusarium_oxysporum_BFJ63_g18418*, *Fusarium_oxysporum_BFJ70_g16777*, *Zymoseptoria_ardabiliae_STIR04_1* and *Zymoseptoria_ardabiliae_STIR04_2*. One or two transformants were analyzed per transformation. Gene expression levels are relative to *Actin*, and calculated as proposed by Muller *et al.* (2002). Each data point is the average of two biological replicates and two technical replicates. Standard error of the mean normalized expression level is indicated by error bars.
- B.** and **C.** Clustering of melting curves of *AvrLm3* amplified in wild type isolates JN2 and Nz-T4 and in the Nz-T4 transformants complemented with different alleles of *AvrLm3* and virulent on *Rlm3* cultivar: a *AvrLm3* allele mutated for two amino acids (*AvrLm3_G131R_F134*) or three amino acids (*AvrLm3_I58H_G131R_F134Y*). RNA extraction was performed on cotyledons of cv. Yudal infected by, JN2), Nz-T4 and X transformants 7dpi. Primers used for HRM are summarized in Table S1: Primers used for B. allowed to distinguish two polymorphic nucleotides: G³⁹¹C and T⁴⁰¹A. Isolates displaying the *AvrLm3* G³⁹¹/T⁴⁰¹ (JN2 isolate) are clustered in yellow and isolates displaying the *AvrLm3* C³⁹¹/A⁴⁰¹, including Nz-T4, Nz-T4-*AvrLm3_G131R_F134Y* and Nz-T4-*AvrLm3_I58H_G131R_F134Y* are clustered in blue. Primers used for C. allowed to distinguish three polymorphic nucleotides (A¹⁵²G/C¹⁷²A/A¹⁷³T). Isolates displaying the *AvrLm3* allele A¹⁵²/C¹⁷²/A¹⁷³, including Nz-T4 (wild type for *AvrLm3*) and one transformant *AvrLm3_G131R_F134* (T2) (Indicated by the grey arrow) are clustered in purple and isolates displaying *AvrLm3* G¹⁵²/A¹⁷²/T¹⁷³, including JN2, Nz-T4-*AvrLm3_G131R_F134Y* (T1) and Nz-T4-*AvrLm3_I58H_G131R_F134Y* are clustered in dark green.

Table S1. Primers used in this study

Experiment	Primer name	Sequence
Cloning	gibs vecteur-avrIm3*F	TGACAGTTAACAACGATCCGAATTCATGTTAAAACCTACAAAG
	gibs avrlm3*-termR	TCTTGGAGATCTTACTGATGATCGCAGTGT
	gibs avrlm3*-termF	CGATCATCAGTAAGATCTCCAAGATGCTTGGATCG
	gibs term-vecteurR	CTTCTGTCTGAATCGGTACCCTCGAGCTACTAGGACGACTCCG
	gibs vecteur-FO-BFJ63F	TGACAGTTAACAACGATCCGAATTCATGTTCCCACGAACGAACCT
	gibs FO-BFJ63-termR	CATCTTGGAGATCCTATTGATGCGCACAGTGAACAT
	gibs FO-BFJ63-termF	GTGCGCATCAATAGGATCTCCAAGATGCTTGGATCG
	gibs vecteur-FO-BFJ70F	TGACAGTTAACAACGATCCGAATTCATGGTGTCGTTCACTTACCTC
	gibs FO-BFJ70-termR	CTTGGAGATCTTAATGAGCCGCACAATGCACGTC
	gibs FO-BFJ70-termF	GCGGCTCATTAAGATCTCCAAGATGCTTGGATCG
	gibs Vecteur-Ecp11-1*F	TGACAGTTAACAACGATCCGAATTCATGTTGTCGTCAGCGAAG
	Gibs Ecp11-1*-termR	CCAAGCATCTTGGAGATCCTATTGAGAACCACAGTG
	gibs Ecp11-1*-termF	CACTGTGGTTCTCAATAGGATCTCCAAGATGCTT
	Gibs vecteur-ZA STIR 01F	TGACAGTTAACAACGATCCGGATCCATGGCCTTACTACTTCTCGC
	Gibs ZA STIR 01-termR	CCAAGCATCTTGGAGATCTCAACGTTGGTGTCCACAG
	Gibs ZA STIR 01-termF	GGACACCAACGTTGAGATCTCCAAGATGCTTGGATCG
	Gibs Vecteur-ZA 02*F	TGACAGTTAACAACGATCCGAATTCATGGGACAACAATTCTCAGC
	Gibs ZA 02*-termR	CCAAGCATCTTGGAGATCTCATTGCGATTTACAGTG
Gibs ZA 04*-termF	GTTCACTGTAAATCGCAATGAGATCTCCAAGATGCTTGGATCG	
screening and sequencing	pA4-7-insert_F	GACACAAGTTACAACGACAAGC
	pA4-7-insert_R	CTCCACTAGCTCCAGCCAAG
	AvrLm4-7_F	TATCGCATACCAAACATTAGGC
	AvrLm4-7_R	GATGGATCAACCGCTAACAA
	seqECP11-1_R	GTACGATGTTAAGCTTGGATTC
qPCR	Ecp11-1qUp	GAAGTGGTTCGATGGGCAAC
	Ecp11-1qLow	CCTTGTCCGCCTCAGATTCA
	F.oxy_BFJ63qUp	TGGTGAACGATCCATGCCAA
	F.oxy_BFJ63qLow	CGAACAGAGCAACGACAGGT
	F.oxy_BFJ70qUp	ACTTACCTCATCGTCACCGC
	F.oxy_BFJ70qLow	CCCACGTAACCCTCCATGAC
	Z.ardabi1_qUp	GCCCATGACTGCCGATCTAT
	Z.ardabi1_qLow	ACTGTCTGTTTCATGTCCGCG
	Z.ardabi2_qUp	ACGACGGATTACAGCACCTTT
	Z.ardabi2_qLow	CTCCTTGTGTACTCGCCAGG
HRM	AvrLm3-HRM_qUp1	CACAAGTCTGGCAAGCGATA
	AvrLm3-HRM_qLow1	TCGTGTAGTGCTCCATTAAGT
	AvrLm3-HRM_qUp2	CTCTTGAATGCCACGCTGTT
	AvrLm3-HRM_qLow2	AATCCATCATCCCCTTGGCA

Table S2 Comparison between the structures of AvrLm3 homologues

	Ecp11	AvrLm3	Zar-1	Zar-2
Ecp11				
AvrLm3 SM	0.3A / 125 Ca / 37%			
Zar-1	1.6A / 80 Ca / 24%	1.7A / 84 Ca / 34%		
Zar-2	1.4A / 74 Ca / 32%	1.5A / 80 Ca / 34%	1.4A / 68 Ca / 45%	
Foxnar	1.7A / 66 Ca / 37%	1.7A / 65 Ca / 43%	1.9A / 57 Ca / 34%	1.7A / 43 Ca / 41%
Foxcep	2.2A / 22 Ca / 23%	2.2A / 37 Ca / 20%	2A / 26 Ca / 20%	1.7A / 29 Ca / 24%
AvrLm3 AF	1.2A/22Ca/37%	alpha fold model		
AvrLm3 SM	swiss model			
NM	: no model			
LDDT	: Model confidence prediction			

Discussion et perspectives

J'ai pu identifier et caractériser grâce à mes travaux de thèse deux familles d'effecteurs de *L. maculans* présentant des homologies avec d'autres effecteurs de *L. maculans*, mais aussi avec des effecteurs d'autres champignons phytopathogènes. Dans un premier temps, grâce à des recherches d'homologies de séquences protéiques dans les protéomes de *L. maculans* ainsi que chez d'autres champignons phytopathogènes, nous avons pu identifier les membres de la famille AvrLm10. D'autre part, la résolution des structures tridimensionnelles de plusieurs effecteurs de *L. maculans* et *F. fulva*, AvrLm4-7, AvrLm5-9 et Ecp11-1, ont mis en évidence l'existence d'une grande famille structurale retrouvée chez des Dothidéomycètes et des Sordariomycètes. La caractérisation fonctionnelle de ces deux familles a permis de déterminer, au-delà de la conservation des séquences et des structures protéiques, des redondances fonctionnelles pouvant concerner la fonction effectrice ou la reconnaissance par une même protéine de résistance.

Ces dernières années, nous avons pu assister à la fulgurante avancée des technologies de séquençage et des outils bio-informatiques facilitant, ainsi, la prédiction des répertoires d'effecteurs de différents agents pathogènes. La technologie RNAseq et les outils de traitement de données ont également permis de couvrir l'ensemble du cycle infectieux de différents agents phytopathogènes, permettant de déterminer avec précision l'expression de répertoires d'effecteurs. *L. maculans* est l'un des champignons qui a pu profiter de ces avancées puisque c'est dans des travaux récents de Gay *et al.* (2021) qu'une approche transcriptomique à grande échelle a été utilisée pour déchiffrer l'ensemble du cycle de vie complexe de *L. maculans* en interaction avec son hôte, à la fois dans des conditions contrôlées d'infection et lors de l'infection au champ, sur des échelles de temps allant de quelques semaines (expériences en conditions contrôlées), à des mois (infection au champ) ou des années (survie et reproduction sexuée sur résidus de cultures). Ces travaux ont permis de déterminer le répertoire d'effecteurs de *L. maculans* exprimé lors de l'infection mais aussi de mettre en évidence plusieurs vagues d'expression au cours de cette infection (huit vagues) réparties tout le long du cycle infectieux sur colza. De la même manière, une approche RNAseq durant l'infection du champignon hémibiotrophe *M. oryzae* sur riz a permis de générer des données transcriptomiques de haute qualité pendant l'ensemble du cycle infectieux (Jeon *et al.*, 2020). Cette étude a permis de confirmer que parmi les 348 gènes codant pour ces protéines secrétées prédites dans les travaux Kim *et al.* 2016, 303 étaient surexprimés dans au moins une condition *in planta*. Enfin, tout récemment, la première étude

transcriptomique à grande échelle chez le champignon hémi-biotrophe *Venturia inaequalis*, agent de la tavelure du pommier, a mis en évidence l'expression des effecteurs en vagues correspondant à trois stades d'infection *in planta* : infection précoce, intermédiaire et tardive avec une surreprésentation des effecteurs en phase tardive de l'infection (Rocafort *et al.*, 2022).

Les approches à haut débit, combinées à une bonne qualité de séquençage, permettent d'identifier de plus en plus d'effecteurs et par conséquent d'identifier des effecteurs conservés chez différentes espèces phytopathogènes. La résolution des structures 3D d'effecteurs, grâce à l'amélioration des techniques expérimentales de production d'effecteurs en système hétérologue (voir e.g. le système d'expression FunCysDisCo développé récemment par Yu *et al.*, 2022) et de détermination de leur structure, mais également le développement des outils de prédiction de structure (e.g. AlphaFold, Jumper *et al.*, 2021) ont amélioré la compréhension des fonctions des effecteurs, mais ont surtout permis de mettre en évidence des analogies structurales entre des effecteurs ne présentant pas d'homologies de séquence protéique et appartenant à des espèces fongiques phylogénétiquement éloignées. Confirmant ainsi le postulat qui dit que même si les effecteurs présentent une grande diversité de séquences, ils appartiennent à un nombre limité de familles structurales et pourraient cibler des processus cellulaires et des protéines végétales communes.

Mes travaux de thèse ont permis de montrer, d'une part, l'intérêt de combiner de multiples approches expérimentales pour l'identification et la caractérisation de famille d'effecteurs et, d'autre part, l'intérêt de travailler sur plusieurs champignons phytopathogènes et pathosystèmes pour identifier des modes d'action communs ou des gènes de résistance à large spectre. Ainsi, lors de mes travaux de thèse, en plus de *L. maculans*, nous nous sommes intéressés à deux autres agents pathogènes, *F.oxysporum f.sp. lycopersici*, l'agent de la Fusariose vasculaire de la tomate et *F. fulva*, l'agent de la cladosporiose de la tomate.

Les différents résultats obtenus lors de ces travaux ouvrent sur un bon nombre de points de discussions notamment sur (1) La conservation des effecteurs de *L. maculans* et la notion de "core effecteur", (2) L'apport de la résolution et la prédiction de structure à l'étude des effecteurs, (3) La coopération entre effecteurs que semble être un phénomène régulièrement

observé et enfin sur (4) Comment tirer profit de la conservation des effecteurs pour une meilleure gestion des résistances.

1) Conservation des effecteurs de *L. maculans* : notion de “core effecteur”

Initialement, les gènes « core » avaient été définis comme l'ensemble des gènes orthologues partagés par tous les membres d'un groupe cohérent sur le plan évolutif (phylogénétiquement liés ; Charlebois *et al.*, 2004). Par la suite, le terme « core effecteurs » a émergé de l'étude et de la comparaison des répertoires d'effecteurs bactériens. Ainsi, le séquençage à haut débit du génome de la bactérie *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, agent de la bactériose vasculaire du manioc, a mis en évidence un ensemble d'effecteurs conservés qui ont été préservés sur trois continents, 11 pays et sept décennies d'évolution (Bart *et al.*, 2012). Cela a donné lieu à une définition des core effecteurs comme étant des protéines effectrices largement distribuées dans une population d'un agent pathogène particulier (Dangl *et al.*, 2013). Les effecteurs étant cruciaux pour la virulence des agents pathogènes (Cooke *et al.*, 2012), un core effecteur « authentique » doit être hautement conservé parmi diverses souches, fortement exprimé pendant l'infection et indispensable à la virulence. Plusieurs core effecteurs ont été par la suite identifiés chez des agents pathogènes bactériens, oomycètes ou fongiques. Chez les oomycètes, la classe des effecteurs cytoplasmiques RxLR renferme plusieurs gènes AVR considérés comme core effecteurs. Chez *P. infestans*, différents gènes AVR tels qu'*Avr2*, *Avr3a*, *Avrblb1*, *Avrblb2* et *Avrvnt1*, ont été considérés comme core effecteurs puisqu'ils ont été retrouvés chez plusieurs souches (06_3924A, NL07434 et T30-4) Cooke *et al.*, 2012 ; Vleeshouwers *et al.*, 2014). L'étude du gène *Avr3a*, en particulier, a révélé qu'en plus de sa conservation chez des souches de *P. infestans*, il était largement conservé chez les espèces du genre *Phytophthora*. De plus, ces effecteurs, appelés Avr3a-like, interagissent avec une cible commune, CAD7 (Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase), un régulateur négatif de l'immunité des plantes chez des espèces végétales différentes (*A. thaliana* (AtCAD7) et *N. benthamiana* (NbCAD7)). CAD7 est ciblée par des effecteurs Avr3a-like de *P. capsici*, *P. infestans* et *P. sojae* pour promouvoir l'infection dans différentes plantes hôtes. Cet exemple pointe un principe fondamental qui ne doit pas être négligé dans la définition d'un core effecteur : étant donné que les core effecteurs sont maintenus dans les répertoires d'effecteurs au cours d'une

longue évolution (Depotter *et al.*, 2020), ils sont susceptibles de cibler des éléments conservés du système immunitaire ou du métabolisme des plantes facilitant ainsi la colonisation de l'hôte. C'est notamment ce qui a été rapporté dans de récents travaux qui montrent qu'un core effecteur Crinkler (CRN), CRN78, de *P. sojae*, intervient dans la phosphorylation et la dégradation des aquaporines végétales pour supprimer la signalisation immunitaire de l'hôte (Ai *et al.*, 2021). Ces protéines constituent des cibles de choix pour l'agent pathogène, car, étant impliquées dans des processus 'vitaux', elles ne peuvent être modifiées ou éliminées sans nuire complètement à la plante hôte. Du côté des champignons phytopathogènes, plusieurs gènes codant des effecteurs ont aussi été rapportés comme étant des core effecteurs. Chez *U. maydis*, l'effecteur Pep1 est essentiel pour la pénétration de l'épiderme de la plante hôte et l'établissement de la biotrophie (Doehlemann *et al.*, 2009). Dans l'interaction biotrophe d'*U. maydis* avec le maïs, Pep1 agit comme un inhibiteur des peroxydases de la plante et supprime directement le burst oxydatif apoplastique (Hemetsberger *et al.*, 2012). Pep1 est conservé chez différentes espèces responsables du charbon (*Sporisorium reilianum*, *Sporisorium scitamineum*, *U. hordei*, *U. avenae*, *U. nuda*, *M. pennsylvanicum*) avec une conservation d'une région centrale de la protéine dite « région core » (Hemetsberger *et al.*, 2015). De plus, il a été démontré que Pep1 d'*U. hordei* est capable de compléter celui d'*U. maydis*, suggérant ainsi une conservation fonctionnelle de ce core effecteur parmi les champignons apparentés (Hemetsberger *et al.*, 2015). NIS1, d'abord identifié chez le champignon responsable de l'anthracnose du concombre, *Colletotrichum orbiculare* (Shen *et al.*, 2001), est un autre effecteur fongique considéré comme core effecteur dû à sa forte conservation chez les champignons filamenteux, notamment chez *C. higginsianum* et *M. oryzae* (Yoshino *et al.*, 2012). La caractérisation fonctionnelle de cet effecteur a révélé que NIS1, tout comme ses homologues chez *C. higginsianum* et *M. oryzae*, cible le récepteur-like kinase BAK1 ainsi que le récepteur-like cytoplasmic kinase BIK1, qui sont tous deux directement impliqués dans la PTI (Irieda *et al.*, 2018).

Il est intéressant de noter que, depuis la première définition du terme core effecteur chez les bactéries phytopathogènes, qui mettait en avant la large distribution des effecteurs parmi les souches d'un pathogène particulier, cette notion s'est élargie à une conservation entre agents phytopathogènes (phylogénétiquement lié ou non). Chez les champignons, la notion de core effecteur met en avant la conservation des effecteurs chez plusieurs espèces fongiques, l'interaction avec une protéine hôte conservée ou l'action sur des processus cellulaires

communs. Il est tout à fait compréhensible que, chez les champignons, la notion de core effecteur ne se limite pas qu'à une question de distribution au sein des populations d'un agent pathogène. Il est nécessaire de remettre dans leur contexte les caractéristiques génomiques et évolutives des effecteurs fongiques. En effet, il a déjà été évoqué dans mon manuscrit que les génomes fongiques étaient souvent compartimentés (cf chapitre 1), pouvant donner lieu à une évolution à deux vitesses, les compartiments riches en gènes étant peu dynamiques alors que les compartiments riches en éléments répétés, pauvres en gènes, évoluent plus rapidement, notamment chez les ascomycètes par le mécanisme de RIP. Même si cette compartimentation peut comprendre différentes formes, toujours est-il qu'un grand pourcentage de gènes codant des effecteurs fongiques se trouvent dans des régions très dynamiques, évoluant rapidement. De ce fait, la présence de protéines effectrices homologues chez différentes espèces peuvent largement être définies comme core effecteurs. Il existe, néanmoins, des effecteurs se trouvant dans des régions stables des génomes fongiques qui évoluent très peu dans les populations d'un agent pathogène donné et sont décrits comme core effecteurs, comme Pep1 d'*U. maydis*. Ainsi, les niveaux d'homologie entre les effecteurs conservés chez différentes espèces est très variables. Pour Pep1, les niveaux d'homologie de séquences protéique entre homologues sont assez élevés, dû notamment à leur localisation dans des régions stables des génomes. Pep1 de *U. maydis* partage une identité de séquence allant jusqu'à 62.36% avec celle de *S. reilianum* (Schirawski *et al.*, 2010 ; Laurie *et al.*, 2012). En revanche, pour des gènes codant des effecteurs core localisés dans des régions dynamiques des génomes, un niveau d'homologie de séquence protéique plus faible est retrouvé, mais ils sont cependant considérés comme homologues (e.g. AvrLm10A de *L. maculans* présente 37 % d'identité avec Six5 de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ; Petit-Houdenot *et al.*, 2019). Cette homologie peut parfois être confirmée par complémentation fonctionnelle ou par des analogies structurales (e.g. dans le cas d'AvrLm3 et Ecp11-1 ; Talbi *et al.*, in prep.).

