



HAL
open science

Analyses évolutive et moléculaire des déterminants génétiques impliqués dans l'interaction entre l'agent de la rouille du peuplier et son hôte

Clémentine Louet

► **To cite this version:**

Clémentine Louet. Analyses évolutive et moléculaire des déterminants génétiques impliqués dans l'interaction entre l'agent de la rouille du peuplier et son hôte. *Phytopathologie et phytopharmacie*. Université de Lorraine, 2021. Français. NNT : 2021LORR0264 . tel-03683887

HAL Id: tel-03683887

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03683887v1>

Submitted on 18 Oct 2022

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Université de Lorraine, Collegium Sciences et Techniques
Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources Naturelles

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

spécialité Biologie végétale et forestière par

Clémentine Louet

**Analyses évolutive et moléculaire des déterminants génétiques
impliqués dans l'interaction entre l'agent de la rouille du peuplier et
son hôte**

Soutenance le 17 décembre 2021

Membres du jury

Isabelle FUDAL	Directrice de recherche, INRAE, Thiverval-Grignon, France	Présidente de jury
Laurence GODIARD	Chargée de recherche, INRAE, Toulouse, France	Rapporteuse
Daniel CROLL	Professeur assistant Université de Neuchâtel, Neuchâtel, Suisse	Rapporteur
Pascal FREY	Directeur de recherche, INRAE, Université de Lorraine, Nancy, France	Directeur de thèse
Sébastien DUPLESSIS	Directeur de recherche, INRAE, Université de Lorraine, Nancy, France	Co-Directeur de thèse

Membres invités

Fabien HALKETT	Chargé de recherche INRAE, Université de Lorraine, Nancy, France	Co-encadrant
Benjamin PETRE	Maître de Conférences, Université de Lorraine, Nancy, France	Co-encadrant

Remerciements

Trois ans auparavant presque jour pour jour, je demandais à mes futurs directeurs de thèse s'ils envisageaient ce projet doctoral comme quelque chose de collaboratif, où chaque point de vue serait pris en considération. Quelle idée naïve j'avais de la recherche à cette époque... Par la suite, je suis arrivée dans cette région du grand-est peuplée d'irréductible lorrains résistant encore et toujours à l'envahisseur de la langue française, dans cette région qui clenche des portes ou encore qui nous donne rendez-vous entre midi sans jamais nous donner un horaire de fin. Me voilà trois ans plus tard, un manuscrit sur les bras et avec la pensée que finalement cette région unique en son genre n'est pas si mal ! Je me rends compte, en effectuant cette dernière tâche (et pas des moindres) qui est l'écriture des remerciements, que je suis très reconnaissante pour ces années passées. Je suis pleinement consciente que j'ai eu énormément de chance de croiser le chemin de toutes ces personnes qui m'ont aidée, développée et enrichie sur le plan scientifique mais surtout sur le plan humain. Ainsi, même si le travail m'a passionnée, je mesure la réussite de ces années principalement à travers les relations que j'ai pu créer.

Je tiens par avance à préciser qu'exprimer mon affection de manière publique est un exercice particulièrement difficile. Il faut donc partir du principe que chaque terme que je pourrais écrire par la suite aura en réalité dans ma pensée une intensité multipliée par dix (minimum).

Je remercie tout d'abord les membres de mon jury de thèse **Isabelle Fudal**, **Laurence Godiard** et **Daniel Croll** pour le temps qu'ils ont accordé à l'évaluation de mon travail et pour avoir tourné les quelques 200 pages qui suivent celle-ci.

Je remercie également les membres de mes comités de suivi **Benjamin Petre**, **Lilian Gout**, **Didier Tharreau** et **Isabelle Fudal** qui m'ont aidée de manière très bienveillante tout au long de cette thèse.

Je tiens par ailleurs à exprimer ma plus profonde gratitude envers mes directeurs de thèse, **Pascal Frey** et **Sébastien Duplessis**. Dans cette même idée, je souhaite également rattacher mes remerciements à **Fabien Halkett** qui, même s'il ne l'avoue pas, a participé à mon encadrement aussi intensément que mes directeurs de thèse. Vous m'avez tous les trois supportée et vous m'avez suivie avec attention tout au long de cette thèse. Votre expérience, votre encadrement et votre confiance m'ont été essentiels. Je souhaite également vous remercier pour votre disponibilité et votre simplicité qui nous ont toujours permis d'échanger librement sur la science mais également tout le reste. Pascal, merci pour ton incroyable patience et pour ton enthousiasme débordant pour la phytopathologie. Tu as un savoir inépuisable à transmettre, merci de l'avoir fait avec moi j'ai tellement appris en t'écoutant. Sébastien, je t'aurais bien mis des petits chats mignons mais à la place je préfère exprimer la profonde reconnaissance que j'ai pour toi et pour ton soutien scientifique mais également, et surtout, humain. Tu es également une personne très impliquée et tu impliqués toujours les personnes autour de toi dans des opportunités toutes les plus précieuses les unes que les autres. Fabien, je te remercie énormément pour tout ce que tu as fait pour moi. Ne dévalorise plus l'implication que tu as eue. Je te remercie également pour ton indulgence envers mon ignorance en génétique (quel choc des cultures parfois !). Une nouvelle fois un grand merci à vous trois.

Je souhaiterais également commencer par remercier tous les membres de l'équipe « patho » car c'est avec vous que j'ai commencé cette aventure :

Axelle, je pourrais te remercier pour tellement de choses qu'il va m'être difficile d'en faire la liste. Je vais donc essentiellement te remercier pour ce que tu es car je pense que c'est le plus important. Tu

m'as soutenue et écoutée. Tu as été incroyablement présente pour moi et nos échanges ont été très importants. Merci à toi vraiment.

Bénédicte, merci pour ton enthousiasme et ton énergie communicative ! J'ai adoré travailler et échanger avec toi. Je souhaiterais également te remercier pour l'aide que tu m'auras apportée ces derniers mois. Tu as été décisive et, même si le résultat n'est pas là, tu m'auras soutenue comme personne n'aurait pu le faire.

Jérémy, je te remercie pour m'avoir tout de suite intégrée. Je te remercie également pour ton incroyable connaissance de la région, de son histoire et surtout pour tes recherches ardues sur la très précieuse ville que tu aimes tant : Metz. Tu es un guide touristique toujours objectif ce qui nous a permis d'avoir des discussions très animées et tellement drôles. Merci à toi !

Je souhaite également remercier la paire **Stéphane** et **Antoine** qui forment un duo de choc. Merci à vous deux pour les quelques mois que j'ai pu partager en votre compagnie.

Merci également à **Anaïs, Claude, Christophe, Elodie, Manon** et **Olivier**.

Merci à **Benoit** pour son aide pour les statistiques.

Enfin, un GRAND merci également à **Simon** et **Méline** qui ont eu le courage de me supporter dans leur bureau ! Finalement, on se sera retrouvé que très rarement tous les trois mais c'était quand même bien sympa !

Une petite mention spéciale à **Méline** avec qui j'ai partagé mes trois ans de thèse. Un énorme merci pour m'avoir écouté râler encore et encore, et pour avoir eu la patience de m'en apprendre un peu plus sur ce monde de la modélisation et de la génétique (ce n'était clairement pas gagné ...). Je te remercie surtout pour ta bonne humeur, pour toutes ces discussions que l'on a partagées et évidemment pour ces verres que l'on a échangés ! Je suis très heureuse d'avoir croisé ta route ainsi que celle d'**Antoine** (même s'il a pris un malin plaisir à me chambrer !).

Je remercie tous les membres de l'équipe écogénomique :

Merci à **Nicole, Noémie** et **Marie-Claude**, vous êtes toujours là pour nous logistiquement et heureusement car nous serions perdus sans vous.

Je remercie également **Claire, Laure** et **Christine** que j'ai harcelées plus d'une fois pour des manips et qui ont toujours été bienveillantes à mon égard.

Merci également à **Aurélie, Marc, Annegret** et bien sûr merci à mes chers compagnons de thèse **Félix** et **Laura** !

Je remercie également **Cécile** que j'ai alpaguée pour les TE sans qu'elle n'ait rien demandé !

Enfin, je souhaiterais remercier particulièrement **Stéphane** pour l'attention particulière qu'il m'a prêtée. Je te remercie pour ces discussions qui m'auront permis de prendre du recul ainsi que pour le soutien et la bienveillance que tu as eu à mon égard.

Je remercie tous les membres de l'équipe redox qui auront accueilli l'invasisseur campussien :

Je commence évidemment cette partie de remerciements par **Benjamin** qui, un peu du jour au lendemain, s'est retrouvé avec une doctorante dans les pattes. Les superlatifs me manqueront pour exprimer ma gratitude. Je te remercie énormément pour l'encadrement exceptionnel et tellement enrichissant que tu m'as accordé. Tu as pris énormément de temps pour m'apprendre aussi bien sur

le plan scientifique que technique et méthodologique. C'était finalement court mais très déterminant dans ma manière de travailler. Tu auras eu la patience de m'expliquer chaque chose (et il en fallait quelles lacunes j'avais...) et surtout merci pour ces opportunités que tu m'as accordées. Je te remercie vraiment grandement pour m'avoir permise de travailler avec toi.

Je souhaite également remercier **Nicolas** et **Mélanie** pour m'avoir accueillie dans l'équipe.

Merci également à **Arnaud, Jérémy, Rodnay, Tiphaine, Raphaël, Marie-Laure, Linda** et **Jean-Michel** pour toutes les discussions que nous avons partagées.

Je remercie également **Muriel** avec qui j'ai adoré parler !

Merci à toutes ces personnes qui ont croisé mon chemin : **Anna, Jonathan, Elodie, Loïck, Kevin**, et **Marion**. Petite mention spéciale pour **Delphine** qui m'aura fait relativiser sur ce que l'on appelle la malchance et les concours de circonstances. Allez courage le scheitan te libérera un jour !

Evidemment je ne pouvais pas faire ces remerciements sans évoquer l'incroyable affection que j'ai pour **Julie** (la plus belle), **Damien** (bobofe pour les intimes) et **Flavien** (le soutien indéfectible). Sacrée équipe, sacré charisme et sacrés délires. Je vous remercie tellement pour toutes les choses que j'ai pu partager avec vous. Grâce à vous je peux dire que j'ai roulé ma bosse en biochimie et ce n'était pas gagné ! Les goûters me manqueront et surtout toutes ces extraordinaires discussions, toujours scientifiques bien sûr ! Je n'aurais pas pu rêver mieux pour partager cette dernière année de thèse. Petite mention pour Flavien qui, malgré, lui, se sera retrouvé embarqué dans une histoire bien pourrie. Le prix Nobel n'était pas loin mais bon comme tu sais quelle sacrée ****. Merci à vous profondément.

Je remercie également **David Cohen** de l'UMR Silva qui plus d'une fois m'a « sauvée » la vie grâce à son aide et à ses précieuses connaissances.

J'aimerais remercier les étudiants que j'ai pu co-encadrer :

Merci à **Théo** et surtout **Carla** et **Pamela** qui m'auront fait confiance et que je remercie pour leur efficacité, leur curiosité et leur bonne humeur. C'était un plaisir.

Pour finir, je remercie tout particulièrement les personnes suivantes :

Evidemment, je remercie **mes amis** et toute **ma famille** qui m'auront toujours soutenue, encouragée et sans qui je n'aurais pas pu faire un millième de ce projet. Je remercie également ma famille pour n'avoir pas trop râlé pour les quelques déménagements (ça va ce n'est que huit heures de route aller-retour) et aussi pour ces multitudes de fois où vous avez eu le courage de me relire sans jamais trop comprendre ce dont je parlais. Vous m'avez permis de passer cette thèse le plus sereinement possible mais bon vous le savez je suis déjà très détendue de nature !

Je remercie également la **deuxième famille** que je partage depuis quelques années qui sans trop le vouloir s'est retrouvée embarquée dans toute cette aventure. Merci à vous énormément pour toute votre aide et votre soutien.

Enfin, **Maxime**, je te remercie pour avoir accepté de me suivre dans le « grand nord » sans trop rechigner. Merci pour tout, toi et pour la patience dont tu as fait preuve.

Merci à vous tous.

Clémentine

Table des matières

CHAPITRE I – Contexte bibliographique et objectifs de la thèse	1
1. Les interactions plantes – pathogènes	3
1.1. L’impact des épidémies sur les systèmes culturaux	3
1.2. Les modes de vie des agents phytopathogènes et les modes d’interaction associés	3
2. L’immunité végétale d’un point de vue moléculaire	7
2.1. L’immunité de surface des plantes	7
2.2. L’immunité intracellulaire déclenchée par les effecteurs	9
2.2.1. Les gènes de résistance codant des récepteurs intracellulaires	11
2.2.2. Les modèles de reconnaissance des effecteurs	11
2.3. Le contournement des défenses <i>via</i> les effecteurs	14
2.3.1. Mode d’action et cibles des effecteurs protéiques	14
2.3.2. Entrée des effecteurs dans les cellules de l’hôte	15
2.3.3. Définition de répertoires d’effecteurs candidats	18
2.4. Les mécanismes évolutifs conduisant à la virulence	21
2.4.1. Les mécanismes génétiques sous-jacent à cette évolution	21
2.4.2. Les mécanismes moléculaires responsables de l’évolution	23
3. Article n°1 – Etude des effecteurs des agents phytopathogènes au cours des 20 dernières années	26
4. Les Pucciniales : état de l’art des connaissances	54
4.1. Les rouilles : symptômes et conséquences	54
4.2. Des cycles de vie complexes	55
4.3. Identification des effecteurs chez les agents de la rouille	57
5. Le pathosystème peuplier / <i>Melampsora larici-populina</i>	59
5.1. Le peuplier : un arbre d’intérêt agronomique	59
5.2. <i>Melampsora larici-populina</i> : le principal agent pathogène des peupleraies européennes	60
5.3. Sélection variétale et lutte contre la rouille du peuplier : zoom sur le contournement de la résistance RMIp7	62
6. Contexte et objectifs de la thèse	66
CHAPITRE II – Caractérisation et analyse évolutive du gène d’avirulence candidat <i>AvrMlp7</i>	69
1. Contexte	71

2. Article n°2 – A point mutation and large deletion at the candidate avirulence locus <i>AvrMlp7</i> in the poplar rust fungus correlate with poplar R _{Mlp7} resistance breakdown -----	72
3. Résultats complémentaires -----	110
3.1. La délétion spécifique d'éléments transposables dans le chromosome 15 est associée à la délétion au locus candidat <i>AvrMlp7</i> -----	110
3.1.1. Contexte -----	110
3.1.2. Matériels et Méthodes -----	111
3.1.3. Résultats -----	111
3.2. Une mutation aléatoire aux UV a permis de recréer un génotype et un phénotype virulent à partir d'un individu avirulent-----	114
3.2.1. Contexte -----	114
3.2.2. Matériels et Méthodes -----	115
3.2.3. Résultats -----	117
4. Discussion-----	119

CHAPITRE III – Analyses fonctionnelles du gène d'avirulence candidat *AvrMlp7*

-----	123
1. Contexte-----	125
2. Travaux portant sur la caractérisation de l'activité de virulence-----	126
3. Démarche engagée visant à obtenir une protéine <i>AvrMlp7</i> recombinante -----	133
4. Travaux réalisés pour l'analyse du caractère d'avirulence-----	135
4.1. Contribution à la conception d'un protocole de transformation transitoire du peuplier 135	
4.2. Contribution à la mise en place d'un protocole d'induction de résistance chez le peuplier 137	
5. Discussion-----	140
6. Matériels et méthodes -----	142
6.1. Matériel biologique-----	142
6.2. Construction des plasmides-----	142
6.3. Microscopie confocale à balayage laser -----	143
6.4. Extraction des protéines, immunoprécipitation et Western Blot -----	144
6.5. Expression hétérologue et purification -----	144
6.6. Biolistique -----	148
6.7. Infiltration des tissus foliaires de peuplier -----	149

CHAPITRE IV – Analyse comparative de facteurs de transcription orchestrant le cycle de vie des Pucciniales -----	151
1. Contexte-----	153
2. Article n°3 – Expert annotation and life-cycle transcriptomics of transcription factors in rust fungi (Pucciniales) highlight the role of cold shock proteins in dormancy exit-----	155
3. Résultats complémentaires : Article n°4 – A comprehensive collection of transcriptome data to support life cycle analysis of the poplar rust fungus <i>Melampsora larici-populina</i> -----	177
CHAPITRE V – Discussion générale -----	183
1. L’interaction peuplier-rouille du peuplier : questions et stratégies de recherche dans l’UMR 1136 IAM -----	185
2. Pouvoir remonter dans le temps pour mieux comprendre les scénarios de contournement : cas de la résistance RMIp7 -----	187
2.1. Un bouleversement populationnel en lien avec un locus unique soumis à sélection ---	187
2.2. Préciser les scénarios d’évolution des interactions -----	191
3. Etudier l’histoire évolutive des populations de la rouille du peuplier : élargir le prisme des précédentes études de sélection -----	193
4. Les effecteurs chloroplastiques chez les agents pathogènes filamenteux-----	195
5. Comprendre les processus infectieux des champignons pathogènes en étudiant leur mode de vie	203
6. Contourner les limites des pathosystèmes non-modèles pour mieux comprendre leur biologie	205
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -----	207
ANNEXES -----	227
BILAN DES ACTIVITÉS DOCTORALES -----	232

Liste des figures

Figure 1. Exemples d'épidémies majeures et symptômes causés par les agents pathogènes de plantes entre 1840 et 2020. -----	4
Figure 2. Les interactions plante-pathogène sont graduelles et modulées par divers facteurs exogènes. -----	6
Figure 3. Le modèle en zig-zag illustre le système immunitaire des plantes selon plusieurs phases. ---	8
Figure 4. L'immunité végétale peut être définie selon le niveau de détection au niveau cellulaire chez l'hôte. -----	10
Figure 5. Les récepteurs immunitaires peuvent détecter les effecteurs d'agents pathogènes par différents mécanismes. -----	13
Figure 6. Les agents pathogènes filamenteux et les bactéries utilisent différents systèmes de translocation pour manipuler les cellules de l'hôte via les effecteurs. -----	16
Figure 7. Domaines N-terminaux des effecteurs de champignons et d'oomycètes impliqués dans leur sécrétion et leur translocation dans la cellule végétale. -----	18
Figure 8. La course aux armements et la guerre des tranchées sont des scénarios démographiques expliquant l'évolution des interactions hôte-pathogène. -----	22
Figure 9. Trois forces évolutives majeures sont impliquées dans le contournement des résistances. 23	
Figure 10. Différents mécanismes sont responsables de l'évolution rapide des agents pathogènes conduisant à la virulence. -----	25
Figure 11. Les agents de la rouille induisent de spectaculaires phénotypes d'infection sur l'hôte. ----	54
Figure 12. Les Pucciniales possèdent des cycles de vie complexes. -----	56
Figure 14. Les épidémies successives de <i>Melampsora larici-populina</i> peuvent conduire, à terme, à des dépérissements des arbres infectés. -----	59
Figure 13. Les peupleraies ont subi de profonds remaniements notamment liés à <i>Melampsora larici-populina</i> . -----	60
Figure 15. <i>Melampsora larici-populina</i> possède l'un des cycles de vie les plus complexes du règne fongique. -----	62
Figure 16. Les populations françaises de <i>Melampsora larici-populina</i> ont été fortement impactées au niveau de leur structure génétique suite au contournement de la résistance RMIp7. -----	64
Figure 17. Un seul locus putatif lié au contournement de la résistance RMIp7 a été mis en évidence sur le chromosome 15 de <i>Melampsora larici-populina</i> . -----	65
Figure 19. Sans les éléments transposables ms23218 et ms23250 sur le chromosome 15 le clivage n'est plus distinguable entre les isolats porteurs ou non de la délétion au locus candidat <i>AvrMIp7</i> . -----	113
Figure 18. Deux éléments transposables sur le chromosome 15 semblent expliquer le clivage entre les individus porteurs ou non de la délétion au locus candidat <i>AvrMIp7</i> . -----	114
Figure 20. Résumé des étapes de production et de criblage des mutants UV de <i>Melampsora larici-populina</i> ayant acquis la virulence envers la résistance RMIp7. -----	116

Figure 21. L'irradiation excessive aux UV sur des urédiniospores de <i>Melampsora larici-populina</i> a un effet létal.-----	118
Figure 22. Vue d'ensemble du processus expérimental pour déterminer la localisation subcellulaire de la protéine candidate AvrMlp7. -----	127
Figure 23. Les protéines AvrMlp7 fusionnées à des protéines fluorescentes en position C-terminale s'accumulent au niveau des chloroplastes, sous la forme native et mutée. -----	128
Figure 24. Les protéines AvrMlp7 fusionnées à des protéines fluorescentes en position N-terminale s'accumulent au niveau des noyaux et du cytosol, sous la forme native et mutée. -----	131
Figure 25. Les protéines candidates AvrMlp7 sont spécifiquement clivées dans les chloroplastes. -	132
Figure 26. Vue d'ensemble du processus expérimental utilisé pour tenter de produire et de purifier la protéine candidate AvrMlp7 en utilisant <i>Escherichia coli</i> .-----	134
Figure 27. Vue d'ensemble du protocole de transformation par biolistique des feuilles de tabac, de peupliers cultivés et des cellules transformées associées. -----	136
Figure 28. Hypothèses d'interactions moléculaires entre le peuplier et <i>Melampsora larici-populina</i> dans le contexte de la résistante RMlp7 et de l'avirulence AvrMlp7. -----	139
Figure 29. Le projet peuplier-rouille du peuplier : un projet d'interface de l'UMR 1136 IAM entre les différentes équipes composant l'UMR et formant un continuum de disciplines de recherche. -----	185
Figure 30. Dix années de travaux de recherche doctorale en génétique et génomique des populations qui alimentent les connaissances sur les capacités de contournement des gènes de résistance par <i>Melampsora larici-populina</i> . -----	188
Figure 31. Deux variations conjointes au locus candidat <i>AvrMlp7</i> chez <i>Melampsora larici-populina</i> sont en corrélation avec le remplacement génétique et l'émergence des individus virulents a7.-----	189
Figure 32. Le nombre de publications relatives aux effecteurs chloroplastiques augmente de façon exponentielle au cours du temps. -----	195
Figure 33. De nombreux effecteurs des agents pathogènes filamenteux s'accumulent dans les chloroplastes.-----	197
Figure 34. Durant l'infection, les chloroplastes s'accumulent autour des haustoria de <i>Phytophthora infestans</i> via la formation de stromules durant l'infection. -----	198

Liste des tableaux

Tableau 1. Isolats utilisés dans cette étude. -----	111
Tableau 2. Amorces utilisées dans cette étude.-----	145
Tableau 3. Séquences codantes des protéines fusionnées utilisées dans cette étude. -----	146
Tableau 4. Effecteurs des agents pathogènes filamenteux prédits comme étant chloroplastiques en système hétérologue et investigation sur la présence d'un peptide de transit. -----	199

Chapitre I – Contexte bibliographique et objectifs de la thèse

1. Les interactions plantes – pathogènes

1.1. L'impact des épidémies sur les systèmes cultureux

Le développement et l'amélioration de l'agriculture sont des enjeux cruciaux pour l'Homme. Dans ce contexte, la question phytosanitaire est une préoccupation ancienne et une nécessité moderne (Lannou et al. 2021). En effet, les problèmes phytosanitaires seraient certainement apparus avec l'agriculture dès le néolithiques (Stukenbrock et al. 2007). L'optimisation des systèmes agricoles améliore la productivité mais également la vulnérabilité face aux ravageurs et aux agents pathogènes des cultures. Cette vulnérabilité est notamment renforcée par des pratiques agricoles telles que les monocultures, la sélection intensive, le travail du sol, et la fertilisation (Yarwood 1970; Stukenbrock and McDonald 2008). Comme conséquences, les pertes mondiales liées aux maladies des plantes sont estimées entre 11 et 30% de la production (Oerke 2006; Savary et al. 2019). Bien que des pertes de production puissent être causées par des conditions externes à la plante (par exemple, des carences nutritionnelles ou des intempéries), la majorité des pertes en agriculture est causée par des agents pathogènes (champignons, oomycètes, bactéries, virus et nématodes), des plantes parasites et des insectes ravageurs. Les agents pathogènes ont induit des maladies emblématiques (Figure 1) telles que le mildiou de la pomme de terre provoqué par l'oomycète parasite *Phytophthora infestans*, qui a complètement détruit les récoltes en Irlande entre 1845 et 1852 causant la dernière famine en Europe (Fry 2008).

1.2. Les modes de vie des agents phytopathogènes et les modes d'interaction associés

Par définition, les microorganismes pathogènes provoquent l'apparition de symptômes plus ou moins sévères associés au développement de diverses maladies. Bien que ces organismes soient phylogénétiquement très diversifiés, ils peuvent être classifiés en fonction de leur stratégie d'infection. Ces agents pathogènes végétaux sont ainsi regroupés en trois classes trophiques. Les organismes biotrophes se nourrissent de nutriments détournés de tissus végétaux vivants sans entraîner de mort cellulaire directe. Cette interaction relève souvent d'une longue coévolution au cours de laquelle le parasite s'est adapté à une gamme restreinte d'hôtes. Les biotrophes s'opposent directement aux nécrotrophes, qui tuent les cellules de l'hôte (notamment par la sécrétion de toxines) et prolifèrent grâce aux nutriments ainsi libérés. Ils présentent généralement une large gamme d'hôtes du fait de la généralité des mécanismes mis en œuvre. Enfin, il convient d'ajouter une catégorie intermédiaire, les

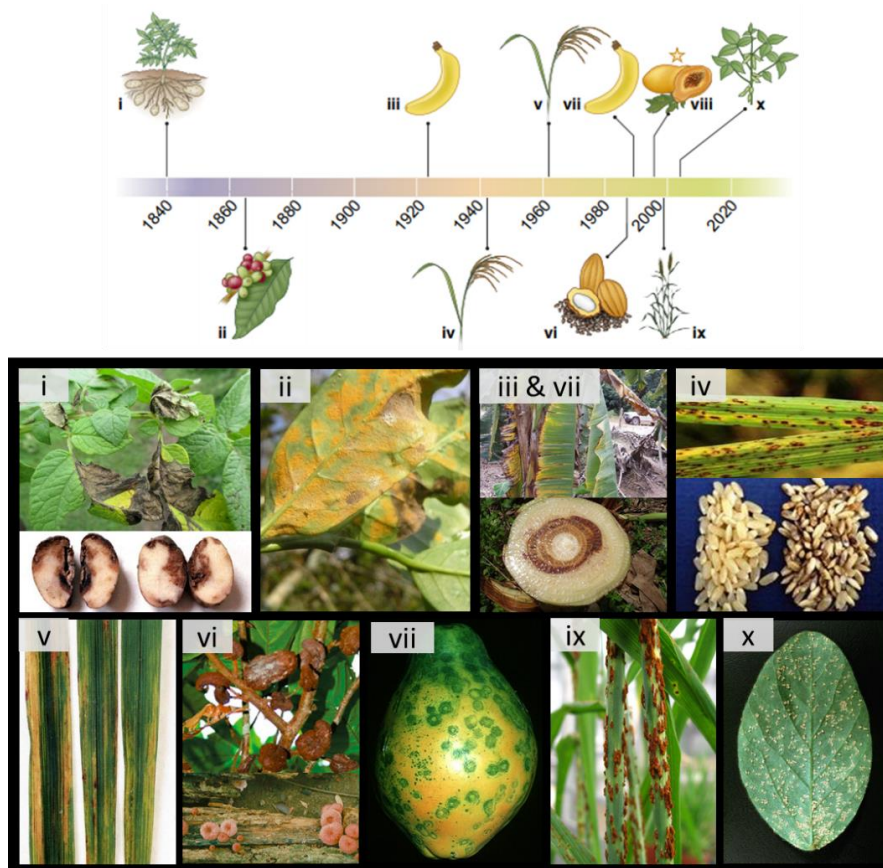


Figure 1. Exemples d'épidémies majeures et symptômes causés par les agents pathogènes de plantes entre 1840 et 2020.