Une grande proportion des effecteurs de *L. maculans* exprimés pendant les phases biotrophes de l'infection est localisée dans des régions évoluant rapidement sous l'effet du RIP (Rouxel *et al.*, 2011). Nous pouvons, donc tout à fait, proposer une définition d'un core effecteur chez *L. maculans* comme tout effecteur ayant conservé des homologies de séquence avec des effecteurs d'autres champignons après l'action du RIP. Par ailleurs, des effecteurs spécifiquement exprimés pendant la colonisation de la tige ont été récemment identifiés (Gervais *et al.*, 2017). Les gènes codant ces effecteurs se trouvent dans des régions riches en

gènes et sont très bien conservés dans les populations de *L. maculans*. La plupart se trouvent suffisamment loin des éléments répétés pour ne pas subir de mutations liées au mécanisme de RIP. Cette localisation devrait donc probablement limiter leur potentiel évolutif, comparé à celui des gènes codant des effecteurs situés dans les régions dynamiques du génome. En effet, 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)

La famille AvrLm10A/AvrLm10B pourrait tout à fait être considérée comme core effecteur quelle que soit la définition choisie pour « core effector », que la conservation soit considérée au niveau de l'espèce ou au-delà. En effet, si l'on considère cette famille, l'analyse du polymorphisme dans les populations naturelles de *L. maculans* montre une forte conservation de la majorité des couples qu'ils soient localisés en régions riches en gènes ou en régions riches en éléments répétés. De plus, il n'existe aucun isolat dépourvu de tous les membres de la famille, avec toujours au moins un membre de la famille présent dans l'ensemble de la population. Si l'on regarde la famille AvrLm10 au-delà de *L. maculans*, un nombre important d'homologues sont retrouvés chez d'autres espèces fongiques phylogénétiquement éloignées. Cette conservation n'est pas juste une conservation de séquence protéique, mais également une conservation fonctionnelle, puisque nous avons pu montrer qu'une majeure partie des gènes codant des homologues d'AvrLm10A sont associés avec par un gène voisin en orientation inverse codant pour un effecteur putatif. D'autre part, nous avons mis en évidence une capacité d'AvrLm10A et de ses homologues chez *L. maculans* à transporter leur protéine partenaire et également un effecteur de *F. oxysporum*. Tous ces critères suggèrent fortement qu'AvrLm10A est un core effecteur ayant une fonction de transport. Avec l'hypothèse d'une conservation de la fonction de transport d'AvrLm10A et de ses homologues chez d'autres espèces, il serait intéressant d'étendre l'analyse fonctionnelle aux différents homologues retrouvés chez les autres agents pathogènes du colza dans un premier temps et chez d'autres espèces, telles que les espèces du genre *Colletotrichum* qui montrent également une forte conservation de la famille AvrLm10.

2) L'apport de la résolution et la prédiction de structure à l'étude des effecteurs

L'élucidation des structures 3D des effecteurs peut constituer une stratégie efficace pour déterminer leur fonction et fait partie intégrante des stratégies de caractérisation fonctionnelle des effecteurs. En effet, la détermination de la structure des effecteurs et des protéines avec lesquelles ils interagissent a permis des avancées majeures dans notre compréhension des interactions plantes-pathogènes, notamment : l'identification des fonctions des effecteurs qui n'étaient pas apparentes à partir de la seule analyse de la séquence, la visualisation d'interfaces moléculaires pertinentes pour la virulence des agents pathogènes et l'immunité des plantes, et l'identification d'homologies structurales entre effecteurs qui n'étaient pas visibles par comparaison de séquences.

La détermination de la fonction des effecteurs basée sur la structure a été rapportée chez différents agents pathogènes. Ainsi, chez *F. fulva*, la détermination de la structure cristalline de l'effecteur Ecp6 a permis de comprendre comment ce dernier se liait à la chitine afin d'empêcher sa reconnaissance par les récepteurs immunitaires de la tomate. En effet, les plantes détectent les oligosaccharides dérivés de la chitine par le biais de récepteurs membranaires qui contiennent des domaines extracellulaires à motif lysine (LysM). Les domaines LysM des plantes comprennent environ 50 acides aminés et adoptent un repliement structural $\beta\alpha\alpha\beta$ (Liu *et al.*, 2012, Koharudin *et al.*, 2015). Pour se protéger de la détection par le système immunitaire des plantes, les champignons utilisent des effecteurs LysM pour séquestrer les oligomères de chitine dans l'apoplaste, rentrant ainsi en compétition avec les récepteurs LysM de l'hôte. Ecp6 contenait 3 domaines LysM modulaires (Sánchez-Vallet *et al.*, 2013), deux des domaines (LysM1 et LysM3) se dimérisant pour "prendre en sandwich" un oligomère de chitine via de multiples liaisons hydrogène et interactions hydrophobes, permettant de fortes affinités d'interaction (Sánchez-Vallet *et al.*, 2015). Chez *F. oxysporum*, c'est aussi grâce à la résolution de la structure 3D de l'effecteur AVR2 et à la mutagenèse dirigée basée sur la structure qu'il a été possible de distinguer les résidus impliqués dans la reconnaissance par I2, le gène de résistance de la tomate reconnaissant AVR2, de ceux qui étaient impliqués dans la fonction de virulence (Di *et al.*, 2017). Enfin, chez *L. maculans*, même si la résolution de la structure 3D d'AvrLm4-7 n'a pas permis d'élucider sa fonction,

elle a permis en revanche de mettre en évidence un domaine conservé, localisé à la surface de la protéine, comprenant le motif (R/N)(Y/F)(R/S)E(F/W) ainsi qu'un motif RAWG situé dans une boucle structurale proche, formant une région chargée positivement, impliquée dans le transport d'AvrLm4-7 dans le cytoplasme des cellules végétales (Blondeau *et al.*, 2015).

En plus de la détermination des fonctions de certains effecteurs, la résolution des structures 3D a permis de mettre en évidence des conservations de structure entre des effecteurs qui ne partagent pas ou très peu d'homologie de séquence et chez des espèces phylogénétiquement éloignées. Il est bien établi que la structure des protéines est plus conservée que la séquence des acides aminés, et, dans de nombreux cas, cela est dû à la relation évolutive entre la structure et la fonction (Illergård *et al.*, 2009). Le fait que la conservation structurale puisse être une méthode puissante pour l'annotation fonctionnelle des protéines est un concept fondamental qui a conduit au développement de la détermination de la structure comme outil pour comprendre la biologie des effecteurs des agents pathogènes de mammifères et de végétaux (Wirthmueller *et al.*, 2013). La première famille structurale identifiée chez des champignons phytopathogènes est la famille MAX (Magnaporthe Avr and ToxB like ; de Guillen *et al.*, 2015). En effet, la détermination par spectroscopie RMN des structures 3D des effecteurs AVR1-CO39 et AVR-Pia de *M. oryzae* ont révélé, malgré un manque de similarité de séquence, que les deux protéines avaient des structures très similaires et que ces structures étaient également similaires à celle d'AvrPiz-t, un autre effecteur de *M. oryzae*, et ToxB, un effecteur de *P. tritici-repentis*. Lors de cette étude, les recherches basées sur la structure ont permis d'identifier des effecteurs MAX candidats dans une large gamme de champignons ascomycètes avec tout de même une forte expansion chez *M. oryzae* et *M. grisea* représentant 5-10% du répertoire des effecteurs et 50% des effecteurs d'avirulence clonés. Les effecteurs AVR-Pik, AVR-Pia et AVR1-CO39 de *M. oryzae* se lient tous à des domaines associés aux métaux lourds (HMA) intégrés dans les récepteurs immunitaires intracellulaires (NLR). Les effecteurs RALPH (pour RNase-Like Proteins Associated with Haustoria), qui présentent des analogies structurales avec des ribonucléases, constituent également une grande famille structurale chez le champignon *Blumeria graminis* (Pedersen *et al.*, 2012). Cette famille représente environ 25 % des effecteurs prédits chez ce champignon.

Expérimentalement, les structures des protéines sont principalement étudiées par des méthodes telles que la cristallographie aux rayons X, la résonance magnétique nucléaire (RMN), la bio-SAXS et la microscopie électronique cryogénique (Cryo-EM). Bien qu'elles soient puissantes et présentent des atouts différents, ces méthodes ont chacune leurs limites et impliquent des investissements considérables en termes de ressources financières et de temps. Même dans ce cas, rien ne garantit qu'une structure puisse être résolue, en particulier pour certains types de protéines, notamment celles présentant un désordre intrinsèque ou celles résidant ou interagissant avec des membranes. De ce fait très peu de structures d'effecteurs sont disponibles dans les bases de données (Tableau 3)

Tableau 3. Liste des structures d'effecteurs fongiques résolues et disponibles dans la base de données PDB. (Amoozadeh et al., 2021)

Effector Protein	Organism	Date of Release	Method	PDB Entry	Family
Fungi					
Ecp11-1	<i>Passalora fulva</i>	4 August 2021	X-ray	6ZUS	LARS
APiKL2A	<i>Magnaporthe oryzae</i>	24 March 2021	X-ray	7NLJ	MAX
APiKL2F	<i>Magnaporthe oryzae</i>	24 March 2021	X-ray	7NMM	MAX
AVR-PikD	<i>Pyricularia oryzae</i>	17 February 2021	X-ray	7BNT	MAX
AVR-PikF	<i>Pyricularia oryzae</i>	3 February 2021	X-ray	7BII	MAX
AVR-PikC	<i>Pyricularia oryzae</i>	3 February 2021	X-ray	7A8X	MAX
SnTox3	<i>Parastagonospora nodorum</i>	4 November 2020	X-ray	6WES	MAX
Zt-KP6-1	<i>Zymoseptoria tritici</i>	4 March 2020	X-ray	6QPK	LysM
MLP124017	<i>Melampsora larici-populina</i>	18 December 2019	Solution NMR	6SGO	Cys knot, NTF2-like fold
Mg1LysM	<i>Zymoseptoria tritici</i>	16 October 2019	X-ray	6Q40	LysM
AVR-Pia	<i>Pyricularia oryzae</i>	10 July 2019	X-ray	6Q76	MAX
AvrPib	<i>Pyricularia oryzae</i>	5 September 2018	X-ray	5Z1V	MAX
MlpP4.1	<i>Melampsora larici-populina</i>	22 August 2018	Solution NMR	6H0I	Cys knot, NTF2-like fold
Avr4	<i>Passalora fulva</i>	22 August 2018	X-ray	6BN0	Chitin-binding
PIIN_05872	<i>Piriformospora indica</i>	2 May 2018	X-ray	5LOS	DELD
BEC1054	<i>Blumeria hordei</i>	20 June 2018	X-ray	6FMB	RALPH
AVR-PikE	<i>Pyricularia oryzae</i>	13 June 2018	X-ray	6G11	MAX
AVR-PikA	<i>Pyricularia oryzae</i>	3 June 2018	X-ray	6FUD	MAX
AvrP	<i>Melampsora lini</i>	30 August 2017	X-ray	5VJJ	Zn-binding
Avr2	<i>Fusarium oxysporum</i>	16 August 2017	X-ray	5OD4	ToxA/TRAF
PevD1	<i>Verticillium dahliae</i>	5 July 2017	X-ray	5XMZ	C2-like
Avr4	<i>Pseudocercospora fuligena</i>	29 June 2017	X-ray	4Z4A	Chitin-binding
AVR1-CO39	<i>Magnaporthe oryzae</i>	14 October 2015	Solution NMR	2MYV	MAX
Prp5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11 December 2013	X-ray	4LK2	DEAD-box
AvrLm4-7	<i>Leptosphaeria maculans</i>	11 December 2013	X-ray	2OPC	LARS
AvrM	<i>Melampsora lini</i>	16 October 2013	X-ray	4BJM	RXLR-like
AvrM-A	<i>Melampsora lini</i>	16 October 2013	X-ray	4BJN	RXLR-like
Ecp6	<i>Passalora fulva</i>	17 July 2013	X-ray	4B8V	LARS
AvrPiz-t	<i>Pyricularia oryzae</i>	12 September 2012	Solution NMR	2LW6	MAX
AvrL567-D	<i>Melampsora lini</i>	30 October 2007	X-ray	2QVT	RXLR-like
AvrL567-A	<i>Melampsora lini</i>	6 March 2007	X-ray	2OPC	RXLR-like

Au cours de la dernière décennie, divers systèmes *et* algorithmes ont été mis au point pour résoudre le problème de la prédiction de la structure 3D des protéines. Avec l'essor et le développement fulgurant des outils de prédiction des structures 3D des protéines, tels que TrRosetta, CASP14 *et* alphaFold2 (Du *et al.*, 2021 ; Kryshtafovych *et al.*, 2019 ; Jumper *et al.*, 2021), qui sont capables de prédire les structures des protéines avec des niveaux de confiance très élevés, il devient plus facile de retrouver des analogies entre les effecteurs. En effet, si l'on prend l'exemple d'AlphaFold, la dernière version du logiciel AlphaFold2 est capable d'utiliser les informations extraites d'un alignement de séquences multiples et de construire une représentation des parties de la protéine en contact étroit, basée sur une nouvelle approche d'apprentissage automatique qui incorpore des connaissances physiques et biologiques sur la structure des protéines pour faire des prédictions précises (Jumper *et al.*, 2021). Il est donc maintenant possible de prédire, avec confiance, les structures de répertoires

complets d'effecteurs fongiques, en l'absence de modèles homologues, ce qui est assez 'révolutionnaire' puisque très peu de structures d'effecteurs étaient jusqu'à présent disponibles dans les bases de données. Ainsi, récemment, Seong *et al.* (2021) ont prédit la structure de l'ensemble du sécrétome de *M. oryzae* (1 854 protéines sécrétées) : la structure de 1 295 protéines a été prédite via TrRosetta. Cette approche a permis de révéler de nouveaux membres de la famille MAX et de nouvelles familles d'effecteurs présentes chez *M. oryzae* et d'autres champignons phytopathogènes, notamment la famille d'effecteurs LARS de *L. maculans*. La prédiction de structure de plusieurs effecteurs du champignon pathogène *Blumeria graminis* (Bgh), responsable de l'oïdium de l'orge, a permis de montrer qu'ils appartenaient à la famille structurale RALPH (Bauer *et al.*, 2021). D'autres travaux récents ont combiné des approches bio-informatiques et expérimentales afin de déterminer la structure des effecteurs SIX de *F. oxysporum* f. sp. lycopersici (Fol) (Yu *et al.*, 2021), mettant en évidence une nouvelle famille structurale parmi les effecteurs SIX. Avr1 (SIX4) et Avr3 (SIX1) représentent les membres fondateurs de la classe des effecteurs Fol à double domaine (FOLD). Dans ces mêmes travaux, grâce à des prédictions de structures *ab initio* par AlphaFold, il a été montré que SIX6 et SIX13 font également partie de la famille FOLD. De plus, des prédictions et comparaisons structurales suggèrent que 11 des 14 effecteurs SIX se regroupent en quatre classes structurales. De la même manière, une prédiction très récente de la structure des effecteurs de *V. inaequalis* exprimés pendant l'infection, grâce à AlphaFold2, a permis de constater que nombre de ces effecteurs putatifs présentent des analogies structurales avec des protéines AVR d'autres champignons phytopathogènes, notamment des membres des familles structurales MAX, LARS, ToxA et FOLD. En outre, plusieurs autres effecteurs putatifs, dont une famille d'effecteurs présentant une analogie structurale avec l'effecteur AvrLm6 de *L. maculans*, ont été prédits comme adoptant un repliement de type KP6/ferredoxine. Ainsi, les protéines ayant un repliement semblable à celui de KP6/ferredoxin pourraient représenter une autre famille structurale d'effecteurs partagée par les champignons phytopathogènes (Rocafort *et al.*, 2022).

En plus de cette fulgurante avancée dans la découverte ou l'élargissement de familles structurales, la prédiction de structure semble être un outil puissant pour résoudre des problèmes de production en système hétérologue, tels que la présence de pro-domaines qui se traduit par des structures secondaires désordonnées (Outram *et al.*, 2021). C'est par exemple le cas de l'effecteur SnTox3 de l'agent pathogène du blé *P. nodorum* qui comprend dans sa

séquence protéique un pro-domaine. La forme sécrétée de SnTox3 est dépourvue du pro-domaine et active fortement la mort cellulaire dépendant de Snn3 (Outram *et al.*, 2021). Il a été montré que l'élimination spécifique du pro-domaine de SnTox3 pouvait être réalisée *in vitro* en utilisant la protéine Kex2 recombinante. Dans ces mêmes travaux, il a été montré que d'autres effecteurs (y compris ToxA de *P. nodorum*, les effecteurs SIX1, SIX4 et SIX6 de *F. oxysporum f. sp. lycopersici* et AvrLm1 de *L. maculans*) possédaient des pro-domaines qui pouvaient également être éliminés par Kex2 *in vitro*.

Chez *L. maculans*, c'est grâce à la résolution des structures 3D d'AvrLm4-7, d'AvrLm5-9 et d'Ecp11-1 que la famille LARS a pu être mise en évidence (Lazar *et al.*, 2020). Cette famille pourrait comprendre encore plus de membres qu'initialement identifié, puisque plusieurs ont été récemment prédits chez *V. inaequalis* (Rocafort *et al.* 2022), ainsi que lors de notre recherche d'homologues d'AvrLm3 et Ecp11-1 dont la prédiction de structure montre que les quatre effecteurs homologues identifiés chez *F. oxysporum* et *Z. ardabiliae* partagent des analogies structurales avec la famille LARS (Talbi *et al.*, in prep.). Enfin, récemment, le reséquençage et l'assemblage complet du génome de *F. fulva* a permis d'identifier une deuxième copie d'Ecp11-1 dans le génome (Zaccaron *et al.*, 2022). Cela prouve qu'il est encore possible d'élargir cette famille pour identifier d'autres effecteurs, mais aussi la nécessité de combiner différentes approches pour étudier la conservation des effecteurs.