Les exemples choisis d'épidémies majeures, entre 1840 et 2020, sont organisées de manière chronologique et les symptômes associés sont représentés. (i) L'oomycète *Phytophthora infestans*, responsable du mildiou de la pomme de terre, provoqua la famine irlandaise, responsable d'un million de morts. (ii) Le champignon responsable de la rouille du caféier, *Hemileia vastatrix*, anéantit la production de café au Sri Lanka, influençant les Britanniques à boire du thé. (iii) Le champignon pathogène vasculaire *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, causant le flétrissement du bananier (appelé aussi maladie de Panama), causa le quasi-abandon de la variété Gros Michel ; la variété Cavendish résistante fut alors adoptée. (iv) Le champignon *Cochliobolus miyabeanus*, responsable de la maladie des taches brunes du riz, fut l'un des facteurs de la grande famine du Bengale, entraînant indirectement la mort de deux millions de personnes. (v) La bactérie *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, responsable de brûlures bactériennes sur les feuilles de riz, provoqua des pertes de rendement pouvant atteindre 80%. (vi) Le champignon *Moniliophthora perniciosa* entraîna des pertes allant jusqu'à 75% de la production annuelle de cacao au Brésil. (vii) Un nouveau génotype de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (nommé TR4) provoquant le flétrissement du bananier fut identifié et menaça la nouvelle variété Cavendish. (viii) Le virus des taches en anneaux du papayer (ou PRSV, acronyme de *Papaya ringspot virus*) dévasta l'industrie de la papaye à Hawaï ; une variété génétiquement modifiée qui résiste à l'infection fut alors introduite. (ix) Un nouveau génotype du champignon responsable de la rouille noire du blé, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (Ug99), se répandit en Afrique et au Moyen-Orient, menaçant l'approvisionnement mondial en blé. (x) Le champignon, *Phakopsora pachyrhizi*, responsable de la rouille du soja, toucha le Brésil et coûta aux cultivateurs deux milliards de dollars par an en dommages et en mesures de lutte. Modifié à partir des principales épidémies selon [van Esse et al. 2020](https://www.ipmimages.org/). Sources des photographies : <https://www.ipmimages.org/> ; <https://mycocosm.jgi.doe.gov/> ; <https://www.naturepl.com/blog/> ; Lisboa et al. 2020.

organismes hémibiotrophes. Ces organismes possèdent un style de vie qui comprend des phases biotrophes et des phases nécrotrophes, conditionnées par l'environnement dans lequel ils se trouvent, ou le stade de leur cycle de vie.

Les interactions plantes-pathogènes sont également groupées en deux grandes catégories : l'interaction « non-hôte » et l'interaction « hôte ». L'interaction dite non-hôte est la forme la plus commune chez les plantes. Elle désigne une incompatibilité fondamentale entre un couple « espèce végétale/agent pathogène » donné (c'est-à-dire la plante n'est pas un hôte et le pathogène ne peut l'infecter) (Nürnberger and Lipka 2005). Cette incompatibilité peut être expliquée par de multiples phénomènes (Figure 2) comme tout simplement une incompatibilité temporelle (par exemple, les conditions environnementales ou le stade de développement de l'hôte et/ou du pathogène) (Panstruga and Moscou 2020). De plus, cette interaction non-hôte n'est pas obligatoirement stable dans le temps car il est devenu évident que les agents pathogènes ont la capacité d'évoluer pour notamment étendre leur gamme d'hôtes (le nombre d'hôtes qu'ils sont capable d'infecter) et de faire un « saut d'hôte » (l'agent pathogène est capable d'infecter et de réaliser son cycle de vie sur une nouvelle espèce végétale) (Raffaele and Kamoun 2012; de Vries et al. 2020). Ces phénomènes semblent peu fréquents à l'échelle de l'histoire mais un certain nombre d'études ont signalé de tels événements (Morris and Moury 2019; Thines 2019), dont des épisodes contemporains en Europe (par exemple, l'agent fongique de la chalarose du frêne et la bactérie phytopathogène du genre *Xylella* ; Gross et al. 2014; Sicard et al. 2018). Des cas d'évolution par saut d'hôte ont également eu lieu de manière presque concomitante avec la culture de plantes nouvellement domestiquées comme pour la pyriculariose du riz ou l'agent responsable du mildiou de la pomme de terre (Stukenbrock and McDonald 2008). Au fur et à mesure de ces diverses évolutions, l'agent pathogène devient capable d'infecter un nouvel hôte conduisant cette fois-ci à une interaction dite hôte. Cette interaction désigne le fait que certains biotypes du pathogène et de la plante soient capables d'interagir et de former des interactions dites « incompatibles » ou « compatibles ». L'interaction est qualifiée d'incompatible lorsque la plante porte une résistance totale (appelée aussi qualitative) vis-à-vis d'un biotype particulier du pathogène (le pathogène est alors désigné comme avirulent). A l'inverse, lorsque l'infection par un agent pathogène aboutit au développement de symptômes de maladie, l'interaction est dite compatible. La plante est sensible en absence de résistance efficace ou tolérante dès lors qu'elle présente une résistance partielle (appelée aussi quantitative) face à un agent pathogène dit cette fois-ci virulent.

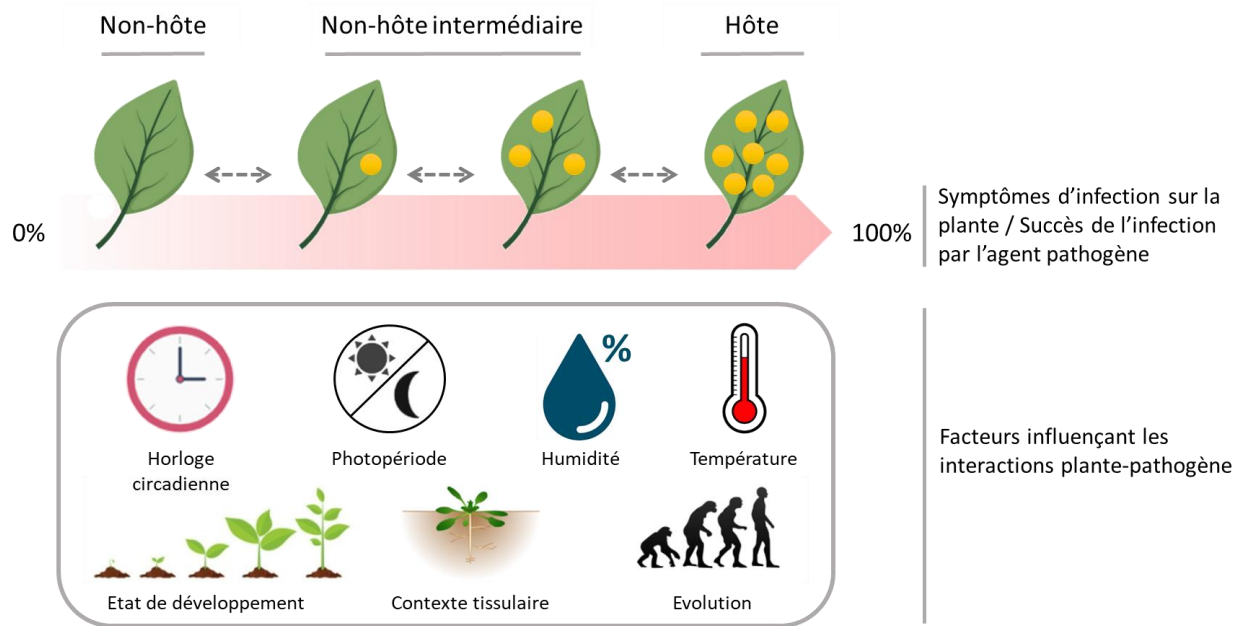


Figure 2. Les interactions plante-pathogène sont graduelles et modulées par divers facteurs exogènes.

Il existe un continuum des interactions non-hôtes jusqu'aux interactions entre ou au sein des espèces végétales. La colonisation de l'agent pathogène est représentée par les tâches jaunes sur les feuilles. Plusieurs facteurs influencent ce continuum (horloge circadienne, photopériode, humidité, température, état de développement, contexte tissulaire et évolution) et ils peuvent conditionner le passage d'un état à un autre, comme l'indiquent les flèches grises. Modifié à partir de [Panstruga and Moscou 2020](#).

2. L'immunité végétale d'un point de vue moléculaire

Les ravages causés par les agents pathogènes et les conséquences associées sur les cultures ont contribué à une importante prise de conscience et à l'avènement de la phytopathologie moléculaire. Ce champ disciplinaire des sciences est principalement centré sur la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents aux interactions plantes-microorganismes afin d'améliorer les méthodes de protection des plantes. Près d'un demi-siècle après l'émergence du concept de gènes de résistance qualitative aux parasites chez les plantes (Flor, 1971 ; cf. [Chapitre I partie 2.2](#)), les premiers gènes de résistance ont pu être caractérisés (Dangl et al. 2013). Enfin, depuis les années 2000, la « révolution » génomique a été rendue possible par le développement d'outils de séquençage de nouvelle génération et d'analyses bio-informatiques. Celle-ci a révélé une complexité et une diversité inattendue des gènes et des fonctions impliquées dans les mécanismes moléculaires des interactions entre les plantes et les microorganismes. En 2006, les chercheurs Jones et Dangl décrivent le premier modèle évolutif et fonctionnel établissant un cadre général pour la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents à l'immunité chez les plantes (Jones and Dangl 2006). Ce modèle dit « en zig-zag » repose sur plusieurs étapes successives et concilie les avancées des chercheurs dans le domaine tout en intégrant l'aspect de la coévolution permanente entre plantes et agents pathogènes ([Figure 3](#)). Il met en évidence un système immunitaire à deux niveaux, permettant d'établir une 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. Une autre représentation, régulièrement donnée de ce modèle intégratif de l'immunité chez les plantes, décrit le système immunitaire selon cette fois-ci deux niveaux de récepteurs, l'un à la surface, et l'autre à l'intérieur de la cellule végétale ([Figure 4](#) ; Dodds and Rathjen, 2010).

2.1. L'immunité de surface des plantes

Dans le cas où les mécanismes de défense non-inductible (par exemple, présence de cuticule ou d'épines) échouent, une seconde ligne de défense générique contre un grand nombre d'agents pathogènes peut être induite par le système immunitaire de la plante. Ce niveau repose sur la reconnaissance : (i) de modifications cellulaires induites par l'agent pathogène lors de l'infection appelées Damage-Associated Molecular Patterns (DAMP) ; ou (ii) de molécules conservées chez les pathogènes appelés Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP) ou Microbe-Associated Molecular Patterns (MAMP). Cette détection se fait *via* des récepteurs de reconnaissance de ces motifs moléculaires (*Pattern Recognition Receptors* ; PRR) localisés au niveau de la membrane plasmique. Les

PRR sont classés en deux sous-familles (RLP et RLK pour *Receptor-Like-Proteins* et *Receptor-Like-Kinases*, respectivement) selon la nature du domaine protéique présent. De plus, la composition de ces récepteurs régit leur structure et leur fonction (Boutrot and Zipfel 2017). A la suite de la reconnaissance des motifs par les PRR, un ensemble de réactions de défense à large spectre est déclenché en aval (Bigeard et al. 2015), connu sous le nom « l'immunité médiée par la détection de motifs moléculaires » (*Pattern-Triggered Immunity* ; PTI) (Zipfel 2009).

Dans le cas des DAMP, la reconnaissance est aspécifique car ils sont issus des dommages causés aux cellules végétales (Heil 2009). Seuls quelques DAMP ont été étudiés de manière approfondie notamment dans les interactions plantes-insectes et les mécanismes de signalisation associés restent peu clairs (Tanaka et al. 2014). A l'inverse, la détection des PAMP et des MAMP se fait de manière plus ou moins spécifique (Cook et al. 2015). Ces motifs sont des signatures moléculaires conservées chez les agents pathogènes correspondant fréquemment à des composés constitutifs extracellulaires, tels que la chitine chez les champignons ou la flagelline chez les bactéries (Dodds and Rathjen 2010).

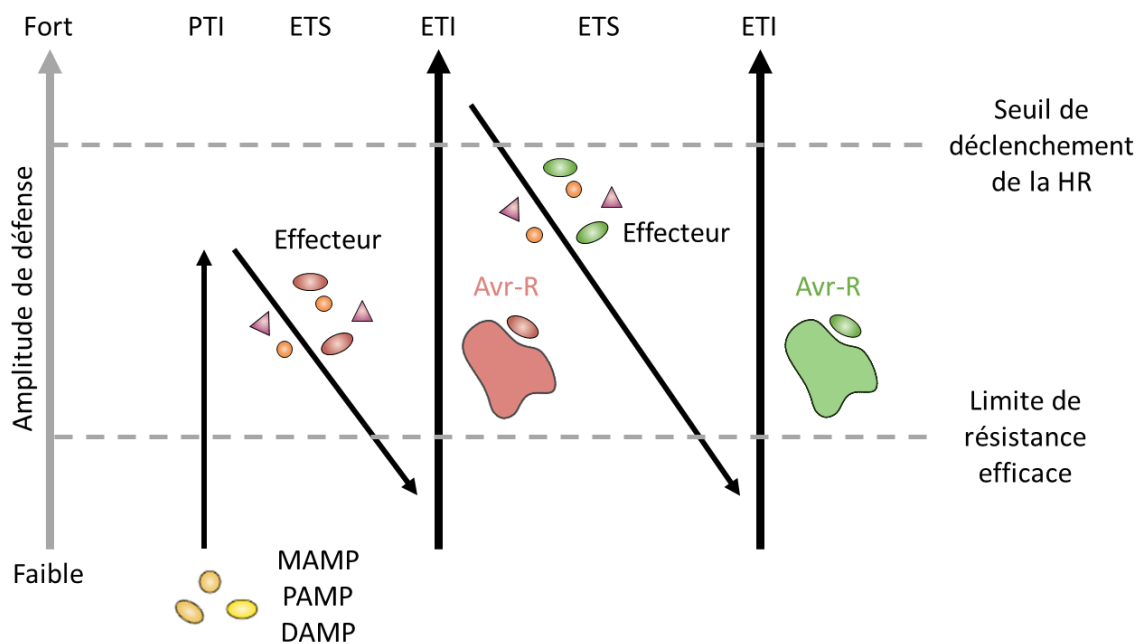


Figure 3. Le modèle en zig-zag illustre le système immunitaire des plantes selon plusieurs phases.

Ce modèle conceptuel de l'immunité végétale est constitué de quatre phases. La plante détecte les éliciteurs généraux ou les dégâts induits (en jaune) par l'agent pathogène (*Microbial/Pathogen/Damage-Associated Molecular Patterns* ; MAMPs/PAMPs/DAMPs) déclenchant la première barrière de l'immunité : la PTI (*Pattern-Triggered Immunity*). Certains agents pathogènes virulents interfèrent avec la PTI en employant une classe de molécules qualifiées d'effecteurs (en rouge), entraînant la sensibilité de la plante et la deuxième phase de ce modèle : l'ETS (*Effector-Triggered Susceptibility*). Certains de ces effecteurs (sous-entendu ici protéines d'avirulence, Avr) peuvent être reconnus spécifiquement par les protéines de résistance (R) de la plante, déclenchant la

mise de place de la deuxième barrière de l'immunité (*Effector-Triggered Immunity* ; ETI). Cette reconnaissance induit une réponse de défense de plus forte intensité que la PTI et dépasse le seuil d'induction de la réponse hypersensible (*Hypersensitive Response* ; HR). La HR provoque la mort cellulaire, stoppant la croissance de l'agent pathogène. La pression de sélection exercée par ces protéines de résistance sur les populations d'agents pathogènes conduit à l'évolution de ces derniers se traduisant par la perte, la modification ou l'apparition de nouveaux effecteurs (en vert) pouvant de nouveau interférer avec le système immunitaire de l'hôte (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. Modifié à partir de [Jones and Dangl 2006](#).

Actuellement, plus d'une vingtaine de couples PRR/éliciteurs ont été décrits ([Boutrot and Zipfel 2017](#)). Parmi ces derniers, nous pouvons citer les exemples les mieux connus tels que les couples CERK1 et CEBip/chitine fongique ([Miya et al. 2007](#); [Wan et al. 2008](#); [Kaku et al. 2006](#)) ou le couple FLS2/flagelline bactérienne ([Gómez-Gómez and Boller 2000](#); [Zipfel et al. 2004](#)).

Que la reconnaissance soit spécifique ou aspécifique, les PRR induisent des cascades de signalisation globalement similaires aux réactions induites par les agents pathogènes d'animaux ([Guiguet et al. 2016](#)). D'un point de vue physique, 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 les défensines sont sécrétés, pour limiter davantage l'infection. En continuité, nous pouvons également mentionner l'implication des cascades de phosphorylation, de l'entrée de calcium dans la cellule, de l'activation de facteurs de transcription et de gènes de défense, et l'accumulation de métabolites toxiques pour les bio-agresseurs. Enfin, une mort cellulaire programmée (PCD) limitant la progression de l'agent pathogène, appelée réponse hypersensible (*Hypersensitive Response* ; HR), peut être observée au site de l'infection ([Bigeard et al. 2015](#); [Cook et al. 2015](#)).

2.2. L'immunité intracellulaire déclenchée par les effecteurs

Au cours de leur évolution, les plantes ont développé un second niveau plus spécifique de reconnaissance des agents pathogènes à travers la détection des effecteurs produits par ces derniers (cf. [Chapitre I partie 2.3](#)). Une relation dite « gène-pour-gène » a été mise en évidence suite aux travaux de Flor sur la rouille du lin, causée par le champignon *Melampsora lini* ([Flor 1971](#)). Dans ce modèle, une protéine de résistance de la plante (R) « reconnaît » spécifiquement un effecteur sécrété par l'agent pathogène lors de l'infection, alors appelé protéine d'avirulence (Avr). L'interaction, directe ou

indirecte, entre les protéines R et Avr déclenche une forte réponse immunitaire. Ce niveau d'immunité est appelé « immunité médiée par la détection d'effecteurs » (*Effector-Triggered Immunity* ; ETI) et il est caractérisé par une réaction de type HR (**Figure 3** ; **Figure 4**). Une mort cellulaire est déclenchée spécifiquement autour du point d'infection, entraînant l'arrêt de la colonisation de la plante par l'agent pathogène. Contrairement à la PTI, l'ETI implique ainsi une relation plus spécifique entre les génotypes de l'hôte et de l'agent pathogène.

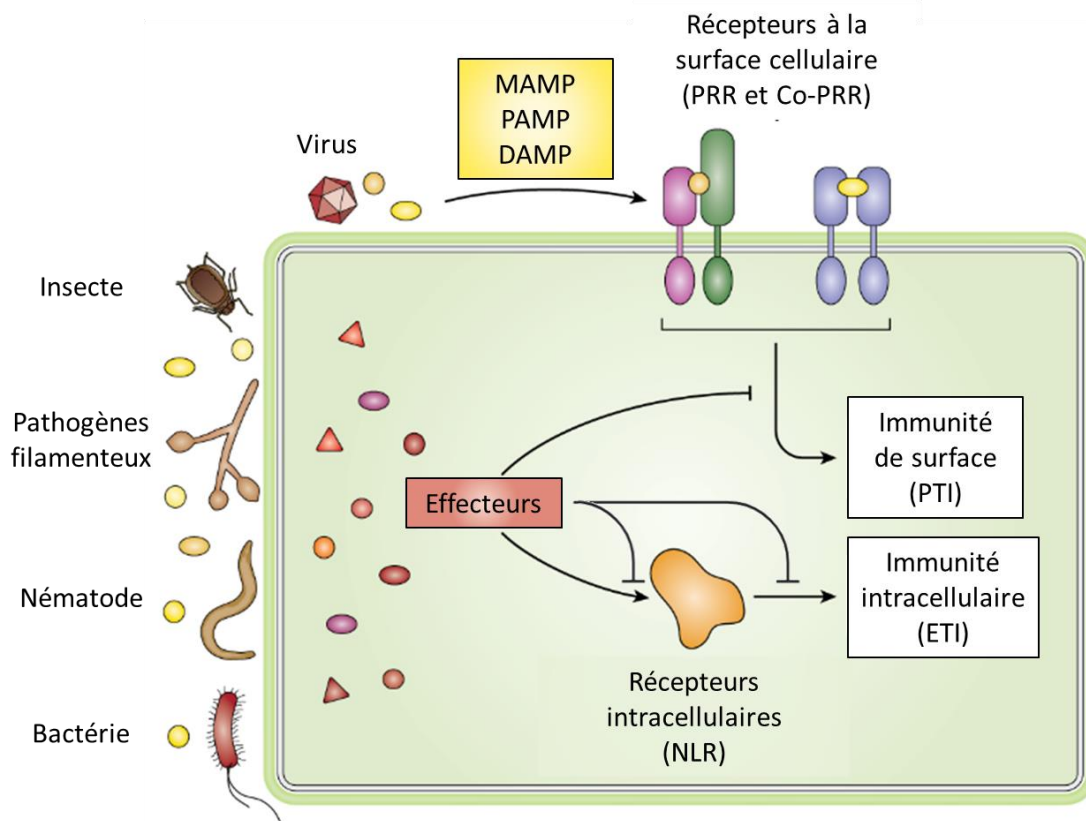


Figure 4. L'immunité végétale peut être définie selon le niveau de détection au niveau cellulaire chez l'hôte.

Des récepteurs à la surface des cellules végétales (*Pattern Recognition Receptors* ; PRR et co-PRR) déclenchent une immunité de surface cellulaire (*Pattern-Triggered Immunity* ; PTI) suite à la détection des éliciteurs généraux ou les dégâts induits (en jaune) par l'agent pathogène (*Microbial/Pathogen/Damage-Associated Molecular Pattern* ; MAMP/PAMP/DAMP). Les parasites et les agents pathogènes peuvent également sécréter des effecteurs à l'extérieur (non représentés ici pour des raisons de simplicité) ou à l'intérieur des cellules (en rouge). Ils peuvent alors agir sur les systèmes de l'hôte à leur avantage, notamment en supprimant les voies de signalisation. Les effecteurs, ou leurs activités, peuvent être détectés par des récepteurs immunitaires intracellulaires (NLR) pour initier l'immunité intracellulaire (*Effector-Triggered Immunity* ; ETI). Modifié d'après [Bentham et al. 2020](#).

2.2.1. Les gènes de résistance codant des récepteurs intracellulaires

Afin de détecter la présence d'effecteurs au sein même des cellules, différentes familles de récepteurs intracellulaires (classées selon leur homologie de structure) sont exprimés par l'hôte (Gururani et al. 2012). A l'instar de ces homologues chez les animaux, la famille de type NLR (*Nod-Like Receptors*) est une composante essentielle dans l'activation de la réponse immunitaire intracellulaire (Jones and Dangl 2006; Jacob et al. 2013). Les NLR des végétaux possèdent une architecture multi-domaines avec deux domaines centraux : le site de liaison aux nucléotides (*Nucleotide-Binding* ; NB) et le domaine terminal composé d'une répétition riche en leucine (*Leucine-Rich Repeat* ; LRR). De manière générale, ces domaines définissent la nature de leur fonction et sont très polymorphes. Les NLR sont organisés en larges familles multigéniques dans les génomes des plantes (Takken and Goverse 2012; Jacob et al. 2013). D'autre part, bien que la réponse immunitaire induite par l'ETI soit plus forte que par la PTI (Jones and Dangl 2006), ces récepteurs semblent induire des réponses relativement similaires et utiliser un réseau de défense commun (Ngou et al. 2021; Yuan et al. 2021). Notamment, certains PRR peuvent participer à la reconnaissance d'effecteurs dans le cadre de l'ETI (Lee et al. 2009). Ainsi, la dichotomie entre PTI et ETI est encore discutée (Thomma et al. 2011). De ce fait, certains chercheurs proposent simplement un modèle alternatif au modèle zig-zag (Jones and Dangl 2006) plus intégratif et permettant de prendre en considération tous les cas de figure lors de l'établissement d'une interaction plante-pathogène (Cook et al. 2015). Dans ce modèle, appelé modèle « d'invasion », Cook et al. (2015) proposent de considérer la PTI et l'ETI sous le même angle avec des récepteurs communs (*Invasion Pattern Receptor* ; IPR) reconnaissant aussi bien les effecteurs que les éliciteurs de pathogènes (*Invasion Patterns* ; IP). Ces alternatives bien que plus intégratives restent néanmoins peu représentées dans la littérature et ne seront pas reprises dans la suite de ce chapitre.

2.2.2. Les modèles de reconnaissance des effecteurs

Différents mécanismes employés par les NLR permettent aux cellules de l'hôte de détecter les effecteurs. Il existe quatre stratégies conceptuellement distinctes pour expliquer la reconnaissance des effecteurs protéiques (Figure 5; Jones et al. 2016; Adachi et al. 2020).

Historiquement, le premier modèle proposé est la reconnaissance directe dans lequel le récepteur NLR interagit directement avec l'effecteur reconnu. Ce modèle s'accorde parfaitement à la relation gène-pour-gène proposée par Flor (1971). De plus, parmi les nombreux exemples décrits à ce jour, des couples R-Avr ont été décrit chez *M. lini* tels que les couples M-AvrM et L5/L6-AvrL567 (Ellis et al. 2007). Cependant, dans la majorité des cas, l'interaction directe entre un NLR et l'effecteur « reconnu » n'est pas observée (Kourelis and van der Hoorn 2018). Au lieu de cela, le récepteur détecte les

perturbations cellulaires causées par les effecteurs sur des protéines de l'hôte. Dans ce modèle de reconnaissance indirecte, le récepteur est considéré comme le gardien des cibles de l'effecteur. Dans d'autres cas, les cibles hôtes des effecteurs sont devenues des leurres - des facteurs hôtes spécialisés qui se lient aux effecteurs et fonctionnent comme cofacteurs des récepteurs immunitaires. Ces modèles sont respectivement appelés modèles de garde et de leurre (van Der Hoorn and Kamoun 2008). Enfin, certains NLR possèdent une architecture particulière dans laquelle des domaines additionnels sont intégrés et correspondent une nouvelle fois à des leurres mimant les cibles des effecteurs, dérivant des protéines de l'hôte (Kroj et al. 2016). La distribution au sein du règne végétal de ces NLR portant des « leurres intégrés » (NLR-ID) suggère un mécanisme évolutif de diversification des NLR permettant aux plantes de présenter des capacités plus étendues de reconnaissance des agents pathogènes (Grund et al. 2019).