Lors de la prédiction de la structure d'AvrLm10B et de ses homologues chez *L. maculans*, l'utilisation des séquences protéiques entières a permis de mettre en évidence une conservation d'un repliement en sandwich β pour l'ensemble des homologues présents chez *L. maculans* mais également pour AVR2, sans que les structures soient superposables. En revanche, en se basant sur les travaux de Yu *et al.* (2021) qui ont montré la présence d'un pro-domaine pour l'effecteur SIX8 de *F. oxysporum* qui fait partie de la classe structurale ToxA-like comprenant également AVR2, nous avons décidé d'éliminer une cinquantaine d'acides aminés en partie N-terminale pour l'ensemble des protéines. Ceci a significativement amélioré la prédiction des structures et également leur superposition avec celle d'AVR2. Ceci suggère fortement qu'AvrLm10B et ses homologues chez *L. maculans* pourraient posséder un pro-domaine. Il serait donc intéressant de déterminer si ce pro-domaine comprend un motif particulier, potentiellement conservé, et s'il est capable d'être clivé *in vitro*. Aurait-il un rôle

dans la maturation des effecteurs, dans leur transport dans la cellule ou plutôt au moment de l'interaction avec leurs partenaires? Il serait également intéressant de produire ces effecteurs sans les pro-domaines afin de les caractériser puisqu'il a été montré par Outram *et al.* (2021) que, sans les pro-domaines, les effecteurs avaient un effet plus important sur leur cible.

3) La coopération entre effecteurs : un phénomène régulièrement observé

En caractérisant la famille AvrLm10, nous avons pu montrer que Lmb_jn3_09745 interagissait fortement avec sa protéine partenaire Lmb_jn3_09746 et la transportait de cellule à cellule, tout comme AvrLm10A (Petit-Houdenot *et al.*, 2019 ; Talbi *et al.*, in prep) et SIX5 (Cao *et al.*, 2018). AvrLm10A et ses homologues, y compris Lmb_jn3_08094 qui n'était pas capable de transporter sa protéine partenaire, étaient capables de transporter l'effecteur AVR2 de *F. oxysporum*. Ce résultat suggère l'existence d'une grande famille d'effecteurs "transporteurs" capables de coopérer physiquement avec d'autres effecteurs pour promouvoir la virulence (Talbi *et al.*, in prep). De manière différente, AvrLm4-7 coopère avec AvrLm3 et ses analogues structuraux en masquant leur reconnaissance par Rlm3, promouvant ainsi l'infection. Ces résultats montrent bien que les effecteurs agissent comme un cocktail avec des effets cumulés pour promouvoir la virulence.

Qu'elles soient directes ou indirectes, synergiques ou épistatiques, des interactions et coopérations entre effecteurs sont régulièrement mises en évidence. Il est possible de distinguer deux types de coopérations entre effecteurs : des coopérations par interaction directe qui nécessitent une interaction physique entre effecteurs et des coopérations sans interaction pouvant être dues à une interaction avec une cible végétale ou avec une protéine de défense qui pourrait bloquer l'infection. Cette coopération peut également agir à différents niveaux : le transport, la protection et le masquage (Figure 41). Différentes études ont pu mettre en évidence des coopérations entre effecteurs chez des agents pathogènes bactériens, oomycètes et fongiques. Des exemples de protection de la fonction d'un effecteur par coopération indirecte avec un autre effecteur ont été décrits chez plusieurs espèces d'oomycètes. Ainsi, *P. sojae* secrète une endoglucanase apoplastique spécifique du xyloglucane, PsXEG1. PsXEG1 est un effecteur essentiel à la virulence de *P. sojae* dont la reconnaissance par les récepteurs immunitaires membranaires est indépendante de son activité enzymatique. Le soja produit une protéine inhibitrice de la glucanase apoplastique, GmGIP1,

qui se lie à PsXEG1 pour bloquer sa contribution à la virulence. Cependant, *P. sojae* sécrète une protéine analogue à PsXEG1, PsXLP1, qui présente une moindre activité enzymatique mais se lie avec plus d'affinité à GmGIP1 que PsXEG1, permettant ainsi à nouveau à PsXEG1 de promouvoir l'infection par *P. sojae*. La paire de gènes codant PsXEG1 et PsXLP1 est conservée chez de nombreuses espèces de *Phytophthora*, les orthologues PpXEG1 et PpXLP1 de *P. parasitica* ayant des fonctions similaires. Ainsi, cette stratégie de leurre apoplastique est largement utilisée chez les espèces du genre *Phytophthora* pour infecter leur plante hôte. Un autre exemple de coopération entre effecteurs est celui de l'effecteur AvrPtoB, de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 qui interagit avec la MAP Kinase Kinase 2 (MKK2) pour supprimer l'ETI induite par un autre effecteur, HopAD1 (Wei *et al.*, 2015). Plusieurs exemples de masquages ont également été décrits. Ainsi, plusieurs effecteurs de *F. fulva* coopèrent de façon indirecte pour le masquage de la chitine afin de protéger le champignon des mécanismes de défense de la tomate. Bien que la chitine ne soit pas une protéine effectrice, c'est un motif conservé chez les champignons qui peut également être reconnu par les plantes hôtes. Cette reconnaissance de la chitine de *F. fulva* est supprimée par plusieurs effecteurs à motif lysine (LysM) ayant un mode d'action différent. L'effecteur LysM Ecp6 interfère avec la détection de la chitine par l'hôte par la séquestration de fragments de chitine provenant de la paroi cellulaire du champignon (De Jonge *et al.*, 2010), tandis qu'Avr4 protège les hyphes du champignon contre les chitinases de la tomate (van den Burg *et al.*, 2006). D'autres études ont mis en évidence des collaborations impliquant des interactions directes entre effecteurs. Ainsi, une étude récente a révélé que cinq effecteurs du champignon biotrophe *U. maydis* formaient un complexe protéique avec deux protéines membranaires du champignon. Ce complexe protéique nommé « Complexe Stp » est formé par différents effecteurs, préalablement caractérisés (Stp1, Stp3, Pep1, UMAG_12197 (nommé Stp4) et UMAG_01695 (nommé Stp6)), spécifiquement requis pendant la colonisation des plantes. La formation du complexe est essentielle à la fois pour supprimer les réponses de défense de la plante hôte dans le cas d'une interaction compatible et pour déclencher la résistance non-hôte, ce qui suggère que le complexe est nécessaire pour le transport des effecteurs d'*U. maydis* dans les cellules de l'hôte, qui à la fois régulent ces réponses dans les plantes hôtes et déclenche la résistance non-hôte (Ludwig *et al.*, 2021).

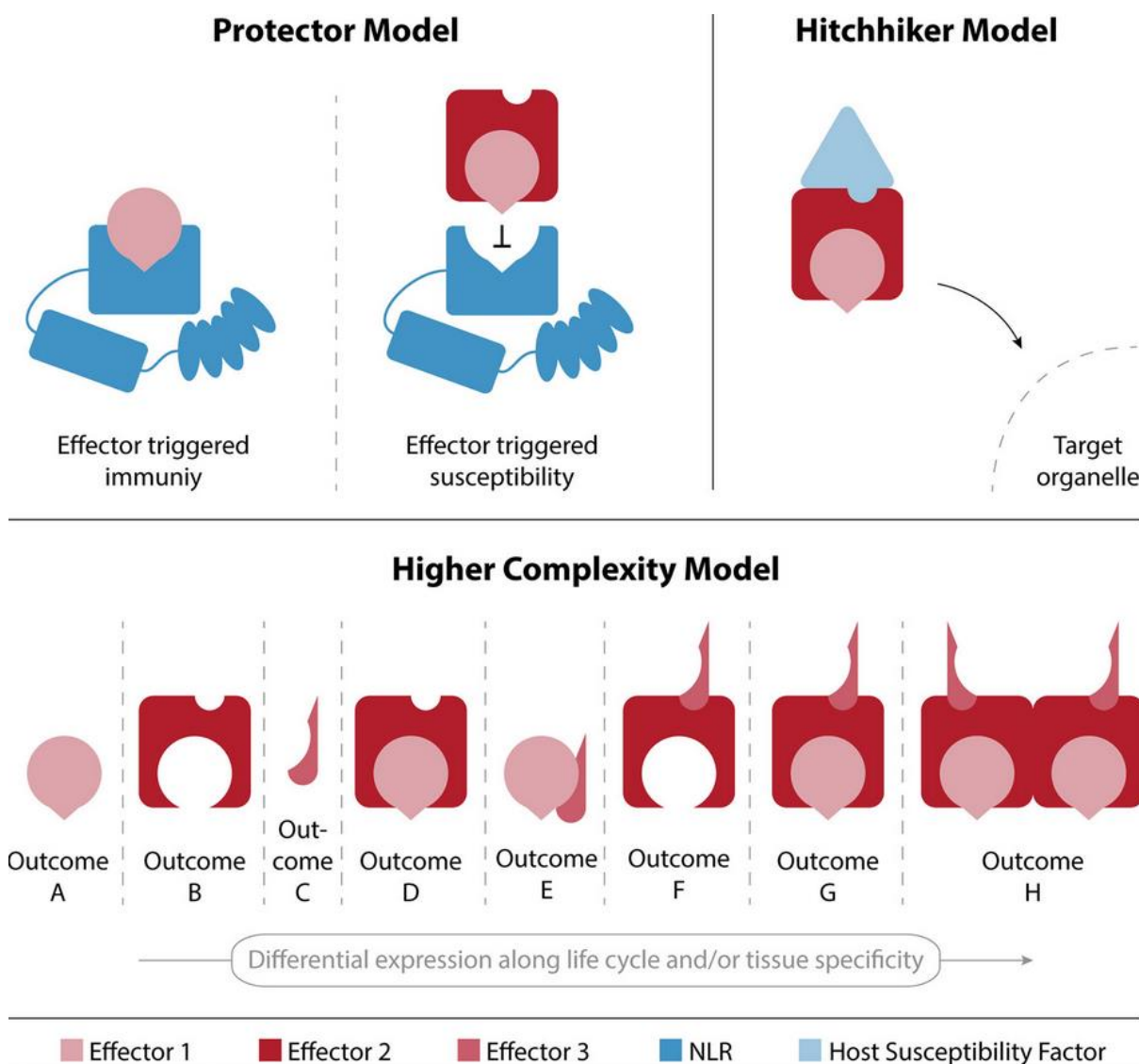


Figure 41. Modèles illustrant les interactions effecteur-effecteur.

Le modèle protecteur (Protector Model) décrit une interaction entre les effecteurs 1 et 2 qui permet d'éviter la reconnaissance de l'effecteur 1 par le système immunitaire de la plante et conduit donc à une infection. Dans le modèle de l'auto-stoppeur (Hitchhiker Model), l'effecteur 1 est capable de se déplacer vers son organe cible en interagissant avec l'effecteur 2, qui interagit à son tour avec un facteur de susceptibilité de la plante aidant au déplacement lors de la liaison de l'effecteur 2. Le modèle de complexité supérieure (higher complexity model) met en évidence la plasticité qui peut résulter de l'expression différentielle des effecteurs tout au long du cycle de vie de l'agent pathogène et/ou dans des tissus spécifiques (d'après Alcântara *et al.*, 2019).

Dans notre cas, la caractérisation fonctionnelle des deux familles a montré que plusieurs effecteurs de *L. maculans* sont capables de coopérer directement ou indirectement. Si la coopération entre la plupart des effecteurs de la famille AvrLm10A est directe, la coopération entre AvrLm4-7, AvrLm3 et AvrLm5-9 semble être indirecte puisque des tests d'interaction par double hybride dans *S. cerevisiae* n'ont pas permis de mettre en évidence une interaction

entre ces trois protéines (Plissonneau *et al.*, 2016 ; Ghanbarnia *et al.*, 2018). Ces effecteurs sont exprimés de façon concertée durant les phases biotrophes de l'infection (Gay *et al.*, 2021). Avoir un groupe d'effecteurs qui s'exprime dans un laps de temps réduit pourrait indiquer une coopération ou une synergie entre ces effecteurs. Ainsi, considérer les effecteurs individuellement et les caractériser fonctionnellement comme tel ne serait pas toujours la meilleure stratégie. En effet, l'analyse fonctionnelle de protéines effectrices individuelles néglige intrinsèquement leurs fonctions synergiques / de coopération en raison de la redondance fonctionnelle entre effecteurs, des profils d'expression dépendant des stades d'infection ou de l'organe végétal infecté, et des interactions épistatiques au sein des effectomes. Par conséquent, les fonctions des effectomes ne sont généralement pas la somme des fonctions des effecteurs individuels (Arroyo-Velez *et al.*, 2020). Ainsi, des approches expérimentales spécifiques seraient nécessaires pour déterminer comment les effectomes fonctionnent dans leur ensemble. Lors de la caractérisation fonctionnelle et l'inactivation des différents homologues d'AvrLm10B, alors que j'ai pu mettre en évidence, grâce à leur expression transitoire dans *N. benthamiana*, un rôle potentiel dans la suppression de la PTI, leur inactivation par CRISPR n'a pas montré d'effet sur la pathogénie de *L. maculans* sur colza. Ceci suggère l'existence d'une redondance fonctionnelle entre membres de la famille AvrLm10 ou avec d'autres effecteurs. Afin d'évaluer cette redondance fonctionnelle, il est important d'arriver à déterminer l'implication de chaque membre d'un effectome dans la pathogénie. Ce type d'analyse est possible pour des bactéries qui présentent un génome plutôt petit et un nombre réduit d'effecteurs. Ainsi, l'ensemble des effecteurs de type III identifié chez *P. syringae* ont été inactivés de façon sériée générant ainsi une souche dépourvue des 36 effecteurs de type III. Une caractérisation fonctionnelle par expression individuelle de chaque effecteur a, ensuite, été réalisée sur cette souche (Wei *et al.*, 2015). Dans le cas des champignons, cela serait nettement plus difficile à mettre en place. Néanmoins, grâce à la caractérisation des vagues d'effecteurs chez *L. maculans*, il est tout à fait envisageable de générer des mutants dépourvus des effecteurs d'une même vague (l'ensemble des effecteurs de la vague 2 par exemple) pour les réintroduire un par un et quantifier leur implication dans la pathogénie. Dans un premier temps, nous pourrions également envisager d'inactiver l'ensemble des membres de la famille AvrLm10. En pratique, il serait possible de partir d'un isolat déjà dépourvu de plusieurs des couples pour inactiver le reste de la famille.

4) Comment tirer profit de la conservation des effecteurs pour une meilleure gestion des résistances ?

Peu de résistances spécifiques sont disponibles chez le colza et une partie d'entre elles sont déjà contournées. Il est donc impératif de se tourner vers des stratégies visant à optimiser la gestion de ces résistances et à limiter leur contournement, en passant de la sélection variétale conventionnelle à de la sélection pour des résistances durables (Chepsergon *et al.*, 2021). Cela est notamment rendu possible grâce à l'effectoromique qui utilise les effecteurs pour étudier et /ou sélectionner les sources de résistance des plantes (Pais *et al.*, 2013).

Les core effecteurs tels que nous les définissons dans ce manuscrit (effecteurs présents dans la plupart des souches d'un agent pathogène et / ou conservés chez différentes espèces phytopathogènes, et présentant un rôle important dans l'agressivité de l'agent pathogène) sont par définition importants pour le cycle infectieux de l'agent pathogène, ciblant probablement des éléments conservés du système immunitaire ou du métabolisme des plantes et facilitant la colonisation de l'hôte. A ce titre, ils ne peuvent pas être facilement perdus, même après le déploiement des gènes de résistance correspondants. Les protéines effectrices conservées semblent, de ce fait, être les cibles parfaites pour la sélection d'une résistance potentiellement plus durables que celles qui perçoivent des effecteurs non conservés (Chepsergon *et al.*, 2021). Ces résistances percevant des core effecteurs sont également qualifiées de résistances à large spectre, pouvant conférer une résistance à la plupart des souches d'un agent pathogène (dite résistance à large spectre non spécifique à la race), ou conférer une résistance à plusieurs espèces d'agents pathogènes (dite résistance à large spectre non spécifiques à l'espèce ; Li *et al.*, 2020).

Différentes stratégies peuvent être utilisées pour obtenir une résistance à large spectre : (1) la sélection et le déploiement de gènes de résistance capables de reconnaître des effecteurs conservés ; (2) l'édition de gènes de résistance pour augmenter leurs capacité à reconnaître plusieurs effecteurs ; (3) l'utilisation des cibles (facteurs de sensibilité) communes et conservées entre les effecteurs.

A) Sélection et déploiement de gènes de résistance capables de reconnaître des effecteurs conservés

Plusieurs gènes de résistance ont été décrits comme étant capables de reconnaître des effecteurs conservés. Chez les champignons, le gène de résistance de la tomate *Cf4* est capable de reconnaître l'effecteur *AVR4* de *F. fulva* mais aussi son orthologue chez *M.*

fijiensis. Cf2, quant à lui, confère une résistance à la fois à *F. fulva* et au nématode *Globodera rostochiensis* via leurs gènes AVR respectifs, AVR2 et *Gr-VAPI*, qui ciblent la même protéase de la tomate gardée par Cf2 (Rooney *et al.*, 2005 ; Lozano-Torres *et al.*, 2012 ; Stergiopoulos *et al.*, 2012).

D'un point de vue pratique, il est en théorie possible de cribler des génotypes végétaux pour la présence de gènes de résistance en exprimant transitoirement les core effecteurs, permettant ainsi d'identifier des résistances à large spectre (Rietman *et al.*; 2012). Encore faut-il pour cela pouvoir réaliser de l'expression transitoire sur la plante testée. Par ailleurs, pour améliorer les chances de trouver des gènes de résistance qui ciblent des effecteurs conservés, il est préférable de rechercher des ressources génétiques ayant évolué indépendamment de l'agent pathogène (Chepsergon *et al.*, 2021). Ainsi, les gènes de résistance doivent de préférence être recherchés dans des variétés ou des espèces végétales n'ayant pas 'suivi' l'histoire évolutive des agents pathogènes. Cependant, plus le pool génétique de la ressource est distinct de la plante dans laquelle les gènes de résistance doivent être introgressés, plus les processus de sélection traditionnels utilisant des croisements seront limités en terme de fertilité. Dans ce cas, les technologies transgéniques peuvent être un moyen permettant de surmonter les limites de croisement et d'étendre le pool de sources génétiques de résistance qui peut être utilisé pour obtenir une résistance durable (Chepsergon *et al.*, 2021).

Lors de notre étude, nous avons caractérisé une résistance à large spectre reconnaissant le core effecteur AvrLm3 et ses homologues chez *F. fulva* et *F. oxysporum*. La résistance Rlm3 pourrait être utilisée de plusieurs façons. Les genres *Fusarium* et *Cladosporium* ayant été identifiés dans le microbiote associé au colza pendant l'infection par *L. maculans* (Kerdraon *et al.*, 2019, 2020), nous pourrions rechercher, quand les génomes correspondants auront été séquencés, des homologues d'AvrLm3 chez ces espèces, ainsi que chez d'autres espèces associées au colza, et étudier leur interaction avec Rlm3. Les homologues d'AvrLm3 dans différents champignons phytopathogènes pourraient également être utilisés pour identifier les gènes R dans les plantes hôtes correspondantes, comme nouvelles sources potentielles de résistance. Enfin, Rlm3 pourrait être transféré du colza dans la plante hôte des agents pathogènes possédant des homologues d'AvrLm3.