Une fois que l'agent pathogène est reconnu, de très récentes études ont fourni pour la première fois des exemples d'activation des NLR suite à des changements de conformation et/ou une oligomérisation *via* la perturbation de leurs domaines N-terminaux de type CC ou TIR (*Coiled Coil* et *Toll-interleukin 1 receptor*, respectivement) (Martin et al. 2020; Wang et al. 2019a, 2019b). Dans le cas des NLR de type CC-NLR, la première structure récemment élucidée du récepteur ZAR1 (*HOPZ-ACTIVATED RESISTANCE 1*) chez *Arabidopsis thaliana* a mis en évidence une activation de ce dernier de manière séquentielle conduisant à une configuration pentamérique dans la cellule végétale (Wang et al. 2019a, 2019b). Cette structure active, appelée aussi « 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). Dans le cas des NLR de type TIR-NLR, la structure du récepteur Roq1 chez *Nicotiana benthamiana* a été déterminée, marquant la première structure d'un résistosome de type TIR-NLR (Martin et al. 2020). La structure active de Roq1 en forme de tétramère entraîne l'ouverture du site actif des domaines TIR pour la liaison et l'hydrolyse du NAD⁺ (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide*), conduisant à la mort cellulaire (Martin et al. 2020; Bayless and Nishimura 2020).

Enfin, la plupart (voire la totalité) des NLR ont évolué de récepteurs uniques multifonctionnels (capteur et exécuter) fonctionnant en singleton vers des paires et des réseaux intégrant des récepteurs interconnectés fonctionnellement spécialisés appelés NLR capteurs, NLR exécuter et NLR auxiliaires (Adachi et al. 2019; Jubic et al. 2019). Les NLR capteurs détectent l'agent pathogène tandis que les NLR exécuter initient le signal immunitaire. Dans le cas des NLR auxiliaires, des analyses portées sur les familles des ADR1, des NRG1 et des NRC (*ACTIVATED DISEASE RESISTANCE 1*, *N REQUIRED GENE 1* et *NB-LRR protein required for HR-associated cell death*, respectivement) ont révélé que de nombreuses réponses immunitaires médiées par les NLR nécessitent la présence et l'activité de ces auxiliaires pour transduire des réponses immunitaires spécifiques (Jubic et al. 2019). De manière général, ce système

permet à la plante de bénéficier d'une résistance à spectre large en s'appuyant sur un nombre limité de NLR (Wu et al. 2017).

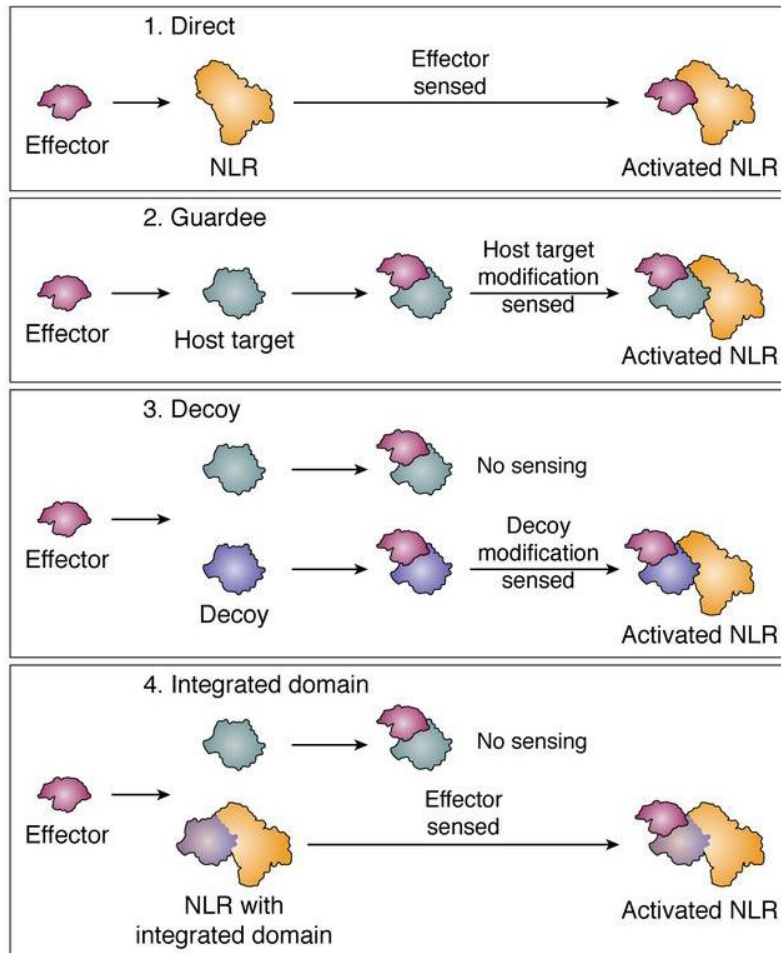


Figure 5. Les récepteurs immunitaires peuvent détecter les effecteurs d'agents pathogènes par différents mécanismes.

Exemple de mécanismes de détection des effecteurs par les récepteurs immunitaires : (1) de manière directe *via* l'interaction directe des effecteurs et des récepteurs immunitaires ; (2 et 3) de manière indirecte *via* une protéine hôte de garde ou de leurre (associé de manière constitutive au récepteur immunitaire) qui est ciblée par l'effecteur et dont les modifications associées sont détectées par les récepteurs ; (4) *via* un domaine leurre intégré dans les récepteurs immunitaires qui provient d'une cible hôte de l'agent pathogène. En l'absence de récepteurs immunitaires correspondants, l'agent pathogène provoque la maladie par l'intermédiaire des activités de ses effecteurs qui se lient et manipulent les protéines de l'hôte. Modifié d'après Bentham et al. 2020.

2.3. Le contournement des défenses *via* les effecteurs

Les agents pathogènes possèdent la capacité de contourner les défenses de l'hôte *via* la sécrétion de molécules appelées effecteurs. Généralement, ces dernières interagissent avec la cellule hôte pour supprimer la réponse immunitaire ou manipuler la physiologie de l'hôte (Khan et al. 2018). Le contournement des mécanismes de résistance de la plante résultant de l'expression d'effecteurs par l'agent pathogène est appelé « sensibilité médiée par l'action d'effecteurs » (*Effector-Triggered Susceptibility* ; ETS).

2.3.1. Mode d'action et cibles des effecteurs protéiques

De manière consensuelle, les effecteurs sont considérés comme des molécules opérationnelles promouvant la pathogénicité, quel que soit le mode d'action (Hogenhout et al. 2009; Win et al. 2012). La définition et la nature des effecteurs restent toujours débattue. Néanmoins, la caractérisation fonctionnelle d'un nombre croissant d'effecteurs a mis en évidence des grandes catégories de modes d'action communs chez les agents pathogènes bactériens, oomycètes et fongiques (Dangl et al. 2013; Toruño et al. 2016).

Les effecteurs ont été pour la première fois caractérisés chez le modèle bactérien *Pseudomonas syringae*, l'une des bactéries pathogènes de plantes la plus étudiée en raison des fortes pertes économiques qu'elle provoque (Xin and He 2013; Xin et al. 2018). Cette dernière utilise un système de sécrétion de type III (*Type Three Secretion System* ; TTSS) permettant d'injecter un arsenal d'effecteurs directement à l'intérieur des cellules de l'hôte (Collmer et al. 2000). La plupart de ces effecteurs ont pour fonction primaire de supprimer les défenses de l'hôte, fournissant ainsi un environnement favorable au développement de l'agent pathogène (Deslandes and Rivas 2012; Lindeberg et al. 2012). Par exemple, les effecteurs protéiques AvrPto et AvrPtoB ont la capacité d'inhiber l'activité du PRR FLS2, permettant ainsi de supprimer la mise en place d'une défense de type PTI (Göhre and Robatzek 2008; Xiang et al. 2008; Shan et al. 2008). Cette activité immunosuppressive n'est néanmoins pas la seule fonction des effecteurs. En effet, l'expansion ces vingt dernières années des études faites sur les effecteurs (cf. [Article 1](#)) a mis en évidence une diversité de fonctions telles que : (i) l'inhibition des protéases à cystéines de la plante hôte par la protéine Pit2, essentielle pour la colonisation du maïs par le champignon pathogène *Ustilago maydis* (Mueller et al. 2013) ; (ii) l'activité protectrice des parois membranaire du champignon *Cladosporium fulvum* *via* l'effecteur Avr4 déclenchée par les chitinases sécrétées par la plante hôte (van Esse et al. 2007) ; ou encore (iii) l'activation de l'expression de gènes codant des exporteurs de sucre par les effecteurs TAL (*Transcription Activator Like*), comme PthXo1 de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, modulant les flux de sucre au profit de la croissance des bactéries (Chen et al. 2010).

La modulation des fonctions au sein des cellules de l'hôte par les agents pathogènes n'est toutefois pas assurée que par des effecteurs de type protéique. En effet, des effecteurs non protéiques sont régulièrement rapportés, tels que des métabolites secondaires (effecteurs chimiques) ou des petits ARN non codants (effecteurs ARNs) (Collemare et al. 2019). Les métabolites secondaires fongiques peuvent aussi bien être des facteurs d'avirulence, des suppresseurs de défense, ou encore agir sur l'épaisseur des parois fongiques (Pusztahelyi et al. 2015). Enfin, les travaux pionniers de Weiberg et al. (2013) mettent en évidence des petits ARN non codants transférés par le champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea*, réprimant spécifiquement l'expression de gènes de défense de l'hôte. Par soucis de clarté, les effecteurs protéiques étant plus principalement ciblés dans ce manuscrit, le terme général d'effecteur sera utilisé pour se référer aux seuls effecteurs protéiques.

2.3.2. Entrée des effecteurs dans les cellules de l'hôte

L'interaction des effecteurs avec des composants intracellulaires de l'hôte pose la question de leur translocation à l'intérieur de la cellule hôte. Deux classes ont été mises en évidence : les effecteurs apoplastiques et les effecteurs cytoplasmiques (Petre and Kamoun 2014). Les effecteurs sont initialement synthétisés par la machinerie intracellulaire du pathogène et nécessitent une relocalisation dans l'espace extracellulaire (effecteurs apoplastiques) ou un export ultérieur dans le cytoplasme de la cellule hôte et/ou dans des organelles spécifiques (effecteurs cytoplasmiques). Les mécanismes d'adressage des effecteurs à leurs compartiments cibles chez l'hôte sont donc primordiaux pour la réalisation de l'infection par l'agent pathogène.

Cet adressage se fait de manière très diverse au sein des agents pathogènes (Figure 6). Les bactéries de type Gram négatif et les nématodes ont développé des structures spécialisées pour injecter directement les effecteurs dans le cytoplasme de la cellule hôte. Chez les bactéries, la sécrétion des effecteurs peut se faire par le biais de systèmes de sécrétion spécifiques comme le TTSS (Cornelis and Van Gijsegem 2000). Les nématodes et les insectes utilisent un stylet pénétrant ou invaginant la membrane des cellules hôtes, qui est également relié au tractus intestinal de l'animal, afin de sécréter des effecteurs (Hogenhout and Bos 2011; Mitchum et al. 2013). Contrairement à ces derniers, la translocation des effecteurs aux cellules végétales chez les agents pathogènes filamenteux (c'est-à-dire les champignons et les oomycètes) a rarement été visualisée directement et est mal comprise. Ils possèdent des structures d'infection différenciées comme les hyphes extracellulaires, les hyphes d'invasion et les haustoria. Historiquement, ces structures étaient associées uniquement à la nutrition des parasites (Voegelé and Mendgen 2003). Cependant, ces dernières sont également actrices dans la production et la sécrétion des effecteurs (Wang et al. 2017), toutefois le(s) mode(s) de translocation à travers différentes interfaces biologiques reste(nt) à définir (Petre and Kamoun 2014). Les travaux les

plus avancés chez l'agent du charbon du maïs *U. maydis* indiquent l'existence de complexes d'effecteurs qui pourraient assurer ce rôle, avec la présence d'extensions protubérantes depuis la membrane plasmique des hyphes d'infection vers le cytoplasme de l'hôte (Ludwig et al. 2021), rappelant fortement des structures observées autour d'haustoria de l'agent de la rouille de la féverole *Uromyces fabae* (Kemen et al. 2013).