AvrLm10A/AvrLm10B sont reconnus par Rlm10 alors que les autres membres de la famille ne le sont pas. En effet, le silencing ou l'inactivation par CRIPR-Cas9 d'*AvrLm10A* ou *AvrLm10B* était suffisants pour échapper à la reconnaissance par Rlm10 (Petit-Houdenot *et*

al., 2019 ; Talbi *et al.*, in prep.). Rlm10 n'étant pas cloné, il serait intéressant de tester la capacité du gène de résistance I2 de la tomate, qui est capable de reconnaître le couple SIX5/AVR2, à reconnaître les membres de la famille AvrLm10. Ceci pourrait nous donner des pistes non seulement pour l'identification des gènes de résistance capables de reconnaître les autres membres de la famille AvrLm10 mais aussi, en cas de complémentation, la possibilité d'utiliser I2 pour l'édition de gène de résistance à large spectre ciblant la famille AvrLm10 / SIX5 de façon large, notamment chez d'autres agents pathogènes du colza.

B) Edition de gènes de résistance pour augmenter leur capacité à reconnaître plusieurs effecteurs.

Les protéines de résistance, notamment les NLR, sont généralement spécifiques d'un effecteur et très peu ont la capacité de reconnaître plusieurs effecteurs. Leur spectre peut être extrêmement limité en raison du polymorphisme des gènes codant des effecteurs dans les populations d'agents pathogènes. Une perspective prometteuse pour surmonter ces limites est la création de NLRs avec des spécificités de reconnaissance élargies par ingénierie moléculaire.

Il a été montré que des échanges de domaines ou de résidus dans le domaine LRR des NLRs L et P du lin avaient induit des changements dans leurs spécificités de reconnaissance (Dodds *et al.*, 2001; Ravensdale *et al.*, 2012). De même, la modification du gène de résistance *R3a* de la pomme de terre a permis d'augmenter son spectre de reconnaissance à plusieurs souches de *P. infestans* (Segretin *et al.*, 2014), et la mutation de son homologue dans la tomate, *I2*, a permis d'acquérir une résistance partielle à *P. infestans* en plus de celle déjà conférée contre *F. oxysporum* (Giannakopoulou *et al.*, 2015).

De nombreux NLRs de plantes abritent un ou plusieurs domaines non canoniques intégrés dans leur structure (Cesari *et al.*, 2014; van de Weyer *et al.*, 2019). Certains de ces domaines intégrés (ID) sont impliqués dans la reconnaissance spécifique des effecteurs et sont considérés comme des domaines leures dérivés de protéines ciblées par ces effecteurs (Cesari *et al.*, 2013; Maidment *et al.*, 2021). Les NLR-ID fonctionnent en combinaison avec un second NLR qui agit comme un exécuteur. Ils semblent, donc, particulièrement adaptés à la modification car l'introduction de mutations ciblées dans le domaine intégré ou le

remplacement de celui-ci par d'autres cibles/leurres d'effecteurs pourraient modifier ou créer de nouvelles spécificités de reconnaissance. De plus, depuis la résolution de la structure cristalline du premier complexe ID-effecteur Pik-1_HMA-AVR-Pik (Maqbool *et al.*, 2015), de plus en plus d'informations sont disponibles pour une meilleure ingénierie des NLRs. En effet, une analyse structure-fonction détaillée a permis de déchiffrer comment les IDs contribuent à la reconnaissance des protéines effectrices fongiques (Maqbool *et al.*, 2015; Ortiz *et al.*, 2017; De la Concepcion *et al.*, 2018). Des études ont établi que les protéines HMA ont été recrutées de manière répétée et indépendante pour servir de domaines leurres qui fixent physiquement les effecteurs comme des pièges moléculaires (Oikawa *et al.*, 2020; Maidment *et al.*, 2021). Des travaux ont pu démontrer que la conception d'IDs guidée par la structure du système Pik-1/Pik-2 permettait la reconnaissance de différents allèles du même effecteur (De la Concepcion *et al.*, 2019). Enfin, récemment, une nouvelle spécificité de reconnaissance des effecteurs de *M. oryzae* par le NLR RGA5 a pu être générée en créant une nouvelle surface de liaison dans son ID HMA, en échangeant un nombre limité de résidus du domaine Pikp-1_HMA avec le domaine RGA5_HMA. Les protéines chimères générées ont acquis la capacité à se lier à AVR-PikD avec une haute affinité, tout en conservant une affinité de liaison modérée avec AVR-Pia et AVR1-CO39 dans *N. benthamiana* (Cesari *et al.*, 2022). Lors de notre étude, nous avons pu mettre en évidence que plusieurs effecteurs d'avirulence (AvrLm4-7, AvrLm3, AvrLM5-9 et AvrLMS-Lep2) appartiennent à la famille structurale LARS. Plusieurs des gènes de résistance correspondants ont été clonés (*Rlm4*, *Rlm7* et *Rlm9*, Larkan *et al.*, 2020 ; Haddadi *et al.*, 2021) ou devraient l'être prochainement (*Rlm3*). Ces gènes correspondant en fait à des allèles d'un même gène codant pour une WAKL, nous pourrions réaliser une analyse structure – fonction pour élargir le spectre de reconnaissance de cette protéine de résistance à plusieurs effecteurs d'un même agent pathogène et également à des effecteurs de plusieurs agents pathogènes en utilisant les capacités de *Rlm3* mises en évidence lors de cette étude.

C) Agir sur des cibles communes et conservées entre les effecteurs.

Une alternative à la caractérisation de nouvelles sources de résistance spécifique est d'identifier des facteurs de sensibilité ciblés au cours du processus infectieux et de les modifier (Gawehns *et al.*, 2013). Une résistance durable et à large spectre peut, ainsi, être obtenue en identifiant des facteurs de sensibilité qui sont ciblés par les core effecteurs.

Les kinases BAK1 et BIK1, qui interagissent avec de multiples PRR pour la détection de PAMP et la signalisation de la PTI (Heese *et al.*, 2007, Lu *et al.*, 2010, Roux *et al.*, 2011), sont ciblées par un nombre important d'effecteurs d'agents pathogènes bactériens, oomycètes et fongiques. Ainsi, le core effecteur NIS1, que l'on trouve dans des champignons tels que *C. tofieldiae* et *M. oryzae*, peut cibler à la fois BAK1 et BIK1, inhibant leurs activités kinases et altérant ainsi la signalisation PTI (Irieda *et al.*, 2019). De ce fait, BAK1 et BIK1 pourraient être des leviers pour assurer une résistance à large spectre. De même, les effecteurs Avr3a-like identifiés chez plusieurs espèces de *Phytophthora* ciblent les CAD7s. Li *et al.* (2019) ont montré que le silencing de CAD7 augmente la résistance d'*A. thaliana* et de *N. benthamiana* à différentes espèces de *Phytophthora*.

De ce fait, une résistance durable et à large spectre pourrait être obtenue en identifiant des gènes de sensibilité ciblés par des core effecteurs, en utilisant des méthodes d'interaction protéine-protéine telles que des cribles double hybride dans la levure *S. cerevisiae*. Puis, l'inactivation ou la modification par des méthodes d'édition du génome ou en identifiant des allèles non ciblés par les core effecteurs permettrait d'interférer avec la capacité des effecteurs à s'associer avec leurs partenaires hôtes. Ainsi, l'inactivation de six gènes de sensibilité a permis de conférer une résistance de la pomme de terre à *P. infestans* (Sun *et al.*, 2016).

Malgré l'efficacité théorique de l'inactivation des gènes de sensibilité pour la résistance, il est cependant important de vérifier que celle-ci ne présente pas d'effets pléiotropes, notamment l'induction d'un nanisme et d'une sensibilité accrue aux stress (van Schie *et al.*, 2014). En effet, les core effecteurs ciblent souvent des éléments importants pour les plantes. Par exemple, BAK1 et BIK1, évoqués précédemment, régulent la détection des brassinostéroïdes qui conduit à la croissance et au développement des plantes (Lin *et al.*, 2013). Leur inactivation aurait, donc, un impact important sur la plante, et peuvent donc difficilement être inactivés pour diminuer la sensibilité des plantes à l'infection. Par conséquent, pour qu'un mutant de gène de sensibilité soit utilisable en sélection variétale, les questions suivantes doivent être prises en compte : (i) La mutation ou l'édition d'un gène de sensibilité a-t-elle des effets secondaires indésirables ? (ii) Dans un scénario où un gène de sensibilité est redondant, est-il possible de cibler plusieurs gènes ? (iii) Muter un gène de sensibilité améliorera-t-il suffisamment la résistance / tolérance de la plante à l'infection ? (Chepsergon *et al.*, 2021).

Dans ses travaux de thèse, Y. Petit-Houdenot a déterminé par un crible double-hybride que la protéine PR1, qui possède un effet antimicrobien, était une cible végétale potentielle d'AvrLm10A/AvrLm10B. Il est possible que les autres membres de la famille AvrLm10 puissent également cibler PR1. PR1 avait déjà été décrite comme cible de deux

effecteurs de *P. nodorum*, ToxA et Tox3 (Breen *et al.*, 2017a; Lu *et al.*, 2014). Lors de l'infection du colza par *L. maculans*, l'expression de PR1 est induite dès le début de l'infection avec une amplitude importante lors de la réaction incompatible, indiquant l'importance de PR1 lors de l'ETI (Šašek *et al.*, 2012). Au vu de l'importance fondamentale des protéines PR1 dans les réactions de défense de la plante, il semble cohérent que ces protéines constituent un hub pour les effecteurs. Cependant, la délétion de plusieurs gènes codant des protéines PR1 risque d'entraîner une augmentation importante de la sensibilité des plantes aux agents pathogènes. En revanche, si nous arrivons à déterminer quelles protéines PR1 du colza sont ciblées par AvrLm10A et AvrLm10B, nous pourrions réaliser une délétion sélective des gènes correspondants ou rechercher des allèles de ces gènes dont les protéines ne seraient pas ou moins ciblées par la famille AvrLm10. Dans le cas de ToxA et Tox3, il a été montré que ToxA interagit spécifiquement avec une seule protéine PR1, alors que Tox3 interagit avec 6 des 23 protéines PR1 du blé (Breen *et al.*, 2017a).

Annexes

Tableau S. Amorces utilisées dans le chapitre II.

Clonage	jn3_08094_noPS-GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTcATGGACAAACACCATTATTGTGCC	
	jn3_08094_nostop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTcACGTTGACACAGGATGCC	
	jn3_08094_stop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTcCTAACGTTGACACAGGATGCC	
	jn3_08095_noPS-GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTcATGTTGCCTCGCTCAGAAGAATTTTC	
	jn3_08095_nostop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTcTACATTATAGACTTCCCCATC	
	jn3_08095_stop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTcCTATACATTATAGACTTCCCCATC	
	jn3_09745_noPS-GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTcATGGACATGCACCAGTACTGTGC	
	jn3_09745_nostop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTcTGACCAACACATAATGCCTC	
	jn3_09745_stop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTcCTATGACCAACACATAATGCCTC	
	jn3_09746_noPS-GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTcATGTCACCTACGCCAACGAA	
	jn3_09746_nostop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTcTAGATTGTGCCAAGCCCCTG	
	jn3_09746_stop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTcTTATAGATTGTGCCAAGCCCCTG	
	AvrLm10- 1noPS-GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGACTTGCACGAC TTCTGCGC	
	AvrLm10- 1stop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTcTTACCTAAGACAAATA ATAGAGCCG	
	AvrLm10- 1nostop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTcCCCTAAGACAAATAATA GAGCCG	
	AvrLm10- 2noPS-GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCCACTGCAT AATCCATTTTC	
	AvrLm10- 2stop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTcTTACATATTTTGCCAAT CTCCAATAAAGC	
	AvrLm10- 2nostop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAAGCTGGGTcCATATTTTGCCAATCTC CAATAAAGC	
	FP7939	GGCTATCGTTTCGTAATGGTG	
	FP7940	GGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGT	
	AvrLm10-B nops Fw pZK538	CACCATTTACGAACGATAGCCGCGCCACTCGACAATCCATTTTC	
	AvrLm10-B nostop RV pZK538	ACCACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATGGCATATTTTGCCAATCTCCAA TAAAGC	
	08095 nops Fw pZK538	CACCATTTACGAACGATAGCCTTGCCCTCGCTCAGAAGAATTTTC	
	08095 nostop RV pZK538	ACCACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATGGTACATTATAGACTTCCCCAT C	
	09746 nops Fw pZK538	CACCATTTACGAACGATAGCCTCACCTACGCCAACGAA	
	09746 nostop RV pZK538	ACCACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATGGTAGATTGTGCCAAGCCCCTG	
	FOR pDONR207	TCACCGACAAACAACAGATA	
	REV pDONR207	TGTTGGAATTTAATCGCGGC	
	Sequencage	jn3_08094_noPS	GACAAACACCATTATTGTGCC
		jn3_08094_noStop	ACGTTGACACAGGATGCC
		jn3_08095_noPS	TTGCCCTCGCTCAGAAGAATTTTC
		jn3_08095_noStop	TACATTATAGACTTCCCCATC
jn3_09745_noPS		GACATGCACCAGTACTGTGC	
jn3_09745_noStop		TGACCAACACATAATGCCTC	
jn3_09746_noPS		TCACCTACGCCAACGAA	
jn3_09746_noStop		TAGATTGTGCCAAGCCCCTG	
jn3_08094seq U		AGAGTCGTTGATCCATTGAA	
jn3_08094seq L		ACACCGTGAACCTATAGCCT	
jn3_08095seq U		ACCCACGCTATAAAGACACGA	
jn3_08095seq L		AAAGTCCTGCGCTCTGTAT	
jn3_09745seq U		ATGCGTATCTAGTATACCCCTA	
jn3_09745seq L		GAGAAGAAGCCTTCCCTCT	
jn3_09746seq U		GGCAAACCCTAACCTACTT	
jn3_09746seq L		GCCCTAGAGCCTTAGATATAGCC	
AvrLm10AseqU		CCTTTTCCTTAGACCATGG	
AvrLm10AseqL		GGTGAGGAAGTTAAGAGAAGC	
AvrLm10B seqU		CCGTCCTCCACATTACTTC	
AvrLm10B seqL		CGTAGGAAAGGATATTCAAAGG	
CRISPR		ARNg jn3_Avr101Crispr	GAAACCTAATCAATCAACAAGGGCCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTC GTCGCCCTTGTCGCTTTCAACTGGTTTTAGAGCTAGAAAATAGC
		ARNg jn3_Avr102Crispr	GAAACCTAATCAATCAACATAGTACTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCG TCTACTATCGCCAGCCCCAGCGTTTTAGAGCTAGAAAATAGC
		ARNg jn3_08094Crispr	GAAACCTAATCAATCAACTGACGCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCG TCTGCAACTCTTAAATAAAGCTTTTTAGAGCTAGAAAATAGC
		ARNg jn3_08095Crispr	GAAACCTAATCAATCAACATTGTCCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCG TCGACAATTCCTACCGACAGTGTTTTTAGAGCTAGAAAATAGC
	ARNg jn3_09745Crispr	GAAACCTAATCAATCAACACTGAGCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCG TCCTCAGTCAAATGACCATACCGTTTTAGAGCTAGAAAATAGC	
	ARNg jn3_09746Crispr	GAAACCTAATCAATCAACATCGGTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCG TCACCGATATCAGTATCGCGCCGTTTTAGAGCTAGAAAATAGC	
	MAI0309	ACCTTAATCGAAACCTAATCAATCAAC	
	MAI0310	ATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC	
	AvrLm10-A CRISPRseqFw	GTAGCCTCGTTTCTGTGAGC	

AvrLm10-A CRISPRseqRv	CTTATCCCATCAATGCGGC
AvrLm10-B CRISPRseqFw	ATTGTAAGCTCGCCGTCTA
AvrLm10-B CRISPRseqRv	GCCGTTGCCTATTGATGGTT
08094 CRISPRseqFw	CTGGTAAGCATTACGGTCTG
08094 CRISPRseqRv	CAGGGAGGCTAAGCTGAGTT
08095 CRISPRseqFw	ATTTTGCTTGCCTCGCTCAG
08095 CRISPRseqRv	CGCGTTATGGAATGGTGAT
09745 CRISPRseqFw	TCAAAGGATAAGAGCAGGACCT
09745 CRISPRseqRv	TGACCAACACATAATGCCTCC
09746 CRISPRseqFw	TTCCCAACTAACCCACGA
09746 CRISPRseqRv	ACAGTTTGAACATGGGCTGG

Références

- Adachi, H., Contreras, M. P., Harant, A., Wu, C. H., Derevnina, L., Sakai, T., et al. (2019).** An N-terminal motif in NLR immune receptors is functionally conserved across distantly related plant species. *Elife*, 8, e49956.
- Ai, G., Xia, Q., Song, T., Li, T., Zhu, H., Peng, H., et al. (2021).** A *Phytophthora sojae* CRN effector mediates phosphorylation and degradation of plant aquaporin proteins to suppress host immune signaling. *PLoS pathogens*, 17(3), e1009388.
- Alcântara, A., Bosch, J., Nazari, F., Hoffmann, G., Gallei, M., Uhse, S., et al. (2019).** Systematic Y2H screening reveals extensive effector-complex formation. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1437.
- Allender, C. J., & King, G. J. (2010).** Origins of the amphiploid species *Brassica napus*L. investigated by chloroplast and nuclear molecular markers. *BMC plant biology*, 10(1), 1-9.
- Amoozadeh, S., Johnston, J., & Meisrimler, C. N. (2021).** Exploiting Structural Modelling Tools to Explore Host-Translocated Effector Proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12962.
- Anfinsen, C. B. (1973).** Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181(4096), 223-230.
- Ansan-Melayah, D., Balesdent, M. H., Buee, M., & Rouxel, T. (1995).** Genetic characterization of *AvrLm1*, the first avirulence gene of *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology*, 85(12), 1525-1529.
- Ansan-Melayah, D., Balesdent, M. H., Delourme, R., Pilet, M. L., Tanguy, X., Renard, M., & Rouxel, T. (1998).** Genes for race-specific resistance against blackleg disease in *Brassica napus* L. *Plant Breeding*, 117(4), 373-378.
- Arroyo-Velez, N., González-Fuente, M., Peeters, N., Lauber, E., & Noël, L. D. (2020).** From effectors to effectomes: Are functional studies of individual effectors enough to decipher plant pathogen infectious strategies?. *PLoS Pathogens*, 16(12), e1009059.
- Ayukawa, Y., Asai, S., Gan, P., Tsushima, A., Ichihashi, Y., Shibata, A., et al. (2021).** A pair of effectors encoded on a conditionally dispensable chromosome of *Fusarium oxysporum* suppress host-specific immunity. *Communications Biology*, 4(1), 1-12.
- Balesdent, M. H., Attard, A., Kühn, M. L., & Rouxel, T. (2002).** New avirulence genes in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology*, 92(10), 1122-1133.
- Balesdent, M. H., Fudal, I., Ollivier, B., Bally, P., Grandaubert, J., Eber, F., et al. (2013).** The dispensable chromosome of *Leptosphaeria maculans* shelters an effector gene conferring avirulence towards *B. brassica rapa*. *New Phytologist*, 198(3), 887-898.
- Balesdent, M. H., Plissonneau, C., Coudard, L., Daverdin, G., Le Meur, L., Carpezat, et al. (2015).** Résistance du colza au phoma: où en est l'efficacité de Rlm7?. *Phytoma la Défense des Végétaux*, (684), 20-24.
- Bart, R., Cohn, M., Kassen, A., McCallum, E. J., Shybut, M., Petriello, A., et al. (2012).** High-throughput genomic sequencing of cassava bacterial blight strains identifies conserved effectors to target for durable resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(28), E1972-E1979.
- Bauer, S., Yu, D., Lawson, A. W., Saur, I. M., Frantzeskakis, L., Kracher, B., et al. (2021).** The leucine-rich repeats in allelic barley MLA immune receptors define specificity towards sequence-unrelated powdery mildew avirulence effectors with a predicted common RNase-like fold. *PLoS pathogens*, 17(2), e1009223.
- Belozerskaya, T.A., Gessler, N.N., and Aver'yanov, A. A. (2015).** Melanin pigments of fungi. In *Fungal Metabolites*, J.-M. Merillon, and K.G. Ramawat, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 1– 29.
- Bi, G., & Zhou, J. M. (2021).** Regulation of cell death and signaling by pore-forming resistosomes. *Annual review of phytopathology*, 59, 239-263.
- Bigeard, J., Colcombet, J., & Hirt, H. (2015).** Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular plant*, 8(4), 521-539.

- Blekemolen, M. C., Tark-Dame, M., & Takken, F. L. (2018).** Visualization and Quantification of Cell-to-cell Movement of Proteins in *Nicotiana benthamiana*. *Bio-protocol*, 8(24).
- Block, A., Toruño, T. Y., Elowsky, C. G., Zhang, C., Steinbrenner, J., Beynon, J., & Alfano, J. R. (2014).** The *Pseudomonas syringae* type III effector H op D 1 suppresses effector-triggered immunity, localizes to the endoplasmic reticulum, and targets the Arabidopsis transcription factor NTL 9. *New Phytologist*, 201(4), 1358-1370.
- Blondeau, K., Blaise, F., Graille, M., Kale, S. D., Linglin, J., Ollivier, B., et al. (2015).** Crystal structure of the effector AvrL m4-7 of *Leptosphaeria maculans* reveals insights into its translocation into plant cells and recognition by resistance proteins. *The Plant Journal*, 83(4), 610-624.
- Böhm, H., Albert, I., Oome, S., Raaymakers, T. M., 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(11), e1004491.
- Böhnert, H. U., Fudal, I., Dioh, W., Tharreau, D., Nottoghem, J. L., & Lebrun, M. H. (2004).** A putative polyketide synthase/peptide synthetase from *Magnaporthe grisea* signals pathogen attack to resistant rice. *The Plant Cell*, 16(9), 2499-2513.
- Bok, J. W., & Keller, N. P. (2004).** LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus spp.* *Eukaryotic cell*, 3(2), 527-535.
- Boller, T., & Felix, G. (2009).** A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual review of plant biology*, 60, 379-406.
- Boutemy, L. S., King, S. R., Win, J., Hughes, R. K., Clarke, T. A., Blumenschein, T. M., et al. (2011).** Structures of Phytophthora RXLR effector proteins: a conserved but adaptable fold underpins functional diversity. *Journal of Biological Chemistry*, 286(41), 35834-35842.
- Boutrot, F., & Zipfel, C. (2017).** Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annual review of phytopathology*, 55, 257-286.
- Breen S, Outram M, Kobe B, Williams S, and Solomon P. (2017a).** Dissecting the role of the Tox3 effector in the Parastagonospora nodorum-wheat interaction
- Brown, J. K., & Tellier, A. (2011).** Plant-parasite coevolution: bridging the gap between genetics and ecology. *Annual review of phytopathology*, 49, 345-367.
- Brun, H., Chèvre, A. M., Fitt, B. D., Powers, S., Besnard, A. L., Ermel, M., et al. (2010).** Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytologist*, 185(1), 285-299.
- Burley, S. K., & Berman, H. M. (2021).** Open-access data: A cornerstone for artificial intelligence approaches to protein structure prediction. *Structure*, 29(6), 515-520.
- Cai, R., Lewis, J., Yan, S., Liu, H., Clarke, C. R., Campanile, F., et al. (2011).** The plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato is genetically monomorphic and under strong selection to evade tomato immunity. *PLoS pathogens*, 7(8), e1002130.
- Cantila, A. Y., Saad, N. S. M., Amas, J. C., Edwards, D., & Batley, J. (2020).** Recent findings unravel genes and genetic factors underlying leptosphaeria maculans resistance in *Brassica napus* and its relatives. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 313.
- Cao, L., Blekemolen, M. C., Tintor, N., Cornelissen, B. J., & Takken, F. L. (2018).** The *Fusarium oxysporum* Avr2-Six5 effector pair alters plasmodesmatal exclusion selectivity to facilitate cell-to-cell movement of Avr2. *Molecular plant*, 11(5), 691-705.

- Carreón-Anguiano, K. G., Islas-Flores, I., Vega-Arreguín, J., Sáenz-Carbonell, L., & Canto-Canché, B. (2020).** EffHunter: a tool for prediction of effector protein candidates in fungal proteomic databases. *Biomolecules*, *10*(5), 712.
- Catanzariti, A. M., Dodds, P. N., Ve, T., Kobe, B., Ellis, J. G., & Staskawicz, B. J. (2010).** The AvrM effector from flax rust has a structured C-terminal domain and interacts directly with the M resistance protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *23*(1), 49-57.
- Cesari, S. (2018).** Multiple strategies for pathogen perception by plant immune receptors. *New Phytologist*, *219*(1), 17-24.
- Cesari, S., Bernoux, M., Moncuquet, P., Kroj, T., & Dodds, P. N. (2014).** A novel conserved mechanism for plant NLR protein pairs: the “integrated decoy” hypothesis. *Frontiers in plant science*, *5*, 606.
- Césari, S., Kanzaki, H., Fujiwara, T., Bernoux, M., Chalvon, V., Kawano, Y., et al. (2014).** The NB-LRR proteins RGA 4 and RGA 5 interact functionally and physically to confer disease resistance. *The EMBO journal*, *33*(17), 1941-1959.
- Cesari, S., Thilliez, G., Ribot, C., Chalvon, V., Michel, C., Jauneau, A., et al. (2013).** The rice resistance protein pair RGA4/RGA5 recognizes the *Magnaporthe oryzae* effectors AVR-Pia and AVR1-CO39 by direct binding. *The Plant Cell*, *25*(4), 1463-1481.
- Cesari, S., Xi, Y., Declerck, N., Chalvon, V., Mammri, L., Pugnère, M., et al. (2022).** New recognition specificity in a plant immune receptor by molecular engineering of its integrated domain. *Nature communications*, *13*(1), 1-13.
- Chalhoub, B., Denoeud, F., Liu, S., Parkin, I. A., Tang, H., Wang, X., et al. (2014).** Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *science*, *345*(6199), 950-953.
- Charlebois, R. L., & Doolittle, W. F. (2004).** Computing prokaryotic gene ubiquity: rescuing the core from extinction. *Genome research*, *14*(12), 2469-2477.
- Chatterjee, S., Kuang, Y., Splivallo, R., Chatterjee, P., & Karlovsky, P. (2016).** Interactions among filamentous fungi *Aspergillus niger*, *Fusarium verticillioides* and *Clonostachys rosea*: fungal biomass, diversity of secreted metabolites and fumonisin production. *BMC microbiology*, *16*(1), 1-13.
- Chen, J., Li, M., Liu, L., Chen, G., & Fu, Z. Q. (2021).** ZAR1 resistosome and helper NLRs: Bringing in calcium and inducing cell death. *Molecular Plant*, *14*(8), 1234-1236.
- Chen, J., Upadhyaya, N. M., Ortiz, D., Sperschneider, J., Li, F., Bouton, C., et al. (2017).** Loss of AvrSr50 by somatic exchange in stem rust leads to virulence for Sr50 resistance in wheat. *Science*, *358*(6370), 1607-1610.
- Chepersgon, J., Motaung, T. E., & Moleleki, L. N. (2021).** “Core” RxLR effectors in phytopathogenic oomycetes: A promising way to breeding for durable resistance in plants?. *Virulence*, *12*(1), 1921-1935.
- Chiara, M., Fanelli, F., Mule, G., Logrieco, A. F., Pesole, G., Leslie, J. F., et al. (2015).** Genome sequencing of multiple isolates highlights subtelomeric genomic diversity within *Fusarium fujikuroi*. *Genome Biology and Evolution*, *7*(11), 3062-3069.
- Cho, Y., Ohm, R. A., Grigoriev, I. V., & Srivastava, A. (2013).** Fungal-specific transcription factor A b P f2 activates pathogenicity in *A lternaria brassicicola*. *The Plant Journal*, *75*(3), 498-514.
- Chujo, T., & Scott, B. (2014).** Histone H 3 K 9 and H 3 K 27 methylation regulates fungal alkaloid biosynthesis in a fungal endophyte–plant symbiosis. *Molecular Microbiology*, *92*(2), 413-434.
- Clarke, C. R., Chinchilla, D., Hind, S. R., Taguchi, F., Miki, R., et al. (2013).** Allelic variation in two distinct *Pseudomonas syringae* flagellin epitopes modulates the strength of plant immune responses but not bacterial motility. *New Phytologist*, *200*(3), 847-860.

- Collemare, J., O'Connell, R., & Lebrun, M. H. (2019).** Nonproteinaceous effectors: the terra incognita of plant–fungal interactions. *New Phytologist*, 223(2), 590-596.
- Collmer, A., Badel, J. L., Charkowski, A. O., Deng, W. L., Fouts, D. E., Ramos, A. R., et al. (2000).** *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. *Proceedings of the national academy of sciences*, 97(16), 8770-8777.
- Cook, D. E., Mesarich, C. H., & Thomma, B. P. (2015).** Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion. *Annual review of phytopathology*, 53, 541-563.
- Cooke, D. E., Cano, L. M., Raffaele, S., Bain, R. A., Cooke, L. R., Etherington, G. J., et al. (2012).** Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the Irish potato famine pathogen.
- Cowling, W. A. (2007).** Genetic diversity in Australian canola and implications for crop breeding for changing future environments. *Field Crops Research*, 104(1-3), 103-111.
- Croll, D., & McDonald, B. A. (2012).** Intron gains and losses in the evolution of *Fusarium* and *Cryptococcus* fungi. *Genome Biology and Evolution*, 4(11), 1148-1161.
- Dallery, J. F., Lapalu, N., Zampounis, A., Pigné, S., Luyten, I., Amselem, J., et al. (2017).** Gapless genome assembly of *Colletotrichum higginsianum* reveals chromosome structure and association of transposable elements with secondary metabolite gene clusters. *BMC genomics*, 18(1), 1-22.
- Dallery, J. F., Zimmer, M., Halder, V., Suliman, M., Pigné, S., Le Goff, G., et al. (2020).** Inhibition of jasmonate-mediated plant defences by the fungal metabolite higginsianin B. *Journal of experimental botany*, 71(10), 2910-2921.
- Damania, A. B., Pecetti, L., Qualset, C. O., & Humeid, B. O. (1997).** Diversity and geographic distribution of stem solidness and environmental stress tolerance in a collection of *durum wheat* landraces from Turkey. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 44(2), 101-108.
- Dangl, J. L., & Jones, J. D. (2001).** Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *nature*, 411(6839), 826-833.
- Dangl, J. L., Horvath, D. M., & Staskawicz, B. J. (2013).** Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science*, 341(6147), 746-751.
- Daniel, S. Y., Outram, M. A., Smith, A., McCombe, C. L., Khambalkar, P. B., Rima, S. A., et al. (2021).** The structural repertoire of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* effectors revealed by experimental and computational studies. *bioRxiv*.
- Daverdin, G., Rouxel, T., Gout, L., Aubertot, J. N., Fudal, I., Meyer, M., et al. (2012).** Genome structure and reproductive behaviour influence the evolutionary potential of a fungal phytopathogen. *PLoS Pathogens*, 8(11), e1003020.
- Dawkins, R., & Krebs, J. R. (1979).** Arms races between and within species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 205(1161), 489-511.
- de Guillen, K., Ortiz-Vallejo, D., Gracy, J., Fournier, E., Kroj, T., & Padilla, A. (2015).** Structure analysis uncovers a highly diverse but structurally conserved effector family in phytopathogenic fungi. *PLoS pathogens*, 11(10), e1005228.
- De Jonge, R., Peter van Esse, H., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., et al. (2010).** Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *science*, 329(5994), 953-955.
- De la Concepcion, J. C., Franceschetti, M., MacLean, D., Terauchi, R., Kamoun, S., & Banfield, M. J. (2019).** Protein engineering expands the effector recognition profile of a rice NLR immune receptor. *Elife*, 8, e47713.

- De la Concepcion, J. C., Franceschetti, M., Maqbool, A., Saitoh, H., Terauchi, R., Kamoun, S., & Banfield, M. J. (2018).** Polymorphic residues in rice NLRs expand binding and response to effectors of the blast pathogen. *Nature plants*, 4(8), 576-585.
- Depotter, J. R., & Doehlemann, G. (2020).** Target the core: durable plant resistance against filamentous plant pathogens through effector recognition. *Pest Management Science*, 76(2), 426-431.
- Derbyshire, M., Mbengue, M., Barascud, M., Navaud, O., & Raffaele, S. (2019).** Small RNAs from the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* highlight host candidate genes associated with quantitative disease resistance. *Molecular Plant Pathology*, 20(9), 1279-1297.
- Di, X., Cao, L., Hughes, R. K., Tintor, N., Banfield, M. J., & Takken, F. L. (2017).** Structure–function analysis of the *Fusarium oxysporum* Avr2 effector allows uncoupling of its immune-suppressing activity from recognition. *New Phytologist*, 216, 897-914.
- Di, X., Takken, F. L., & Tintor, N. (2016).** How phytohormones shape interactions between plants and the soil-borne fungus *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in plant science*, 7, 170.
- Dickman, M. B., & de Figueiredo, P. (2013).** Death be not proud—cell death control in plant fungal interactions. *PLoS Pathogens*, 9(9), e1003542.
- Djamei, A., Schipper, K., Rabe, F., Ghosh, A., Vincon, V., Kahnt, J., et al. (2011).** Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature*, 478(7369), 395-398.
- Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010).** Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11(8), 539-548.
- Dodds, P. N., Lawrence, G. J., & Ellis, J. G. (2001).** Six amino acid changes confined to the leucine-rich repeat β -strand/ β -turn motif determine the difference between the P and P2 rust resistance specificities in flax. *The Plant Cell*, 13(1), 163-178.
- Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Catanzariti, A. M., Teh, T., Wang, C. I., Ayliffe, M. A., et al. (2006).** Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(23), 8888-8893.
- Doehlemann, G., Van Der Linde, K., Abmann, D., Schwammbach, D., Hof, A., Mohanty, A., et al. (2009).** Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS pathogens*, 5(2), e1000290.
- Dong, S., Stam, R., Cano, L. M., Song, J., Sklenar, J., Yoshida, K., et al. (2014).** Effector specialization in a lineage of the Irish potato famine pathogen. *Science*, 343(6170), 552-555.
- Dou, D., Kale, S. D., Wang, X., Jiang, R. H., Bruce, N. A., Arredondo, F. D., et al. (2008).** RXLR-mediated entry of *Phytophthora sojae* effector Avr1b into soybean cells does not require pathogen-encoded machinery. *The Plant Cell*, 20(7), 1930-1947.
- Du, Z., Su, H., Wang, W., Ye, L., Wei, H., Peng, Z., et al. (2021).** The trRosetta server for fast and accurate protein structure prediction. *Nature protocols*, 16(12), 5634-5651.
- Dutheil, J. Y., Mannhaupt, G., Schweizer, G., MK Sieber, C., Münsterkötter, M., Güldener, U., et al. (2016).** A tale of genome compartmentalization: the evolution of virulence clusters in smut fungi. *Genome biology and evolution*, 8(3), 681-704.
- Dutot, M., Nelson, L. M., & Tyson, R. C. (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., d'Agata, L., Couloux, A., Gay, E. J., Istace, B., et al. (2018).** De novo assembly and annotation of three *Leptosphaeria* genomes using Oxford Nanopore MinION sequencing. *Scientific Data*, 5(1), 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(4), 953-971.
- Faino, L., Seidl, M. F., Shi-Kunne, X., Pauper, M., van den Berg, G. C., Wittenberg, A. H., & Thomma, B. P. (2016).** Transposons passively and actively contribute to evolution of the two-speed genome of a fungal pathogen. *Genome Research*, 26(8), 1091-1100.
- Faris, J. D., Liu, Z., & Xu, S. S. (2013).** Genetics of tan spot resistance in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 126(9), 2197-2217.
- Faris, J. D., Zhang, Z., Lu, H., Lu, S., Reddy, L., Cloutier, S., et al. (2010).** A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(30), 13544-13549.
- Felix, G., Duran, J. D., Volko, S., & Boller, T. (1999).** Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal*, 18(3), 265-276.
- Feng, Z., Xue, F., Xu, M., Chen, X., Zhao, W., Garcia-Murria, M. J., et al. (2016).** The ER-membrane transport system is critical for intercellular trafficking of the NSm movement protein and tomato spotted wilt tospovirus. *PLoS pathogens*, 12(2), e1005443.
- Figueroa, M., Ortiz, D., & Henningsen, E. C. (2021).** Tactics of host manipulation by intracellular effectors from plant pathogenic fungi. *Current opinion in plant biology*, 62, 102054.
- Fitt, B. D., Brun, H., Barbetti, M. J., & Rimmer, S. R. (2006).** World-wide importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). Sustainable strategies for managing *Brassica napus* (oilseed rape) resistance to *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker), 3-15.
- Fitt, B. D., Huang, Y. J., Bosch, F. V. D., & West, J. S. (2006).** Coexistence of related pathogen species on arable crops in space and time. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44, 163-182.
- Flor, H. H. (1971).** Current status of the gene-for-gene concept. *Annual review of phytopathology*, 9(1), 275-296.
- Fouché, S., Plissonneau, C., & Croll, D. (2018).** The birth and death of effectors in rapidly evolving filamentous pathogen genomes. *Current opinion in microbiology*, 46, 34-42.
- Franceschetti, M., Maqbool, A., Jiménez-Dalmaroni, M. J., Pennington, H. G., Kamoun, S., & Banfield, M. J. (2017).** Effectors of filamentous plant pathogens: commonalities amid diversity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81(2), e00066-16.
- Frantzeskakis, L., Di Pietro, A., Rep, M., Schirawski, J., Wu, C. H., & Panstruga, R. (2020).** Rapid evolution in plant–microbe interactions—a molecular genomics perspective. *New Phytologist*, 225(3), 1134-1142.
- Frantzeskakis, L., Kusch, S., & Panstruga, R. (2019).** The need for speed: compartmentalized genome evolution in filamentous phytopathogens. *Molecular Plant Pathology*, 20(1), 3.
- Friesen, T. L., Faris, J. D., Solomon, P. S., & Oliver, R. P. (2008).** Host-specific toxins: effectors of necrotrophic pathogenicity. *Cellular microbiology*, 10(7), 1421-1428.
- Friesen, T. L., Stukenbrock, E. H., Liu, Z., Meinhardt, S., Ling, H., Faris, J. D., et al. (2006).** Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Nature genetics*, 38(8), 953-956.
- Fudal, I., Ross, S., Brun, H., Besnard, A. L., Ermel, M., Kuhn, M. L., et al. (2009).** Repeat-induced point mutation (RIP) as an alternative mechanism of evolution toward virulence in *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(8), 932-941.