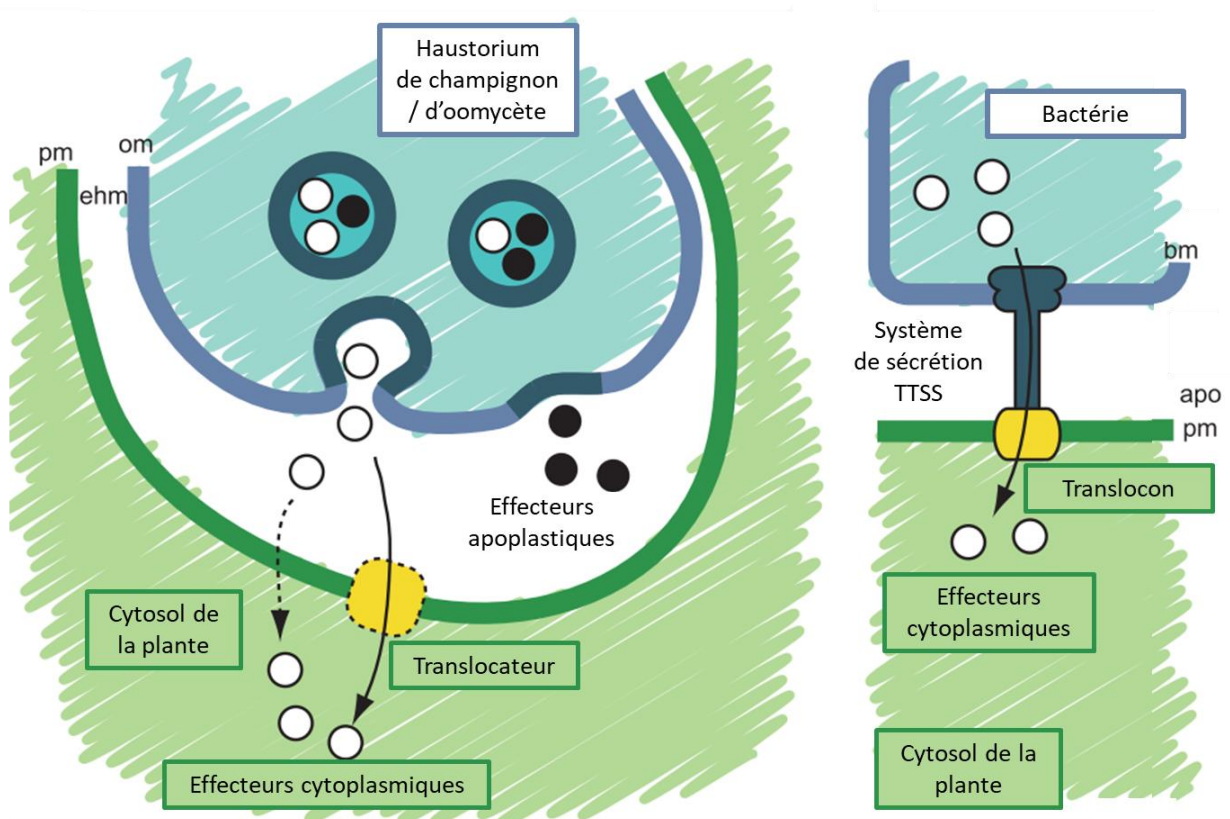


Figure 6. Les agents pathogènes filamenteux et les bactéries utilisent différents systèmes de translocation pour manipuler les cellules de l'hôte via les effecteurs.

Exemple de vue schématique de la sécrétion d'effecteurs, à gauche, par un haustorium de champignon ou d'oomycète et, à droite, par le système bactérien de sécrétion de type III (*Type Three Secretion System* ; TTSS) qui implique des protéines translocatrices dédiées (jaune). 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 transloqués à l'intérieur des cellules de l'hôte. apo, apoplaste ; bm, membrane bactérienne ; ehm, matrice extra-haustoriale ; om, membrane externe (de champignon ou d'oomycète) ; pm, membrane plasmique de la plante. Modifié 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 translocation de la protéine à travers le réticulum endoplasmique de l'agent pathogène et qui est clivé lors de la sécrétion (Emanuelsson et al.

2007). Ces motifs de sécrétion peuvent être prédits par des algorithmes avec une grande précision (Sperschneider et al. 2015), ce qui permet d'identifier une grande majorité des effecteurs fongiques et oomycètes putatifs (Petre and Kamoun 2014). 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 PsIs1 et VdIs1, produits respectivement par *Phytophthora sojae* et *Verticillium 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). Par ailleurs, un nombre croissant d'études met en évidence des localisations *in planta* diversifiées pour les effecteurs de champignons et d'oomycètes dans les noyaux, les chloroplastes, les mitochondries, ou encore les membranes des cellules hôtes (Petre et al. 2021; Lorrain et al. 2018b). Malgré la diversité de structures et de fonctions des effecteurs des agents pathogènes filamenteux, il existe de manière commune des domaines de translocation qui se situent après le peptide signal (Figure 7 ; Petre and Kamoun 2014).

Chez les oomycètes, des motifs d'acides aminés conservés tels que RXLR, CHXC ou LFLAK définissent les superfamilles d'effecteurs d'oomycètes (Petre and Kamoun 2014). Chez *P. infestans*, l'effecteur AVR3a possède un domaine RXLR indispensable pour la translocation dans les cellules de la pomme de terre (Whisson et al. 2007; Kale et al. 2010). Pourtant, le rôle de ce motif dans la translocation des effecteurs au sein de la cellule hôte est actuellement largement débattu et certaines études suggèrent plutôt une implication de ce dernier dans la sécrétion (Wawra et al. 2017). Contrairement aux effecteurs des oomycètes, les effecteurs fongiques ne partagent aucun motif conservé évident au niveau de la séquence protéique, ce qui rend leur prédiction de translocation difficile (Sperschneider et al. 2015). Cependant, certains motifs ont pu être déterminés tels que des motifs RXLR dégénérés (RXLR-like) ou le motif tripeptidique Y/F/WxC retrouvé en position N-terminale dans les effecteurs candidats de l'agent de l'oïdium de l'orge *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, ou en positions N-terminale et C-terminale d'effecteurs candidats de l'agent de la rouille *Melampsora larici-populina*, sans qu'un rôle dans la pénétration des cellules végétales ait pu être défini (Godfrey et al. 2010; Kale et al. 2010; Rafiqi et al. 2010; Hacquard et al. 2012; Petre and Kamoun 2014; Lo Presti and Kahmann 2017). Toutefois, il est aujourd'hui admis qu'une partie des effecteurs fongiques ne possédant pas de signal de sécrétion sont bien internalisés dans les cellules végétales et possèdent une action intracellulaire (Lo Presti and Kahmann 2017). Par exemple, il a été récemment démontré que plusieurs effecteurs candidats chez *M. larici-populina* sont transloqués dans les chloroplastes en imitant fonctionnellement les séquences d'adressage des plantes vers ces organites (Petre et al. 2016a).

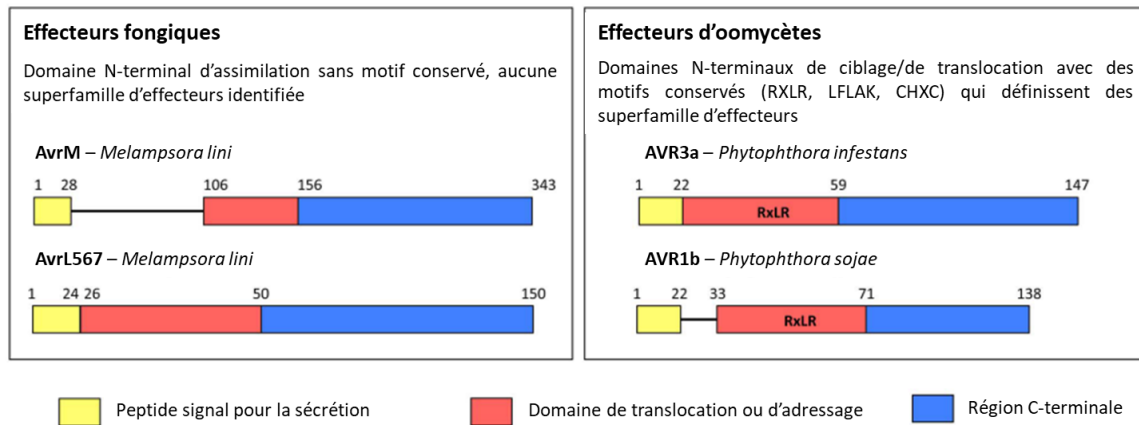


Figure 7. Domaines N-terminaux des effecteurs de champignons et d'oomycètes impliqués dans leur sécrétion et leur translocation dans la cellule végétale.

Les effecteurs des champignons et des oomycètes portent en général un peptide signal de sécrétion suivi de régions N-terminales non conservées appelées domaines de translocation/d'adressage qui ont été proposés comme médiateurs de l'entrée dans la cellule hôte. Chez les oomycètes, de petits motifs d'acides aminés conservés (par exemple, RXLR, CHXC ou LFLAK) ont été identifiés dans ces régions, ce qui permet de définir des superfamilles d'effecteurs. Modifié d'après [Petre and Kamoun 2014](#).

2.3.3. Définition de répertoires d'effecteurs candidats

Depuis les années 2000, l'entrée de la biologie dans l'ère de la génomique a permis d'accélérer l'étude des interactions plante-pathogène, grâce au développement d'outils de séquençage et d'analyses bio-informatiques de plus en plus performants. En effet, les fronts de recherche « omiques » sont très actifs et conduisent à une amélioration perpétuelle de la vitesse et du volume de séquençage. Une diminution des coûts de séquençage est également concomitante avec les dernières générations de technologies de séquençage, permettant de meilleures qualités d'assemblage et d'annotation fonctionnelle des génomes. Ainsi, des appels à projets internationaux ont été lancés par des instituts de séquençage, tel que le projet « 1000 génomes fongiques » du Joint Genome Institute aux Etats-Unis (JGI ; <https://jgi.doe.gov/>). Cette mobilisation d'efforts collectifs rassemblant des consortia de recherche internationaux a permis une rapide évolution de la connaissance des génomes fongiques.

Ces ressources omiques sont ainsi inestimables pour l'identification rapide d'effecteurs candidats dans les génomes de micro-organismes pathogènes filamenteux en recherchant des caractéristiques communément partagées. En effet, les gènes codant des effecteurs sont souvent spécifiques de l'espèce et ils codent des petites protéines sécrétées de quelques centaines d'acides aminés sans limite stricte définie (*Small Secreted Protein* ; SSP) qui possèdent le plus souvent un peptide signal nécessaire à la sécrétion, sont souvent riches en cystéines et sont exprimés spécifiquement lors de l'infection de

Encadré 1.**Chloroplaste : un élément majeur de l'immunité des plantes**

La photosynthèse et le métabolisme primaire sont les fonctions essentielles assurées par les chloroplastes. Cependant, ils sont également capables d'intégrer, de décoder et de répondre aux signaux environnementaux et immunitaires comme les réponses immunitaires de type PTI et ETI. Ils sont un des lieux des oscillations calciques et de la synthèse des phytohormones essentielles dans l'immunité des plantes, telles que l'acide jasmonique (JA) en réponse aux agents pathogènes nécrotrophes et l'acide salicylique (SA) en réponse aux agents pathogènes biotrophes (Glazebrook 2005). Enfin, les chloroplastes sont également des acteurs clés de l'homéostasie redox via la génération d'espèces réactives de l'oxygène (Littlejohn et al. 2021; Kachroo et al. 2021), un groupe de molécules majeures dans l'immunité médiée par les chloroplastes (Zurbriggen et al. 2009). De manière intéressante, l'activation de la réponse immunitaire entraîne souvent le repositionnement des chloroplastes d'une position optimale pour la photosynthèse vers des emplacements à proximité de l'agent pathogène invasifs (Figure 34) ou du noyau (Boevink et al. 2020; Caplan et al. 2015; Kumar et al. 2018; Park et al. 2018; Savage et al. 2021). Le repositionnement à proximité de la zone d'infection (par exemple, à proximité de la membrane extrahaustoriale de *P. infestans*; Savage et al., 2021a) ou du noyau permettrait de coordonner les réponses adaptatives codées par cet organite via des signaux rétroactifs (de Souza et al. 2017). Par exemple, le mouvement des chloroplastes dans le tabac est déclenché pendant les réponses de défense PTI et ETI ou après une infection par la protéines virales p50 (Caplan et al. 2015). L'accumulation des chloroplastes est médiée par une forte induction de stromules (tubules contenant du stroma), ce qui permettrait d'établir des associations complexes avec la cible (Savage et al. 2021a; Caplan et al. 2015; Kumar et al. 2018). Toutefois, une question demeure : est-ce que les chloroplastes s'accumulent à proximité des haustoria au profit d'une stratégie de défense de la plante ou au profit de la virulence du pathogène (Savage et al. 2021a) ?

la plante hôte (Petre et al. 2014). Ces critères sont exploités par des outils ou pipelines bio-informatiques pour affiner la détection des effecteurs (Emanuelsson et al. 2007; Saunders et al. 2012; Sperschneider et al. 2017, 2016, 2018a, 2018b). Toutefois, ces critères ne sont pas absolus (Kanja and Hammond-Kosack 2020) et il y a, par exemple, des effecteurs sans signal de sécrétion (cf. [Chapitre I partie 2.3.2](#); Liu et al. 2014) ou présentant une taille supérieure à 300 aa (Salcedo et al. 2017). D'autre part, l'absence d'homologues dans les bases de données et vis-à-vis d'autres espèces même proches est un obstacle pour l'identification des effecteurs par des analyses *in silico*. Pour contourner cet obstacle, certaines études utilisent comme moyen de prédiction les propriétés structurelles intrinsèques des protéines, qui sont plus fortement conservées que les séquences d'acides aminés (Illergård et al. 2009). La famille d'effecteurs *Magnaporthe* Avr et ToxB-like (MAX) a été définie à la suite d'analyses structurales sur les effecteurs du champignon pathogène *Pyricularia oryzae* (syn. *Magnaporthe oryzae*), l'agent causal de la pyriculariose du riz (de Guillen et al. 2015). Malgré une similarité de séquence de moins de 25%, chaque membre de cette famille partage une structure tridimensionnelle comparable. Des d'analogues structuraux ont également été identifiés chez l'agent causal du phoma du colza *Leptosphaeria maculans* et l'agent de la cladosporiose de la tomate *Fulvia fulva* (anciennement *Cladosporium fulvum*) (Lazar et al. 2020).