- Fudal, I., Ross, S., Gout, L., Blaise, F., Kuhn, M. L., Eckert, M. R., et al. (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(4), 459-470.
- Fussell, G. E. (1955).** History of cole (Brassica sp.). *Nature*, 176(4471), 48-51.
- Galagan, J. E., & Selker, E. U. (2004).** RIP: the evolutionary cost of genome defense. *TRENDS in Genetics*, 20(9), 417-423.
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. D., Jaffe, D., et al. (2003).** The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*, 422(6934), 859-868.
- Gardiner, D. M., Cozijnsen, A. J., Wilson, L. M., Pedras, M. S. C., & Howlett, B. J. (2004).** The sirodesmin biosynthetic gene cluster of the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Molecular microbiology*, 53(5), 1307-1318.
- Gawehns, F., Cornelissen, B. J., & Takken, F. L. (2013).** The potential of effector-target genes in breeding for plant innate immunity. *Microbial biotechnology*, 6(3), 223-229.
- Gay, E. J., Soyer, J. L., Lapalu, N., Linglin, J., Fudal, I., Da Silva, C., 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(1), 1-27.
- Germain, H., Joly, D. L., Mireault, C., Plourde, M. B., Letanneur, C., Stewart, D., et al. (2018).** Infection assays in Arabidopsis reveal candidate effectors from the poplar rust fungus that promote susceptibility to bacteria and oomycete pathogens. *Molecular plant pathology*, 19(1), 191-200.
- Gervais, J. (2017).** *Identification et analyse fonctionnelle des effecteurs tardifs impliqués dans la colonisation systémique du colza par Leptosphaeria maculans* (Doctoral dissertation, Université Paris Saclay (COMUE)).
- Ghanbarnia, K., Fudal, I., Larkan, N. J., Links, M. G., Balesdent, M. H., Profotova, B., et al. (2015).** Rapid identification of the *Leptosphaeria maculans* avirulence gene AvrLm2 using an intraspecific comparative genomics approach. *Molecular plant pathology*, 16(7), 699-709.
- Ghanbarnia, K., Ma, L., Larkan, N. J., Haddadi, P., Fernando, W. G. D., & Borhan, M. H. (2018).** *Leptosphaeria maculans* AvrLm9: a new player in the game of hide and seek with AvrLm4-7. *Molecular Plant Pathology*, 19(7), 1754-1764.
- Ghildiyal, M., & Zamore, P. D. (2009).** Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature reviews genetics*, 10(2), 94-108.
- Giannakopoulou, A., Steele, J. F., Segretin, M. E., Bozkurt, T. O., Zhou, J., Robatzek, S., et al. (2015).** Tomato I2 immune receptor can be engineered to confer partial resistance to the oomycete *Phytophthora infestans* in addition to the fungus *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(12), 1316-1329.
- Gibriel, H. A., Thomma, B. P., & Seidl, M. F. (2016).** The age of effectors: genome-based discovery and applications. *Phytopathology*, 106(10), 1206-1212.
- Giraldo, M. C., & Valent, B. (2013).** Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 800-814.
- Giraldo, M. C., Dagdas, Y. F., Gupta, Y. K., Mentlak, T. A., Yi, M., Martinez-Rocha, A. L., et al. (2013).** Two distinct secretion systems facilitate tissue invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Nature communications*, 4(1), 1-12.
- Godfrey, D., Böhlenius, H., Pedersen, C., Zhang, Z., Emmersen, J., & Thordal-Christensen, H. (2010).** Powdery mildew fungal effector candidates share N-terminal Y/F/WxC-motif. *BMC genomics*, 11(1), 1-13.

- González-Fuente, M., Carrère, S., Monachello, D., Marsella, B. G., Cazalé, A. C., Zischek, C., et al. (2020).** EffectorK, a comprehensive resource to mine for *Ralstonia*, *Xanthomonas*, and other published effector interactors in the Arabidopsis proteome. *Molecular plant pathology*, 21(10), 1257-1270.
- Gout, L., Fudal, I., Kuhn, M. L., Blaise, F., Eckert, M., Cattolico, L., et al. (2006).** Lost in the middle of nowhere: the AvrLm1 avirulence gene of the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*. *Molecular microbiology*, 60(1), 67-80.
- Govrin, E. M., & Levine, A. (2000).** The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current biology*, 10(13), 751-757.
- Grandaubert, J., Bhattacharyya, A., & Stukenbrock, E. H. (2015).** RNA-seq-based gene annotation and comparative genomics of four fungal grass pathogens in the genus *Zymoseptoria* identify novel orphan genes and species-specific invasions of transposable elements. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 5(7), 1323-1333.
- Grandaubert, J., Lowe, R. G., Soyer, J. L., Schoch, C. L., Van de Wouw, A. P., Fudal, I., 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(1), 1-27.
- Grund, E., Tremousaygue, D., & Deslandes, L. (2019).** Plant NLRs with integrated domains: unity makes strength. *Plant physiology*, 179(4), 1227-1235.
- Hacquard, S., Kracher, B., Maekawa, T., Vernaldi, S., Schulze-Lefert, P., & van Themaat, E. V. L. (2013).** Mosaic genome structure of the barley powdery mildew pathogen and conservation of transcriptional programs in divergent hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(24), E2219-E2228.
- Haddadi, P., Larkan, N. J., Van de Wouw, A., Zhang, Y., Neik, T. X., Beynon, E., et al. (2021).** *Brassica napus* genes Rlm4 and Rlm7, conferring resistance to *Leptosphaeria maculans*, are alleles of the Rlm9 wall-associated kinase-like resistance locus. *bioRxiv*.
- Haddadi, P., Ma, L., Wang, H., & Borhan, M. H. (2016).** Genome-wide transcriptomic analyses provide insights into the lifestyle transition and effector repertoire of *Leptosphaeria maculans* during the colonization of *Brassica napus* seedlings. *Molecular plant pathology*, 17(8), 1196-1210.
- Hatta, R., Ito, K., Hosaki, Y., Tanaka, T., Tanaka, A., Yamamoto, M., et al. (2002).** A conditionally dispensable chromosome controls host-specific pathogenicity in the fungal plant pathogen *Alternaria alternata*. *Genetics*, 161(1), 59-70.
- Haueisen, J., Möller, M., Eschenbrenner, C. J., Grandaubert, J., Seybold, H., Adamiak, H., & Stukenbrock, E. H. (2019).** Highly flexible infection programs in a specialized wheat pathogen. *Ecology and evolution*, 9(1), 275-294.
- Heese, A., Hann, D. R., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A. M., He, K., Li, J., et al. (2007).** The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(29), 12217-12222.
- Heil, M. (2009).** Damaged-self recognition in plant herbivore defence. *Trends in plant science*, 14(7), 356-363.
- Heitman, J. (2006).** Sexual reproduction and the evolution of microbial pathogens. *Current Biology*, 16(17), R711-R725.
- 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(5), e1002684.
- Hemetsberger, C., Mueller, A. N., Matei, A., Herrberger, C., Hensel, G., Kumlehn, J., et al. (2015).** The fungal core effector P ep1 is conserved across smuts of dicots and monocots. *New Phytologist*, 206(3), 1116-1126.

- Houterman, P. M., Cornelissen, B. J., & Rep, M. (2008).** Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. *PLoS pathogens*, 4(5), e1000061.
- Houterman, P. M., Ma, L., Van Ooijen, G., De Vroomen, M. J., Cornelissen, B. J., Takken, F. L., & Rep, M. (2009).** The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *The Plant Journal*, 58(6), 970-978.
- Houterman, P. M., Speijer, D., Dekker, H. L., de Koster, C. G., Cornelissen, B. J., & Rep, M. (2007).** The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. *Molecular plant pathology*, 8(2), 215-221.
- Hyde, K. D., Jones, E. B., Liu, J. K., Ariyawansa, H., Boehm, E., Boonmee, S., .et al. (2013).** Families of dothideomycetes. *Fungal diversity*, 63(1), 1-313.
- Idnurm, A., Urquhart, A. S., Vummadi, D. R., Chang, S., Van de Wouw, A. P., & López-Ruiz, F. J. (2017).** Spontaneous and CRISPR/Cas9-induced mutation of the osmosensor histidine kinase of the canola pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Fungal biology and biotechnology*, 4(1), 1-12.
- Illergård, K., Ardell, D. H., & Elofsson, A. (2009).** Structure is three to ten times more conserved than sequence—a study of structural response in protein cores. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 77(3), 499-508.
- Irieda, H., Inoue, Y., Mori, M., Yamada, K., Oshikawa, Y., Saitoh, H., et al. (2019).** Conserved fungal effector suppresses PAMP-triggered immunity by targeting plant immune kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(2), 496-505.
- Jacob, S., & Kamoun, S. (2012).** Genome evolution in filamentous plant pathogens: why bigger can be better. *Nature Reviews Microbiology*, 10(6), 417-430.
- Jacobs, J. M., Milling, A., Mitra, R. M., Hogan, C. S., Ailloud, F., Prior, P., & Allen, C. (2013).** *Ralstonia solanacearum* requires PopS, an ancient AvrE-family effector, for virulence and to overcome salicylic acid-mediated defenses during tomato pathogenesis. *MBio*, 4(6), e00875-13.
- Jaswal, R., Kiran, K., Rajarammohan, S., Dubey, H., Singh, P. K., Sharma, Y., et al. (2020).** Effector biology of biotrophic plant fungal pathogens: Current advances and future prospects. *Microbiological Research*, 241, 126567.
- Jeon, J., Lee, G. W., Kim, K. T., Park, S. Y., Kim, S., Kwon, S., et al. (2020).** Transcriptome profiling of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* and its host *Oryza sativa* during infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 33(2), 141-144.
- Jia, Y., McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P., & Valent, B. (2000).** Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *The EMBO journal*, 19(15), 4004-4014.
- Jing, M., Guo, B., Li, H., Yang, B., Wang, H., Kong, G., et al. (2016).** A *Phytophthora sojae* effector suppresses endoplasmic reticulum stress-mediated immunity by stabilizing plant binding immunoglobulin proteins. *Nature Communications*, 7(1), 1-17.
- Jiquel, A., Gervais, J., Geistodt-Kiener, A., Delourme, R., Gay, E. J., Ollivier, B., et al. (2021).** A gene-for-gene interaction involving a 'late'effector contributes to quantitative resistance to the stem canker disease in *Brassica napus*. *New Phytologist*, 231(4), 1510-1524.
- Joly, D. L., Feau, N., Tanguay, P., & Hamelin, R. C. (2010).** Comparative analysis of secreted protein evolution using expressed sequence tags from four poplar leaf rusts (*Melampsora spp.*). *BMC genomics*, 11(1), 1-16.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006).** The plant immune system. *nature*, 444(7117), 323-329.
- Jubic, L. M., Saile, S., Furzer, O. J., El Kasmi, F., & Dangl, J. L. (2019).** Help wanted: helper NLRs and plant immune responses. *Current opinion in plant biology*, 50, 82-94.

- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., et al. (2021).** Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583-589.
- Kale, S. D., Gu, B., Capelluto, D. G., Dou, D., Feldman, E., Rumore, A., et al. (2010).** External lipid PI3P mediates entry of eukaryotic pathogen effectors into plant and animal host cells. *Cell*, 142(2), 284-295.
- Kamoun, S. (2007).** Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed. *Current opinion in plant biology*, 10(4), 358-365.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L. J., Brefort, T., Saville, B. J., et al. (2006).** Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*, 444(7115), 97-101.
- Kanzaki, H., Yoshida, K., Saitoh, H., Fujisaki, K., Hirabuchi, A., Alaux, L., et al. (2012).** Arms race co-evolution of *Magnaporthe oryzae* AVR-Pik and rice Pik genes driven by their physical interactions. *The Plant Journal*, 72(6), 894-907.
- Kasuga, T., & Gijzen, M. (2013).** Epigenetics and the evolution of virulence. *Trends in microbiology*, 21(11), 575-582.
- Keen, N. T. (1990).** Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annual review of genetics*, 24(1), 447-463.
- Kerdraon, L., Barret, M., Balesdent, M. H., Suffert, F., & Laval, V. (2020).** Impact of a resistance gene against a fungal pathogen on the plant host residue microbiome: The case of the *Leptosphaeria maculans*–*Brassica napus* pathosystem. *Molecular plant pathology*, 21(12), 1545-1558.
- Kerdraon, L., Laval, V., & Suffert, F. (2019).** Microbiomes and pathogen survival in crop residues, an ecotone between plant and soil. *Phytobiomes Journal*, 3(4), 246-255.
- Khang, C. H., Berruyer, R., Giraldo, M. C., Kankanala, P., Park, S. Y., Czymmek, K., et al. (2010).** Translocation of *Magnaporthe oryzae* effectors into rice cells and their subsequent cell-to-cell movement. *The Plant Cell*, 22(4), 1388-1403.
- Kim, K. T., Jeon, J., Choi, J., Cheong, K., Song, H., Choi, G., et al. (2016).** Kingdom-wide analysis of fungal small secreted proteins (SSPs) reveals their potential role in host association. *Frontiers in plant science*, 7, 186.
- Kim, Y. J., Lin, N. C., & Martin, G. B. (2002).** Two distinct *Pseudomonas* effector proteins interact with the Pto kinase and activate plant immunity. *Cell*, 109(5), 589-598.
- King, R., Urban, M., Hammond-Kosack, M. C., Hassani-Pak, K., & Hammond-Kosack, K. E. (2015).** The completed genome sequence of the pathogenic ascomycete fungus *Fusarium graminearum*. *BMC genomics*, 16(1), 1-21.
- Kleemann, J., Rincon-Rivera, L. J., Takahara, H., Neumann, U., van Themaat, E. V. L., van der Does, H. C., et al. (2012).** Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *PLoS pathogens*, 8(4), e1002643.
- Koharudin, L. M., Debiec, K. T., & Gronenborn, A. M. (2015).** Structural insight into fungal cell wall recognition by a CVNH protein with a single LysM domain. *Structure*, 23(11), 2143-2154.
- Krzymanski, J. A., Pietka, T., Krzysztof, M., & Krtka, K. (1999).** Studies of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) very low and aliphatic glucosinolates content. *Oil seed Crops*, 19, 389-398.
- Kryshtafovych, A., Schwede, T., Topf, M., Fidelis, K., & Moult, J. (2019).** Critical assessment of methods of protein structure prediction (CASP)—Round XIII. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 87(12), 1011-1020.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., & Felix, G. (2004).** The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *The Plant Cell*, 16(12), 3496-3507.

- Kusch, S., Frantzeskakis, L., Thieron, H., & Panstruga, R. (2018).** Small RNAs from cereal powdery mildew pathogens may target host plant genes. *Fungal biology*, *122*(11), 1050-1063
- Lanver, D., Müller, A. N., Happel, P., Schweizer, G., Haas, F. B., Franitza, M., et al. (2018).** The biotrophic development of *Ustilago maydis* studied by RNA-seq analysis. *The Plant Cell*, *30*(2), 300-323.
- Larkan, N. J., Lydiate, D. J., Parkin, I. A. P., Nelson, M. N., Epp, D. J., Cowling, W. A., et al. (2013).** The *Brassica napus* blackleg resistance gene LepR3 encodes a receptor-like protein triggered by the *Leptosphaeria maculans* effector AVR_{LM} 1. *New Phytologist*, *197*(2), 595-605.
- Larkan, N. J., Ma, L., & Borhan, M. H. (2015).** The *Brassica napus* receptor-like protein RLM 2 is encoded by a second allele of the LepR3/R_{LM}2 blackleg resistance locus. *Plant Biotechnology Journal*, *13*(7), 983-992.
- Larkan, N. J., Ma, L., Haddadi, P., Buchwaldt, M., Parkin, I. A., Djavaheri, M., & Borhan, M. H. (2020).** The *Brassica napus* wall-associated kinase-like (WAKL) gene Rlm9 provides race-specific blackleg resistance. *The Plant Journal*, *104*(4), 892-900.
- Laurie, J. D., Ali, S., Linning, R., Mannhaupt, G., Wong, P., Güldener, U., et al. (2012).** Genome comparison of barley and maize smut fungi reveals targeted loss of RNA silencing components and species-specific presence of transposable elements. *The Plant Cell*, *24*(5), 1733-1745.
- Lazar, N., Mesarich, C. H., Petit-Houdenot, Y., Talbi, N., de la Sierra-Gallay, I. L., Zélie, E., et al. (2021).** A new family of structurally conserved fungal effectors displays epistatic interactions with plant resistance proteins. *bioRxiv*, 2020-12.
- Lee, J. Y., & Lu, H. (2011).** Plasmodesmata: the battleground against intruders. *Trends in plant science*, *16*(4), 201-210.
- Li, T., Wang, Q., Feng, R., Li, L., Ding, L., Fan, G., et al. (2019).** Negative regulators of plant immunity derived from cinnamyl alcohol dehydrogenases are targeted by multiple *Phytophthora* Avr3a-like effectors. *New Phytologist*.
- Li, W., Deng, Y., Ning, Y., He, Z., & Wang, G. L. (2020).** Exploiting broad-spectrum disease resistance in crops: from molecular dissection to breeding. *Annual review of plant biology*, *71*, 575-603.
- Lin, W., Lu, D., Gao, X., Jiang, S., Ma, X., Wang, Z., et al. (2013).** Inverse modulation of plant immune and brassinosteroid signaling pathways by the receptor-like cytoplasmic kinase BIK1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(29), 12114-12119.
- Liu, D., Jiang, W., Liu, C., Xin, C., & Hou, W. (2000).** Uptake and accumulation of lead by roots, hypocotyls and shoots of Indian mustard [*Brassica juncea* (L.)]. *Bioresource Technology*, *71*(3), 273-277.
- Liu, T., Liu, Z., Song, C., Hu, Y., Han, Z., She, J., et al. (2012).** Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor. *science*, *336*(6085), 1160-1164.
- Liu, T., Song, T., Zhang, X., Yuan, H., Su, L., Li, W., et al. (2014).** Unconventionally secreted effectors of two filamentous pathogens target plant salicylate biosynthesis. *Nature communications*, *5*(1), 1-10.
- Liu, Z., Latunde-Dada, A. O., Hall, A. M., & Fitt, B. D. (2014).** Phoma stem canker disease on oilseed rape (*Brassica napus*) in China is caused by *Leptosphaeria biglobosa* 'brassicae'. *European Journal of Plant Pathology*, *140*(4), 841-857.
- Lorrain, C., Petre, B., & Duplessis, S. (2018).** Show me the way: rust effector targets in heterologous plant systems. *Current opinion in microbiology*, *46*, 19-25.
- Lozano-Torres, J. L., Wilbers, R. H., Gawronski, P., Boshoven, J. C., Finkers-Tomczak, A., Cordewener, J. H., et al. (2012).** Dual disease resistance mediated by the immune receptor Cf-2 in tomato requires a common virulence target of a fungus and a nematode. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(25), 10119-10124.

- Lu, D., Wu, S., Gao, X., Zhang, Y., Shan, L., & He, P. (2010).** A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(1), 496-501.
- Lu, K., Wei, L., Li, X., Wang, Y., Wu, J., Liu, M., et al. (2019).** Whole-genome resequencing reveals Brassica napus origin and genetic loci involved in its improvement. *Nature communications*, 10(1), 1-12.
- Lu, S., Faris, J. D., Sherwood, R., Friesen, T. L., & Edwards, M. C. (2014).** A dimeric PR-1-type pathogenesis-related protein interacts with ToxA and potentially mediates ToxA-induced necrosis in sensitive wheat. *Molecular plant pathology*, 15(7), 650-663.
- Ludwig, N., Reissmann, S., Schipper, K., Gonzalez, C., Assmann, D., Glatter, T., et al. (2021).** A cell surface-exposed protein complex with an essential virulence function in *Ustilago maydis*. *Nature microbiology*, 6(6), 722-730.
- Ma, L. J., Van Der Does, H. C., Borkovich, K. A., Coleman, J. J., Daboussi, M. J., Di Pietro, A., et al. (2010).** Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*, 464(7287), 367-373.
- Ma, L., Djavaheri, M., Wang, H., Larkan, N. J., Haddadi, P., Beynon, E., et al. (2018).** *Leptosphaeria maculans* effector protein AvrLml1 modulates plant immunity by enhancing MAP kinase 9 phosphorylation. *IScience*, 3, 177-191.
- Ma, L., Houterman, P. M., Gawehns, F., Cao, L., Sillo, F., Richter, H., et al. (2015).** The AVR2-SIX5 gene pair is required to activate I-2-mediated immunity in tomato. *New Phytologist*, 208(2), 507-518.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J. M., Ecker, J. R., & Dangl, J. L. (2003).** Arabidopsis RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell*, 112(3), 379-389.
- Maidment, J. H., Franceschetti, M., Maqbool, A., Saitoh, H., Jantasuriyarat, C., Kamoun, S., et al. (2021).** Multiple variants of the fungal effector AVR-Pik bind the HMA domain of the rice protein OsHIPP19, providing a foundation to engineer plant defense. *Journal of Biological Chemistry*, 296.
- Maqbool, A. H. M. C. A. H. T., Saitoh, H., Franceschetti, M., Stevenson, C. E. M., Uemura, A., Kanzaki, H., et al. (2015).** Structural basis of pathogen recognition by an integrated HMA domain in a plant NLR immune receptor. *Elife*, 4, e08709.
- Marín-Menguiano, M., Moreno-Sánchez, I., Barrales, R. R., Fernández-Álvarez, A., & Ibeas, J. I. (2019).** N-glycosylation of the protein disulfide isomerase Pdi1 ensures full *Ustilago maydis* virulence. *PLoS pathogens*, 15(11), e1007687.
- Martin, R., Qi, T., Zhang, H., Liu, F., King, M., Toth, C., et al. (2020).** Structure of the activated ROQ1 resistosome directly recognizing the pathogen effector XopQ. *Science*, 370(6521), eabd9993.
- McDermott, J. E., Corrigan, A., Peterson, E., Oehmen, C., Niemann, G., Cambronne, E. D., et al. (2011).** Computational prediction of type III and IV secreted effectors in gram-negative bacteria. *Infection and immunity*, 79(1), 23-32.
- McDonald, B. A., & Linde, C. (2002).** Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual review of phytopathology*, 40(1), 349-379.
- McDonald, B. A., & Linde, C. (2002).** The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica*, 124(2), 163-180.
- McDonald, M. C., Taranto, A. P., Hill, E., Schwessinger, B., Liu, Z., Simpfendorfer, S., et al. (2019).** Transposon-mediated horizontal transfer of the host-specific virulence protein ToxA between three fungal wheat pathogens. *MBio*, 10(5), e01515-19.
- Medzhitov, R. (2009).** Approaching the asymptote: 20 years later. *Immunity*, 30(6), 766-775.

- Mejri, S. (2018, July).** Efficacités et modes d'action de nouveaux simulateurs de défenses des plantes sur le pathosystème blé-*Zymoseptoria tritici*. Université du Littoral Côte d'Opale.
- Mendes-Pereira, E., Balesdent, M. H., Hortense, B. R. U. N., & Rouxel, T. (2003).** Molecular phylogeny of the *Leptosphaeria maculans*–*L. biglobosa* species complex. *Mycological research*, 107(11), 1287-1304.
- Mentlak, T. A., Kombrink, A., Shinya, T., Ryder, L. S., Otomo, I., Saitoh, H., et al. (2012).** Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. *The Plant Cell*, 24(1), 322-335.
- Michielse, C. B., van Wijk, R., Reijnen, L., Manders, E. M., Boas, S., Olivain, C., et al. (2009).** The nuclear protein Sge1 of *Fusarium oxysporum* is required for parasitic growth. *PLoS pathogens*, 5(10), e1000637.
- Mirzadi Gohari, A., Mehrabi, R., Robert, O., Ince, I. A., Boeren, S., Schuster, M., et al. (2014).** Molecular characterization and functional analyses of ZtWor1, a transcriptional regulator of the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Molecular plant pathology*, 15(4), 394-405.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., et al. (2007).** CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), 19613-19618.
- Monaghan, J., & Zipfel, C. (2012).** Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current opinion in plant biology*, 15(4), 349-357.
- Mueller, A. N., Ziemann, S., Treitschke, S., Abmann, 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(2), e1003177.
- Mukhi, N., Gorenkin, D., & Banfield, M. J. (2020).** Exploring folds, evolution and host interactions: understanding effector structure/function in disease and immunity. *New Phytologist*, 227(2), 326-333.
- Mukhtar, M. S., Carvunis, A. R., Dreze, M., Eppe, P., Steinbrenner, J., Moore, J., et al. (2011).** Independently evolved virulence effectors converge onto hubs in a plant immune system network. *science*, 333(6042), 596-601.
- Nagaharu, U., & Nagaharu, N. (1935).** Genome analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Jpn J Bot*, 7(7), 389-452.
- Nei, M., & Rooney, A. P. (2005).** Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu. Rev. Genet.*, 39, 121-152.
- Nilsson, C. (2010).** Impact of soil tillage on parasitoids of oilseed rape pests. In *Biocontrol-based integrated management of oilseed rape pests* (pp. 305-311). Springer, Dordrecht.
- Nováková, M., Šašek, V., Trdá, L., Krutinová, H., Mongin, T., Valentová, O., et al. (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(6), 818-831.
- Nürnbergger, T., & Lipka, V. (2005).** Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular plant pathology*, 6(3), 335-345.
- O'Connell, R. J., Thon, M. R., Hacquard, S., Amyotte, S. G., Kleemann, J., Torres, M. F., et al. (2012).** Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum fungi* deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature genetics*, 44(9), 1060-1065.
- Oikawa, K., Fujisaki, K., Shimizu, M., Takeda, T., Saitoh, H., Hirabuchi, A., et al. (2020).** The blast pathogen effector AVR-Pik binds and stabilizes rice heavy metal-associated (HMA) proteins to co-opt their function in immunity. *bioRxiv*.

- Ökmen, B., Collemare, J., Griffiths, S., van der Burgt, A., Cox, R., & de Wit, P. J. (2014).** Functional analysis of the conserved transcriptional regulator CfWor1 in *Cladosporium fulvum* reveals diverse roles in the virulence of plant pathogenic fungi. *Molecular microbiology*, 92(1), 10-27.
- Okuyama, Y., Kanzaki, H., Abe, A., Yoshida, K., Tamiru, M., Saitoh, H., et al. (2011).** A multifaceted genomics approach allows the isolation of the rice Pia-blast resistance gene consisting of two adjacent NBS-LRR protein genes. *The Plant Journal*, 66(3), 467-479.
- Oome, S., Raaymakers, T. M., Cabral, A., Samwel, S., Böhm, H., Albert, I., et al. (2014).** Nep1-like proteins from three kingdoms of life act as a microbe-associated molecular pattern in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(47), 16955-16960.
- Ortiz, D., de Guillen, K., Cesari, S., Chalvon, V., Gracy, J., Padilla, A., & Kroj, T. (2017).** Recognition of the *Magnaporthe oryzae* effector AVR-Pia by the decoy domain of the rice NLR immune receptor RGA5. *The Plant Cell*, 29(1), 156-168.
- Outram, M. A., Solomon, P. S., & Williams, S. J. (2021).** Pro-domain processing of fungal effector proteins from plant pathogens. *PLoS Pathogens*, 17(10), e1010000.
- Outram, M. A., Sung, Y. C., Yu, D., Dagvadorj, B., Rima, S. A., Jones, D. A., et al. (2021).** The crystal structure of SnTox3 from the necrotrophic fungus *Parastagonospora nodorum* reveals a unique effector fold and provides insight into Snn3 recognition and pro-domain protease processing of fungal effectors. *New Phytologist*, 231(6), 2282-2296.
- Pais, M., Win, J., Yoshida, K., Etherington, G. J., Cano, L. M., Raffaele, S., et al. (2013).** From pathogen genomes to host plant processes: the power of plant parasitic oomycetes. *Genome biology*, 14(6), 1-10.
- Palma-Guerrero, J., Ma, X., Torriani, S. F., Zala, M., Francisco, C. S., Hartmann, F. E., et al. (2017).** Comparative transcriptome analyses in *Zymoseptoria tritici* reveal significant differences in gene expression among strains during plant infection. *Molecular plant-microbe interactions*, 30(3), 231-244.
- Palma-Guerrero, J., Torriani, S. F., Zala, M., Carter, D., Courbot, M., Rudd, J. J., et al. (2016).** Comparative transcriptomic analyses of *Zymoseptoria tritici* strains show complex lifestyle transitions and intraspecific variability in transcription profiles. *Molecular Plant Pathology*, 17(6), 845-859.
- Panstruga, R., & Moscou, M. J. (2020).** What is the molecular basis of nonhost resistance?. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 33(11), 1253-1264.
- Parlange, F., Daverdin, G., Fudal, I., Kuhn, M. L., Balesdent, M. H., Blaise, F., et al. (2009).** *Leptosphaeria maculans* avirulence gene AvrLm4-7 confers a dual recognition specificity by the Rlm4 and Rlm7 resistance genes of oilseed rape, and circumvents Rlm4-mediated recognition through a single amino acid change. *Molecular microbiology*, 71(4), 851-863.
- Pedersen, R. K. (2015).** A preliminary report on a coastal and underwater survey in the area of Jeddah, Saudi Arabia. *American Journal of Archaeology*, 119(1), 125-136.
- Pellegrin, C., Morin, E., Martin, F. M., & Veneault-Fourrey, C. (2015).** Comparative analysis of secretomes from ectomycorrhizal fungi with an emphasis on small-secreted proteins. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1278.
- Perez-Nadales, E., Nogueira, M. F. A., Baldin, C., Castanheira, S., El Ghalid, M., Grund, E., et al. (2014).** Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants. *Fungal genetics and biology*, 70, 42-67.
- Petit-Houdenot, Y., & Fudal, I. (2017).** Complex interactions between fungal avirulence genes and their corresponding plant resistance genes and consequences for disease resistance management. *Frontiers in plant science*, 8, 1072.

- Petit-Houdenot, Y., Degrave, A., Meyer, M., Blaise, F., Ollivier, B., Marais, C. L., et al. (2019).** A two genes-for-one gene interaction between *Leptosphaeria maculans* and *Brassica napus*. *New Phytologist*, 223(1), 397-411.
- Petre, B., & Kamoun, S. (2014).** How do filamentous pathogens deliver effector proteins into plant cells?. *PLoS biology*, 12(2), e1001801.
- Petre, B., Saunders, D. G., Sklenar, J., Lorrain, C., Win, J., Duplessis, S., & Kamoun, S. (2015).** Candidate effector proteins of the rust pathogen *Melampsora larici-populina* target diverse plant cell compartments. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(6), 689-700.
- Plett, J. M., Daguerre, Y., Wittulsky, S., Vayssières, A., Deveau, A., Melton, S. J., 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*, 111(22), 8299-8304.
- Plissonneau, C., Benevenuto, J., Mohd-Assaad, N., Fouché, S., Hartmann, F. E., & Croll, D. (2017).** Using population and comparative genomics to understand the genetic basis of effector-driven fungal pathogen evolution. *Frontiers in plant science*, 8, 119.
- Plissonneau, C., Daverdin, G., Ollivier, B., Blaise, F., Degrave, A., Fudal, I., et al. (2016).** A game of hide and seek between avirulence genes *AvrLm4-7* and *AvrLm3* in *Leptosphaeria maculans*. *New Phytologist*, 209(4), 1613-1624.
- Plissonneau, C., Hartmann, F. E., & Croll, D. (2018).** Pangenome analyses of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* reveal the structural basis of a highly plastic eukaryotic genome. *BMC biology*, 16(1), 1-16.
- 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(2), 454.
- Poppe, S., Dorsheimer, L., Happel, P., & Stukenbrock, E. H. (2015).** Rapidly evolving genes are key players in host specialization and virulence of the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*). *PLoS pathogens*, 11(7), e1005055.
- Presti, L. L., & Kahmann, R. (2017).** How filamentous plant pathogen effectors are translocated to host cells. *Current opinion in plant biology*, 38, 19-24.
- Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., et al. (2015).** Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual review of plant biology*, 66, 513-545.
- Pusztahelyi, T., Holb, I. J., & Pócsi, I. (2015).** Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Frontiers in plant science*, 6, 573.
- Qi, M., Grayczyk, J. P., Seitz, J. M., Lee, Y., Link, T. I., Choi, D., et al. (2018).** Suppression or activation of immune responses by predicted secreted proteins of the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. *Molecular plant-microbe interactions*, 31(1), 163-174
- Quintanilha-Peixoto, G., Torres, R. O., Reis, I. M. A., Oliveira, T. A. S. D., Bortolini, D. E., Duarte, E. A. A., et al. (2019).** Calm before the storm: A glimpse into the secondary metabolism of *aspergillus welwitschiae*, the etiologic agent of the sisal bole rot. *Toxins*, 11(11), 631.
- Qutob, D., Patrick Chapman, B., & Gijzen, M. (2013).** Transgenerational gene silencing causes gain of virulence in a plant pathogen. *Nature communications*, 4(1), 1-6.
- 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(1), 179-188.
- Raffaele, S., Farrer, R. A., Cano, L. M., Studholme, D. J., MacLean, D., Thines, M., et al. (2010).** Genome evolution following host jumps in the Irish potato famine pathogen lineage. *Science*, 330(6010), 1540-1543.

- Rafiqi, M., Gan, P. H., Ravensdale, M., Lawrence, G. J., Ellis, J. G., Jones, D. A., et al. (2010).** Internalization of flax rust avirulence proteins into flax and tobacco cells can occur in the absence of the pathogen. *The Plant Cell*, 22(6), 2017-2032.
- Rahman, M., Madina, M. H., Plourde, M. B., Dos Santos, K. C. G., Huang, X., Zhang, Y., et al. (2021).** The fungal effector Mlp37347 alters plasmodesmata fluxes and enhances susceptibility to pathogen. *Microorganisms*, 9(6), 1232.
- Ravensdale, M., Bernoux, M., Ve, T., Kobe, B., Thrall, P. H., Ellis, J. G., & Dodds, P. N. (2012).** Intramolecular interaction influences binding of the Flax L5 and L6 resistance proteins to their AvrL567 ligands. *PLoS pathogens*, 8(11), e1003004.
- Rietman, H., Bijsterbosch, G., Cano, L. M., Lee, H. R., Vossen, J. H., Jacobsen, E., et al. (2012).** Qualitative and quantitative late blight resistance in the potato cultivar Sarpo Mira is determined by the perception of five distinct RXLR effectors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(7), 910-919.
- Robin, G. P., Kleemann, J., Neumann, U., Cabre, L., Dallery, J. F., Lapalu, N., & O'Connell, R. J. (2018).** Subcellular localization screening of *Colletotrichum higginsianum* effector candidates identifies fungal proteins targeted to plant peroxisomes, golgi bodies, and microtubules. *Frontiers in plant science*, 9, 562.
- Rocafort, M., Bowen, J. K., Hassing, B., Cox, M. P., McGreal, B., de la Rosa, S., et al. (2022).** The *Venturia inaequalis* effector repertoire is expressed in waves, and is dominated by expanded families with predicted structural similarity to avirulence proteins from other fungi. *bioRxiv*.
- Rooney, H. C., Van't Klooster, J. W., van der Hoorn, R. A., Joosten, M. H., Jones, J. D., & de Wit, P. J. (2005).** Cladosporium Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science*, 308(5729), 1783-1786.
- Rouxel, T., & Balesdent, M. H. (2005).** The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era. *Molecular plant pathology*, 6(3), 225-241.
- Rouxel, T., & Balesdent, M. H. (2017).** Life, death and rebirth of avirulence effectors in a fungal pathogen of *Brassica crops*, *L leptosphaeria maculans*. *New Phytologist*, 214(2), 526-532.
- Rouxel, T., Grandaubert, J., Hane, J. K., Hoede, C., Van de Wouw, A. P., Couloux, A., et al. (2011).** Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by Repeat-Induced Point mutations. *Nature communications*, 2(1), 1-10.
- Rouxel, T., Penaud, A., Pinochet, X., Brun, H., Gout, L., Delourme, R., et al. (2003).** A 10-year survey of populations of *Leptosphaeria maculans* in France indicates a rapid adaptation towards the Rlm1 resistance gene of oilseed rape. *European Journal of Plant Pathology*, 109(8), 871-881.
- Rudd, J. J., Kanyuka, K., Hassani-Pak, K., Derbyshire, M., Andongabo, A., Devonshire, J., et al. (2015).** Transcriptome and metabolite profiling of the infection cycle of *Zymoseptoria tritici* on wheat reveals a biphasic interaction with plant immunity involving differential pathogen chromosomal contributions and a variation on the hemibiotrophic lifestyle definition. *Plant physiology*, 167(3), 1158-1185.
- Rusch, A., Valantin-Morison, M., Sarthou, J. P., & Roger-Estrade, J. (2011).** Multi-scale effects of landscape complexity and crop management on pollen beetle parasitism rate. *Landscape Ecology*, 26(4), 473-486.
- Rybak, K., See, P. T., Phan, H. T., Syme, R. A., Moffat, C. S., Oliver, R. P., & Tan, K. C. (2017).** A functionally conserved Zn2Cys6 binuclear cluster transcription factor class regulates necrotrophic effector gene expression and host-specific virulence of two major Pleosporales fungal pathogens of wheat. *Molecular plant pathology*, 18(3), 420-434.
- Salcedo, A., Rutter, W., Wang, S., Akhunova, A., Bolus, S., Chao, S., et al. (2017).** Variation in the AvrSr35 gene determines Sr35 resistance against wheat stem rust race Ug99. *Science*, 358(6370), 1604-1606.