Par ailleurs, des analyses de génomique comparative ont mis en lumière les mécanismes évolutifs agissant sur les répertoires de gènes codant des effecteurs (Guttman et al. 2014). En plus des polymorphismes de présence/absence entre isolats ou espèces sœurs, de nombreux effecteurs présentent des niveaux élevés de substitutions d'acides aminés non-synonymes dans leur séquence (Białas et al. 2018), qui peuvent dénoter de signatures de sélection positive. De tels polymorphismes sont souvent retrouvés dans les catalogues de gènes codant des effecteurs (ou effecteurs candidats ; Guttman et al. 2014). Ils reflètent vraisemblablement l'effet de la coévolution entre les effecteurs et les composants associés chez l'hôte (par exemple, cibles, leurres ou encore, et surtout, récepteurs immunitaires ; cf. [Chapitre I partie 2.2.2](#)). Ainsi, le séquençage du génome d'un grand nombre d'isolats de la même espèce et l'analyse de leur polymorphisme intrinsèque combiné au développement d'outils statistiques permettent de réaliser des analyses par association pan-génomique (*Genome-Wide Association Study* ; GWAS). L'effecteur AvrStb6 de l'agent de la septoriose du blé *Zymoseptoria tritici* a été récemment mis en évidence par ce biais (Zhong et al. 2017). Cette approche peut également être utilisée pour quantifier la façon dont chaque polymorphisme non-synonyme unique dans la séquence (*Single Nucleotide Polymorphism* ; SNP) contribue à la virulence des agents pathogènes (Sánchez-Vallet et al. 2018). Enfin, l'intégration de la méthode GWAS avec l'ensemble des données de transcriptomique, appelée étude d'association à l'échelle du transcriptome (*Transcriptome-Wide Association Study* ; TWAS) (Wainberg et al. 2019), a permis de caractériser le lien entre les gènes et la

pathogénicité à travers les populations. Les effecteurs Avr_a et Avr_{a9} ont ainsi été identifiés chez *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Saur et al. 2019).

2.4. Les mécanismes évolutifs conduisant à la virulence

Le déploiement non raisonné de plantes résistantes dans les paysages culturels engendre généralement de fortes pressions de sélection sur les populations d'agents pathogènes ayant de grandes capacités adaptatives (McDonald and Linde 2002).

2.4.1. Les mécanismes génétiques sous-jacent à cette évolution

Les généticiens des populations décrivent différents scénarios pour expliquer la coévolution perpétuelle entre un agent pathogène et son hôte. Par exemple, le scénario de « guerre des tranchées » conceptualise la lente coévolution entre les plantes et leurs agents pathogènes dans des milieux naturels (Figure 8A ; Stahl et al. 1999). Cette théorie repose sur un maintien de polymorphisme dans les populations hôte-pathogène et des cycles de coévolution de faible amplitude, diminuant la probabilité de perdre des allèles. Ceci a pour conséquence d'engendrer des populations présentant une forte diversité génotypique et phénotypique pour plusieurs allèles, ce qui permet de « recycler » des allèles au cours des temps évolutifs *via* la sélection négativement dépendante de la fréquence allélique (Brown and Tellier 2011). Par opposition, le scénario de « course aux armements » (*Arms race*) est plus pertinent pour expliquer la coévolution hôte-pathogène dans un milieu anthropique (Figure 8B ; Dawkins and Krebs, 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 le pathogène ou pour la plante à fixer rapidement son (ou ses) allèle(s) de virulence/de résistance et, à l'inverse, à perdre cette (ou ces) dernière(s). Ce schéma tient compte des oscillations entre l'expansion des variétés résistantes possédant des propriétés agronomiques attractives et l'expansion des populations d'agents pathogènes nouvellement adaptées à ces dernières, résultant en une continuité de cycles de « boom-and-bust » (McDonald and Linde 2002). Ainsi, l'influence anthropique sur les systèmes culturels exerce des pressions de sélection sur les populations d'agents pathogènes, générant des contraintes et des opportunités d'évolution pour ces dernières (Halkett et al. 2021). 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 ». Dès lors, la variété devenue sensible est progressivement retirée du marché et une nouvelle variété résistante est proposée, entretenant ainsi ces cycles successifs de

déploiement de nouveaux gènes de résistance. Cette dynamique peut générer des pertes économiques majeures. C'est notamment le cas pour la culture du blé dans l'est de l'Afrique qui est menacée perpétuellement par l'agent de la rouille noire du blé *Puccinia graminis* f. sp. *graminis* et plus particulièrement par la race Ug99 (Singh et al. 2015).

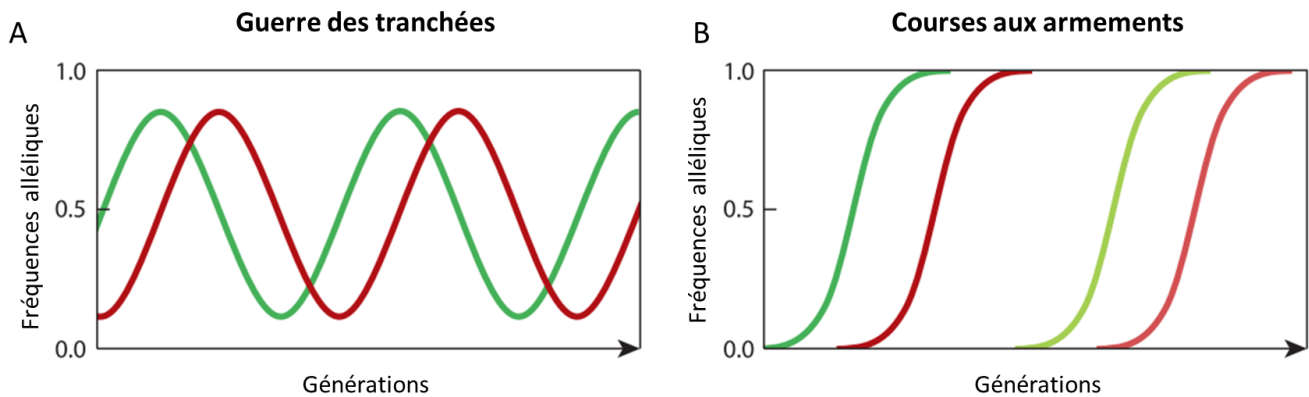


Figure 8. La course aux armements et la guerre des tranchées sont des scénarios démographiques expliquant l'évolution des interactions hôte-pathogène.

Représentation schématique des cycles de variations dans le modèle de la guerre des tranchées (A) 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 le développement récurrent 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. Modifié d'après Lo Presti et al. 2015.

Plusieurs forces évolutives plus ou moins séquentielles sont impliquées dans l'adaptation des populations d'agents pathogènes (Figure 9 ; Goyeau et al. 2021). La principale force, à l'origine du contournement, est la mutation responsable de l'apparition d'un individu virulent dans une population avirulente. L'émergence des variants virulents est favorisée dans le cas des interactions gène-pour-gène car une seule mutation de l'effecteur peut conduire à l'échec de la reconnaissance par la protéine de résistance de la plante et donc conférer la virulence à un agent pathogène. D'autre part, plusieurs mécanismes de mutations existent (cf. Chapitre I partie 2.4.2), conduisant au passage d'un allèle avirulent à un allèle virulent. Après l'apparition de ce premier individu virulent, la sélection positive est responsable de la multiplication de ce dernier dans la population et l'augmentation rapide du ou des allèles conférant la virulence (Möller and Stukenbrock 2017). Lorsque la sélection est contrebalancée par la dérive génétique, notamment dans le cas d'un organisme diploïde, la trajectoire évolutive devient imprévisible : un temps plus ou moins long sépare l'émergence du premier individu virulent et l'apparition d'une population virulente (Saubin et al. 2021). Enfin, cette nouvelle virulence peut se

dispenser dans le paysage agricole. Plusieurs facteurs anthropiques peuvent particulièrement favoriser la dispersion de ces derniers tels que la plantation massive d'hôtes résistants dans le paysage, la connectivité du paysage ou la dispersion par le biais de l'activité humaine (McDonald and Linde 2002; Anderson et al. 2004; Fisher et al. 2018).

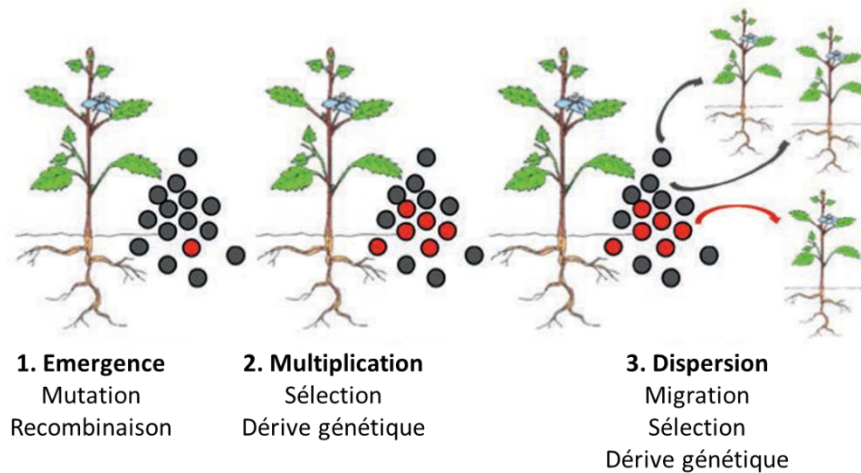


Figure 9. Trois forces évolutives majeures sont impliquées dans le contournement des résistances.

Un allèle de virulence (rond rouge) peut émerger (par exemple : par mutation ou recombinaison) dans une population d'agents pathogènes. Les individus porteurs de cet allèle se multiplient par sélection dans la population porteuse d'allèles d'avirulence (rond noir). Les individus virulents peuvent ensuite se disperser et envahir les cultures environnantes, faisant intervenir la migration, la sélection et la dérive génétique. Modifié d'après Goyeau et al. 2021.

2.4.2. Les mécanismes moléculaires responsables de l'évolution

Différents mécanismes moléculaires permettant le contournement des résistances variétales ont pu être identifiés (Figure 10; Frantzeskakis et al. 2020). Le mécanisme le plus commun, expliquant le contournement d'une résistance selon la relation gène-pour-gène, est l'inactivation de la protéine effectrice Avr codée par l'agent pathogène par mutation(s) non-synonyme(s) ou insertion/délétion. L'altération de cet effecteur conduit à la non reconnaissance par la protéine de résistance R, selon l'interaction immunitaire génotype-spécifique (Cesari 2018). L'effecteur échappe ainsi au système de détection de l'hôte ce qui lui permet de perdre son caractère d'avirulence. Plusieurs revues récentes procèdent à un état de l'art des mécanismes mutationnels tels que des SNP non-synonymes, des délétions partielles ou complètes de l'effecteur, ou encore des insertions plus ou moins importantes d'éléments répétés (*Transposable Elements* ; TE) (Rouxel and Balesdent 2017; Fouché et al. 2018; Sánchez-Vallet et al. 2018; Frantzeskakis et al. 2020). Par exemple, le gain de virulence chez *P. graminis* f. sp. *tritici* est induit par de larges insertions de TE dans les gènes d'avirulence *AvrSr35* et *AvrSr50* (57

et 26 kb, respectivement ; [Salcedo et al. 2017](#); [Chen et al. 2017](#)). Aussi, une même espèce d'agent pathogène peut présenter différents scénarios d'évolution pour expliquer l'émergence de la virulence. Chez *L. maculans*, différents événements mutationnels coexistent et peuvent conduire au contournement d'un même gène de résistance ([Daverdin et al. 2012](#); [Rouxel and Balesdent 2017](#)). En effet, jusqu'à sept mutations différentes ont été identifiées au locus de l'effecteur AvrLm4-7, induisant l'inactivation du gène ou la production d'effecteurs non reconnus par la protéine de résistance Rlm7 ([Daverdin et al. 2012](#)).

Des études associant phytopathologie et génomique ont permis de proposer des schémas d'évolution rapide chez certains agents pathogènes en lien avec la plasticité des génomes. Cette plasticité impliquerait des différences dans les rythmes d'apparition des mutations, notamment dans les chromosomes dispensables de certains organismes pour lesquels les mutations seraient accélérées. Ainsi, des corrélations sont observées entre la localisation de gènes d'avirulence ou plus largement d'effecteurs candidats et les régions les plus dynamiques du génome ([Dong et al. 2015](#); [Frantzeskakis et al. 2019](#); [Sánchez-Vallet et al. 2018](#)). Ces régions sont caractérisées par une faible teneur en gènes et une richesse en éléments répétés ([Raffaele and Kamoun 2012](#)). On parle alors de compartiments spécifiques dans le génome présentant des variations de vitesse d'évolution. Une étude pionnière propose ainsi l'hypothèse d'un arrangement à deux vitesses (*Two-speed genome*) chez l'oomycète *P. infestans*, avec un compartiment évoluant plus rapidement que l'autre ([Dong et al. 2015](#)). Des études décrivent également des vitesses d'évolution différentes des effecteurs comparées au reste du génome sans que des compartiments spécifiques soient identifiables ([Frantzeskakis et al. 2019](#); [Figueroa et al. 2020](#); [Schwessinger et al. 2020](#)). Même si cela reste encore discuté par la communauté, nous pouvons citer par exemple l'analyse des génomes de référence des agents de la rouille *M. laricipopulina* ([Duplessis et al. 2011a](#)), *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* ([Schwessinger et al. 2018](#)), *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* ([Miller et al. 2018](#)) et *P. graminis* f. sp. *tritici* ([Li et al. 2019a](#)).