- Sánchez-Vallet, A., Fouché, S., Fudal, I., Hartmann, F. E., Soyer, J. L., Tellier, A., & Croll, D. (2018).** The genome biology of effector gene evolution in filamentous plant pathogens. *Annual review of phytopathology*, *56*, 21-40.
- Sanchez-Vallet, A., Mesters, J. R., & Thomma, B. P. (2015).** The battle for chitin recognition in plant-microbe interactions. *FEMS microbiology reviews*, *39*(2), 171-183.
- Sánchez-Vallet, A., Saleem-Batcha, R., Kombrink, A., Hansen, G., Valkenburg, D. J., Thomma, B. P., & Mesters, J. R. (2013).** Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptor for chitin binding through intrachain LysM dimerization. *elife*, *2*, e00790.
- Santhanam, P., & Thomma, B. P. (2013).** *Verticillium dahliae* Sge1 differentially regulates expression of candidate effector genes. *Molecular plant-microbe interactions*, *26*(2), 249-256.
- Sarma, G. N., Manning, V. A., Ciuffetti, L. M., & Karplus, P. A. (2005).** Structure of Ptr ToxA: an RGD-containing host-selective toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *The Plant Cell*, *17*(11), 3190-3202.
- Šásek, V., Nováková, M., Jindřichová, B., Bóka, K., Valentová, O., & Burketová, L. (2012).** Recognition of avirulence gene AvrLm1 from hemibiotrophic ascomycete *Leptosphaeria maculans* triggers salicylic acid and ethylene signaling in *Brassica napus*. *Molecular plant-microbe interactions*, *25*(9), 1238-1250.
- Scharf, D. H., Heinekamp, T., & Brakhage, A. A. (2014).** Human and plant fungal pathogens: the role of secondary metabolites. *PLoS pathogens*, *10*(1), e1003859.
- 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*(8), 780-789.
- Schirawski, J., Mannhaupt, G., Münch, K., Brefort, T., Schipper, K., Doehlemann, G., et al. (2010).** Pathogenicity determinants in smut fungi revealed by genome comparison. *Science*, *330*(6010), 1546-1548.
- Schmidt, S. M., Houterman, P. M., Schreiber, I., Ma, L., Amyotte, S., Chellappan, B., et al. (2013).** MITEs in the promoters of effector genes allow prediction of novel virulence genes in *Fusarium oxysporum*. *BMC genomics*, *14*(1), 1-21.
- Schoch, C. L., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Boehm, E. W. A., Burgess, T. I., De Gruyter, J., et al (2009).** A class-wide phylogenetic assessment of Dothideomycetes. *Studies in mycology*, *64*(1), 1-15.
- Schorneck, S., Huitema, E., Cano, L. M., Bozkurt, T. O., Oliva, R., Van Damme, M., et al. (2009).** Ten things to know about oomycete effectors. *Molecular plant pathology*, *10*(6), 795-803.
- Schuster, M., Schweizer, G., & Kahmann, R. (2018).** Comparative analyses of secreted proteins in plant pathogenic smut fungi and related basidiomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, *112*, 21-30.
- Segretin, M. E., Pais, M., Franceschetti, M., Chaparro-Garcia, A., Bos, J. I., Banfield, M. J., & Kamoun, S. (2014).** Single amino acid mutations in the potato immune receptor R3a expand response to *Phytophthora* effectors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *27*(7), 624-637.
- Seidl, M. F., & Thomma, B. P. (2014).** Sex or no sex: evolutionary adaptation occurs regardless. *Bioessays*, *36*(4), 335-345.
- Selin, C., De Kievit, T. R., Belmonte, M. F., & Fernando, W. (2016).** Elucidating the role of effectors in plant-fungal interactions: progress and challenges. *Frontiers in microbiology*, *7*, 600.
- Seong, K., & Krasileva, K. V. (2021).** Computational structural genomics unravels common folds and novel families in the secretome of fungal phytopathogen *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *34*(11), 1267-1280.
- Shabab, M., Shindo, T., Gu, C., Kaschani, F., Pansuriya, T., Chintla, R., et al. (2008).** Fungal effector protein AVR2 targets diversifying defense-related cys proteases of tomato. *The Plant Cell*, *20*(4), 1169-1183.

- Shahid, S., Kim, G., Johnson, N. R., Wafula, E., Wang, F., Coruh, C., et al. (2018).** MicroRNAs from the parasitic plant *Cuscuta campestris* target host messenger RNAs. *Nature*, 553(7686), 82-85.
- Sharma, R., Mishra, B., Runge, F., & Thines, M. (2014).** Gene loss rather than gene gain is associated with a host jump from monocots to dicots in the smut fungus *Melanopsichium pennsylvanicum*. *Genome biology and evolution*, 6(8), 2034-2049.
- Shen, S., Goodwin, P. H., & Hsiang, T. (2001).** Infection of *Nicotiana* species by the anthracnose fungus, *Colletotrichum orbiculare*. *European Journal of Plant Pathology*, 107(8), 767-773.
- Song, J. M., Guan, Z., Hu, J., Guo, C., Yang, Z., Wang, S., et al. (2020).** Eight high-quality genomes reveal pan-genome architecture and ecotype differentiation of *Brassica napus*. *Nature Plants*, 6(1), 34-45.
- Song, J., Win, J., Tian, M., Schornack, S., Kaschani, F., Ilyas, M., et al. (2009).** Apoplastic effectors secreted by two unrelated eukaryotic plant pathogens target the tomato defense protease Rcr3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(5), 1654-1659.
- Soyer, J. L., El Ghalid, M., Glaser, N., Ollivier, B., Linglin, J., Grandaubert, J., et al. (2014).** Epigenetic control of effector gene expression in the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *PLoS genetics*, 10(3), e1004227.
- Spanu, P. D., & Panstruga, R. (2017).** Biotrophic plant-microbe interactions. *Frontiers in plant science*, 8, 192.
- Spanu, P. D., Abbott, J. C., Amselem, J., Burgis, T. A., Soanes, D. M., Stüber, K., et al. (2010).** Genome expansion and gene loss in powdery mildew fungi reveal tradeoffs in extreme parasitism. *Science*, 330(6010), 1543-1546.
- Sperschneider, J., Catanzariti, A. M., DeBoer, K., Petre, B., Gardiner, D. M., Singh, K. B., et al. (2017).** LOCALIZER: subcellular localization prediction of both plant and effector proteins in the plant cell. *Scientific reports*, 7(1), 1-14.
- Sperschneider, J., Dodds, P. N., Gardiner, D. M., Singh, K. B., & Taylor, J. M. (2018).** Improved prediction of fungal effector proteins from secretomes with EffectorP 2.0. *Molecular plant pathology*, 19(9), 2094-2110.
- Sperschneider, J., Dodds, P. N., Singh, K. B., & Taylor, J. M. (2018).** ApoplastP: prediction of effectors and plant proteins in the apoplast using machine learning. *New Phytologist*, 217(4), 1764-1778.
- Spoel, S. H., & Dong, X. (2012).** How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature reviews immunology*, 12(2), 89-100.
- Stahl, E. A., Dwyer, G., Mauricio, R., Kreitman, M., & Bergelson, J. (1999).** Dynamics of disease resistance polymorphism at the *Rpm1* locus of *Arabidopsis*. *Nature*, 400(6745), 667-671.
- Stefansson, B. R., & Kondra, Z. P. (1975).** Tower summer rape. *Canadian Journal of Plant Science*, 55(1), 343-344.
- Steinbrenner, A. D., Goritschnig, S., & Staskawicz, B. J. (2015).** Recognition and activation domains contribute to allele-specific responses of an *Arabidopsis* NLR receptor to an oomycete effector protein. *PLoS pathogens*, 11(2), e1004665.
- Stergiopoulos, I., & de Wit, P. J. (2009).** Fungal effector proteins. *Annual review of phytopathology*, 47, 233-263.
- Stergiopoulos, I., Collemare, J., Mehrabi, R., & De Wit, P. J. (2013).** Phytotoxic secondary metabolites and peptides produced by plant pathogenic Dothideomycete fungi. *FEMS microbiology reviews*, 37(1), 67-93.
- Stergiopoulos, I., Kourmpetis, Y. A., Slot, J. C., Bakker, F. T., De Wit, P. J., & Rokas, A. (2012).** In silico characterization and molecular evolutionary analysis of a novel superfamily of fungal effector proteins. *Molecular Biology and Evolution*, 29(11), 3371-3384.

- Stotz, H. U., Mitrousis, G. K., de Wit, P. J., & Fitt, B. D. (2014).** Effector-triggered defence against apoplastic fungal pathogens. *Trends in Plant Science*, 19(8), 491-500.
- Stukenbrock, E. H., & McDonald, B. A. (2008).** The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 46, 75-100.
- Sun, K., Wolters, A. M. A., Vossen, J. H., Rouwet, M. E., Loonen, A. E., Jacobsen, E., et al. (2016).** Silencing of six susceptibility genes results in potato late blight resistance. *Transgenic research*, 25(5), 731-742.
- Takken, F. L., & Govere, A. (2012).** How to build a pathogen detector: structural basis of NB-LRR function. *Current opinion in plant biology*, 15(4), 375-384.
- Tanaka, S., Brefort, T., Neidig, N., Djamei, A., Kahnt, J., Vermerris, W., et al. (2014).** A secreted *Ustilago maydis* effector promotes virulence by targeting anthocyanin biosynthesis in maize. *elife*, 3, e01355.
- Thatcher, L. F., Manners, J. M., & Kazan, K. (2009).** *Fusarium oxysporum* hijacks COI1-mediated jasmonate signaling to promote disease development in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 58(6), 927-939.
- Tintor, N., Paauw, M., Rep, M., & Takken, F. L. (2020).** The root-invading pathogen *Fusarium oxysporum* targets pattern-triggered immunity using both cytoplasmic and apoplastic effectors. *New Phytologist*, 227(5), 1479-1492.
- Tollot, M., Assmann, D., Becker, C., Altmüller, J., Duthel, J. Y., Wegner, C. E., & Kahmann, R. (2016).** The WOPR protein Ros1 is a master regulator of sporogenesis and late effector gene expression in the maize pathogen *Ustilago maydis*. *PLoS pathogens*, 12(6), e1005697.
- Tör, M., Lotze, M. T., & Holton, N. (2009).** Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes. *Journal of experimental botany*, 60(13), 3645-3654.
- Van de Weyer, A. L., Monteiro, F., Furzer, O. J., Nishimura, M. T., Cevik, V., Witek, K., et al. (2019).** A species-wide inventory of NLR genes and alleles in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 178(5), 1260-1272.
- Van de Wouw, A. P., Lowe, R. G., Elliott, C. E., Dubois, D. J., & Howlett, B. J. (2014).** An avirulence gene, AvrLmJ1, from the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, confers avirulence to *Brassica juncea* cultivars. *Molecular Plant Pathology*, 15(5), 523-530.
- van den Burg, H. A., Harrison, S. J., Joosten, M. H., Vervoort, J., & de Wit, P. J. (2006).** *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(12), 1420-1430.
- van der Hoorn, R. A., & Kamoun, S. (2008).** From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *The Plant Cell*, 20(8), 2009-2017.
- van Esse, H. P., Van't Klooster, J. W., Bolton, M. D., Yadeta, K. A., van Baarlen, P., Boeren, S., et al. (2008).** The *Cladosporium fulvum* virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense. *The Plant Cell*, 20(7), 1948-1963.
- Van Kan, J. A. (2006).** Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in plant science*, 11(5), 247-253.
- Van Kan, J. A., Stassen, J. H., Mosbach, A., Van Der Lee, T. A., Faino, L., Farmer, A. D., et al. (2017).** A gapless genome sequence of the fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular plant pathology*, 18(1), 75-89.
- van Schie, C. C., & Takken, F. L. (2014).** Susceptibility genes 101: how to be a good host. *Annual review of phytopathology*, 52, 551-581.
- Ve, T., Williams, S. J., Catanzariti, A. M., Rafiqi, M., Rahman, M., Ellis, J. G., et al. (2013).** Structures of the flax-rust effector AvrM reveal insights into the molecular basis of plant-cell entry and effector-triggered immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(43), 17594-17599.

- Vlaardingerbroek, I., Beerens, B., Rose, L., Fokkens, L., Cornelissen, B. J., & Rep, M. (2016).** Exchange of core chromosomes and horizontal transfer of lineage-specific chromosomes in *Fusarium oxysporum*. *Environmental Microbiology*, 18(11), 3702-3713.
- Vlaardingerbroek, I., Beerens, B., Schmidt, S. M., Cornelissen, B. J., & Rep, M. (2016).** Dispensable chromosomes in *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. *Molecular Plant Pathology*, 17(9), 1455-1466.
- Vlaardingerbroek, I., Beerens, B., Shahi, S., & Rep, M. (2015).** Fluorescence assisted selection of transformants (FAST): using flow cytometry to select fungal transformants. *Fungal Genetics and Biology*, 76, 104-109.
- Vleeshouwers, V. G., & Oliver, R. P. (2014).** Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens. *Molecular plant-microbe interactions*, 27(3), 196-206.
- Voegelé, R. T., & Mendgen, K. (2003).** Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. *New Phytologist*, 159(1), 93-100.
- Walton, D. N. (1996).** *Argument structure: A pragmatic theory*. Toronto: University of Toronto Press.
- Wang, C. I. A., Gunc'ar, G., Forwood, J. K., Teh, T., Catanzariti, A. M., Lawrence, G. J., et al. (2007).** Crystal structures of flax rust avirulence proteins AvrL567-A and-D reveal details of the structural basis for flax disease resistance specificity. *The Plant Cell*, 19(9), 2898-2912.
- Wang, H. E., Mann, N. C., Mears, G., Jacobson, K., & Yealy, D. M. (2011).** Out-of-hospital airway management in the United States. *Resuscitation*, 82(4), 378-385.
- Wang, J., Hu, M., Wang, J., Qi, J., Han, Z., Wang, G., et al. (2019).** Reconstitution and structure of a plant NLR resistosome conferring immunity. *Science*, 364(6435), eaav5870.
- Wang, J., Wang, J., Hu, M., Wu, S., Qi, J., Wang, G., et al. (2019).** Ligand-triggered allosteric ADP release primes a plant NLR complex. *Science*, 364(6435), eaav5868.
- Wang, M., Weiberg, A., Dellota Jr, E., Yamane, D., & Jin, H. (2017).** Botrytis small RNA Bc-siR37 suppresses plant defense genes by cross-kingdom RNAi. *RNA biology*, 14(4), 421-428.
- Wang, M., Weiberg, A., Lin, F. M., Thomma, B. P., Huang, H. D., & Jin, H. (2016).** Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature plants*, 2(10), 1-10.
- Wawra, S., Trusch, F., Matena, A., Apostolakis, K., Linne, U., Zhukov, I., et al. (2017).** The RxLR motif of the host targeting effector AVR3a of *Phytophthora infestans* is cleaved before secretion. *The Plant Cell*, 29(6), 1184-1195.
- Wei, H. L., Chakravarthy, S., Mathieu, J., Helmann, T. C., Stodghill, P., Swingle, B., et al. (2015).** *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 type III secretion effector polymutants reveal an interplay between HopAD1 and AvrPtoB. *Cell host & microbe*, 17(6), 752-762.
- Weiberg, A., Wang, M., Lin, F. M., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., et al. (2013).** Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science*, 342(6154), 118-123.
- West, J. S., Kharbanda, P. D., Barbetti, M. J., & Fitt, B. D. (2001).** Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant pathology*, 50(1), 10-27.
- Whisson, S. C., Boevink, P. C., Moleleki, L., Avrova, A. O., Morales, J. G., Gilroy, E. M., et al. (2007).** A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature*, 450(7166), 115-118.
- Wicker, T., Oberhaensli, S., Parlange, F., Buchmann, J. P., Shatalina, M., Roffler, S., et al. (2013).** The wheat powdery mildew genome shows the unique evolution of an obligate biotroph. *Nature genetics*, 45(9), 1092-1096.

- Win, J., Krasileva, K. V., Kamoun, S., Shirasu, K., Staskawicz, B. J., & Banfield, M. J. (2012).** Sequence divergent RXLR effectors share a structural fold conserved across plant pathogenic oomycete species. *PLoS pathogens*, 8(1), e1002400.
- Wirthmueller, L., Maqbool, A., & Banfield, M. J. (2013).** On the front line: structural insights into plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 761-776.
- Wu, C. H., Abd-El-Haliem, A., Bozkurt, T. O., Belhaj, K., Terauchi, R., Vossen, J. H., & Kamoun, S. (2017).** NLR network mediates immunity to diverse plant pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(30), 8113-8118.
- Wu, J., Lin, L., Xu, M., Chen, P., Liu, D., Sun, Q., et al. (2018).** Homoeolog expression bias and expression level dominance in resynthesized allopolyploid *Brassica napus*. *BMC genomics*, 19(1), 1-13.
- Xiang Neik, T., Ghanbarnia, K., Ollivier, B., Scheben, A., Severn-Ellis, A., Larkan, N. J., ... & Balesdent, M. H. (2022).** Two independent approaches converge to the cloning of a new *Leptosphaeria maculans* avirulence effector gene, AvrLmS-Lep2. *Molecular plant pathology*, 23(5), 733-748.
- Xu, G., Zhong, X., Shi, Y., Liu, Z., Jiang, N., Liu, J., ... & Wang, X. (2020).** A fungal effector targets a heat shock–dynamain protein complex to modulate mitochondrial dynamics and reduce plant immunity. *Science advances*, 6(48), eabb7719.
- Xu, Q., Tang, C., Wang, X., Sun, S., Zhao, J., Kang, Z., & Wang, X. (2019).** An effector protein of the wheat stripe rust fungus targets chloroplasts and suppresses chloroplast function. *Nature communications*, 10(1), 1-13.
- Yan, J., Yu, H., Li, B., Fan, A., Melkonian, J., Wang, X., et al. (2019).** Cell autonomous and non-autonomous functions of plant intracellular immune receptors in stomatal defense and apoplastic defense. *PLoS pathogens*, 15(10), e1008094.
- Yang, J., & Zhang, Y. (2015).** Protein structure and function prediction using I-TASSER. *Current protocols in bioinformatics*, 52(1), 5-8.
- Yarwood, C. E. (1970).** Man-Made Plant Diseases: Some agricultural operations necessary for efficient crop production favor many plant diseases and create new ones. *Science*, 168(3928), 218-220.
- Yoshida, K., Saitoh, H., Fujisawa, S., Kanzaki, H., Matsumura, H., Yoshida, K., et al. (2009).** Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Cell*, 21(5), 1573-1591.
- Yoshino, K., Irieda, H., Sugimoto, F., Yoshioka, H., Okuno, T., & Takano, Y. (2012).** Cell death of *Nicotiana benthamiana* is induced by secreted protein NIS1 of *Colletotrichum orbiculare* and is suppressed by a homologue of CgDN3. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(5), 625-636.
- Yu, D. S., Outram, M. A., Crean, E., Smith, A., Sung, Y. C., Darma, R., et al. (2022).** Optimized Production of Disulfide-Bonded Fungal Effectors in *Escherichia coli* Using CyDisCo and FunCyDisCo Coexpression Approaches. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 35(2), 109-118.
- Zaccaron, A. Z., Chen, L. H., Samaras, A., & Stergiopoulos, I. (2022).** A chromosome-scale genome assembly of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* reveals a compartmentalized genome architecture and the presence of a dispensable chromosome. *Microbial Genomics*, 8(4), 000819.