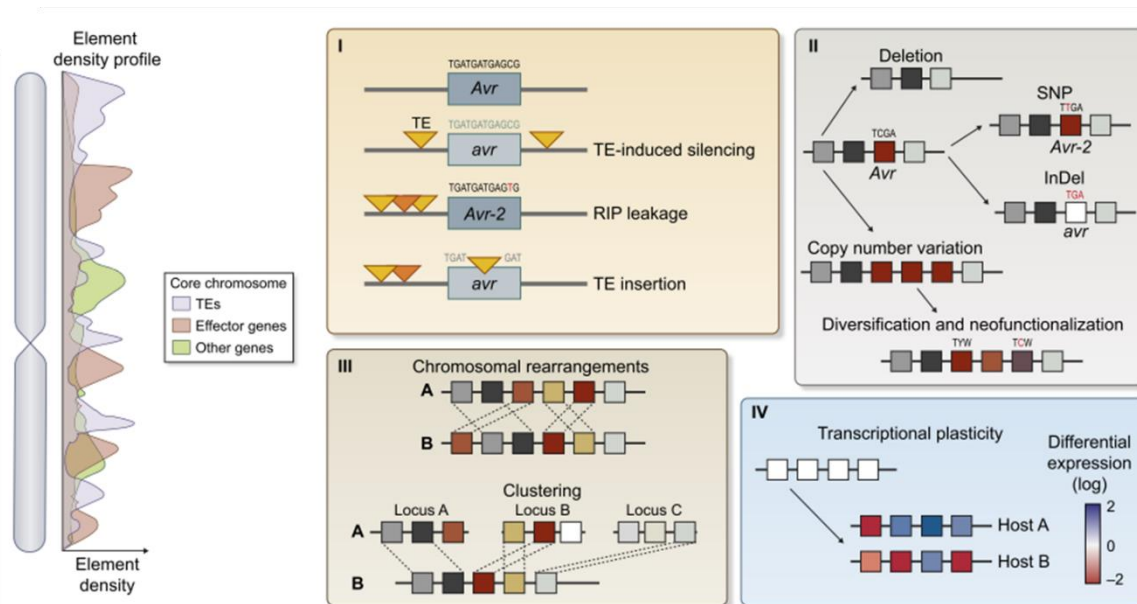


Figure 10. Différents mécanismes sont responsables de l'évolution rapide des agents pathogènes conduisant à la virulence.

Plusieurs exemples de caractéristiques/processus génomiques sont résumés dans cette figure. Les profils des éléments transposables (TE), des gènes effecteurs et des gènes non associés à la virulence (« *other genes* ») sont représentés sous forme de graphiques de densité à côté des schémas chromosomiques, illustrant les compartiments génomiques riches en gènes et pauvres en TE (ou l'inverse), ainsi que la compartimentation des gènes codant des effecteurs. Dans l'encadré I, comme cela peut se produire sur des loci peuplés d'éléments répétés, le gène *Avr* est affecté par les TE (triangles jaune et orange) de plusieurs façons : une méthylation de l'ADN réprimant la fonction du gène (« *TE-induced silencing* ») ; une mutation ponctuelle induite par la répétition *via* un mécanisme de défense du génome fongique ciblant les éléments répétitifs flanquants et pouvant donner lieu à un allèle différent (*Avr-2*) (« *RIP leakage* ») ; ou une perturbation de la séquence par l'insertion d'un TE (« *TE insertion* »). Dans l'encadré II, plusieurs altérations sont présentées pour un gène donné (carré rouge) qui ne sont pas nécessairement liées à l'activité des éléments répétés. Certains des événements présentés ici peuvent conduire à des allèles d'effecteurs différents, à la désactivation complète de la séquence par des mutations de type « *InDel* » (insertion/délétion), ou à la suppression complète de la séquence par une délétion. Par ailleurs, la duplication d'un gène (« *Copy number variation* ») peut conduire à des copies multiples du gène résultant dans certains cas à une plus grande divergence des séquences (représentées par différentes nuances de la même couleur). Dans ce dernier cas, de nouvelles fonctions peuvent être attribuées à certaines de ces copies (« *Diversification and neofunctionalization* »). Dans l'encadré III, les réarrangements chromosomiques entre deux isolats (ou espèces) étroitement apparentés A et B sont illustrés, entraînant soit la rupture de la synténie (en haut), soit le regroupement de gènes (en bas). Ce type de variation n'affecte pas exclusivement les gènes *Avr*. L'encadré IV illustre l'expression différentielle de quatre gènes *Avr* (« *Transcriptional plasticity* »), qui peut se produire indépendamment de la localisation chromosomique. Modifié d'après [Frantzeskakis et al. 2020](#).

3. Article n°1 – Etude des effecteurs des agents phytopathogènes au cours des 20 dernières années

Cette partie correspond à un article de synthèse en préparation (et non finalisé dans sa version présentée dans cette thèse) intitulé « **A survey of highly influential studies on plant pathogen effectors during the last two decades (2000-2020)** » pour lequel je suis première auteure et qui sera soumis à la revue *Molecular Plant Pathology*. Nous y présentons une analyse bibliométrique des publications les plus influentes dans le domaine de recherche sur les effecteurs des agents phytopathogènes, publiées entre 2000 et 2020. Cette analyse présente les principaux intérêts de recherche en lien avec ces protéines et leur évolution au cours des deux dernières décennies ainsi que les acteurs les plus remarquables dans le domaine.

La version de l'article affichée ici est disponible sur les archives ouvertes HAL de l'INRAE depuis le 20 octobre 2021 (<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03388325>) et une soumission au journal *Molecular Plant Pathology* est envisagée prochainement.

A survey of highly influential studies on plant pathogen effectors during the last two decades (2000-2020)

Clémentine LOUET, Sébastien DUPLESSIS, Pascal FREY and Benjamin PETRE*

Université de Lorraine, INRAE, IAM, F-5400 Nancy, France

Abstract

Plant effector biology is a research area that describes how plant-associated organisms modulate host structures and functions to promote colonization by using small molecules (effectors). In this article, we analyzed the 249 most highly-cited publications focused on plant pathogen effectors (aka Highly Influential studies on plant Pathogen Effectors; thereafter HIPEs) published between 2000 and 2020. This analysis identified outstanding countries, organizations, and journals that contributed HIPEs, as well as the evolution of research trends, model molecules, and model organisms over the last two decades. We notably show an increasing proportion of studies focused on effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi upon time. Our snapshot of the top tier plant effector biology papers will help readers gain a comprehensive and analytical understanding of this research area.

Keywords

Bibliometric pipeline, Web of Science, plant immunity, avirulence, virulence, pathogenicity, receptor

Introduction

Plant pathogens threaten agricultural production by triggering dramatic yield losses worldwide (Savary *et al.*, 2019). The effector biology research field explains how pathogens manipulate their host(s) to promote infection through the modulation of host structures and processes, and aims at leveraging that knowledge to ultimately improve plant health (Win *et al.*, 2012). Since the 2000s, this field of research grew spectacularly, with an exponential increase in the number of publications (<https://www.webofscience.com;Supplementary Figure S1>). During these two decades, our understanding of effector diversity and functions has improved, notably thanks to functional genomic studies. However, there are only a few studies that comprehensively inventory the major findings and concepts of plant effector biology, which makes it difficult for junior researchers to gain a broad expert and conceptual understanding of the research field.

To build a snapshot of top tier research in plant effector biology, we implemented the 'HIP in' ('Highly-Influential Publication in' ...) method that we recently described (Petre *et al.*, 2021). We report here a bibliometric analysis of 249

Highly Influential (*i.e.* highly cited) papers on plant Pathogen Effectors (thereafter HIPEs) published between 2000 and 2020. We describe the concepts, model objects, and findings shared by HIPEs, as well as the research community that shared them. We notably show the increasing importance of fungi as model pathogens over time, and highlight key fungal species.

A bibliometric pipeline identifies 249 highly influential publications addressing plant pathogen effectors

To identify the most influential publications that addressed plant pathogen effectors over the last two decades, we implemented a previously-described bibliometric pipeline (Petre *et al.*, 2021), which mostly uses the Web of Science database (<https://www.webofscience.com>) and a reference management software (here Mendeley). We selected the top three most cited research articles or reviews for each year between 2000 and 2020, which we identified via three successive searches using the key words 'plant pathogen effectors', 'plant pathogen avirulent effectors', and 'plant pathogen virulent

effectors' ([Figure 1A](#); [Dataset 1](#); see [Supplementary Methods](#) and [Supplementary Figure S2](#) for details). In total, we collected and archived 249 HIPEs (127 research articles and 122 reviews; hereafter the 'HIPE collection') on the following public web address: https://www.zotero.org/groups/4410902/hipe_collection/library.

The HIPEs represents 4% of all the publications identified *via* the three searches above mentioned, but their annual citation rate is approximately four times higher (25 *vs.* 6 on average; [Figure 1B](#)). The HIPE with the highest number of citations (6503) and annual citation rate (414) is the review that presented the

seminal zig-zag model (Jones and Dangl, 2006). Interestingly, the current five years impact factors of the journals in which HIPEs were published do not correlate with HIPEs annual citation rate, indicating that the journal impact factor is a poor indicator of HIPEs influence ([Figure 1C](#)). As a note, only 19 out of 249 HIPEs overlap with the collection of highly-cited papers in plant immunity (HIPPYs) described in our previous paper (Petre *et al.*, 2021; [Dataset 1, column B](#)). To summarize, HIPEs represent an original collection of influential studies that pertains to plant pathogen effectors, and that is suitable for further analyses.

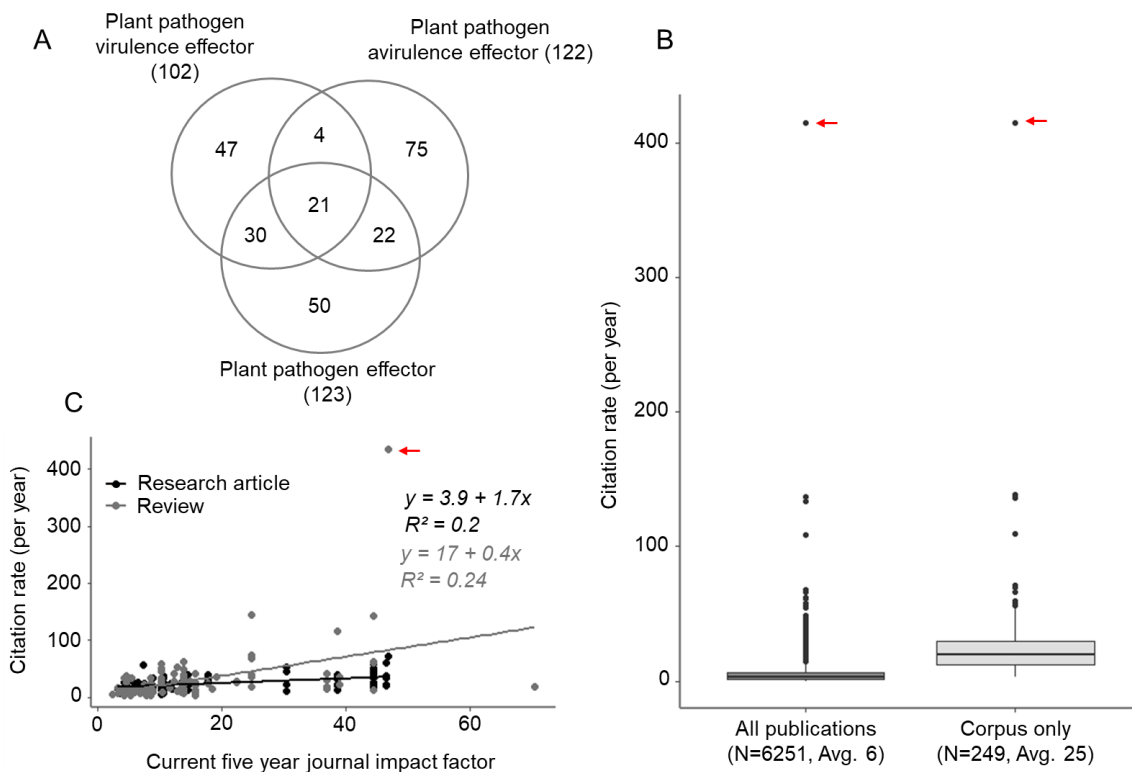


Figure 1. HIPEs are highly cited studies addressing plant pathogen effectors

(A) Venn diagram indicating the number of overlapping publications between the three group of key words ('plant pathogen effectors', 'plant pathogen avirulence effectors' and 'plant pathogen virulence effectors') used to build the HIPE collection. The number of publications is shown between parentheses. (B) Boxplots displaying the annual citation rate of all publications identified with the keyword searches (left-hand side; 'All publications') and the HIPEs only (right-hand side; 'Corpus only'). The boxplot outliers are indicated as dots. The number and the average of publications considered is indicated below each boxplot (N and Avg value, respectively). (C) Scatterplot displaying the annual citation rate of individual HIPEs according to the value of the current five-year journal impact factor of the journal in which the HIPEs were published. Black and grey dots indicate research articles and reviews, respectively. Linear trendlines are indicated for each article type along with trendline equations and r-squared values, with the same color-code as previously. In (B) and (C), the red arrow indicates the HIPE with the highest annual citation rate, which corresponds to the 2006 review by Jones and Dangl that presented the zig-zag model of the plant immune system. The raw data used to build this figure are available in the [Dataset 1](#).

A small influential community publishes the majority of the HIPEs

To identify the research community that publishes the HIPEs, we extracted from HIPEs metadata the main countries and institutions to which HIPEs corresponding authors are affiliated, as well as the journals that published them. Overall, 19 countries, 87 institutions (comprising 154 affiliated corresponding authors), and 67 journals published the HIPEs ([Dataset 1](#)). Interestingly, only a handful of scientific actors contributed most of the collection ([Table 1](#)). Indeed, three countries

(USA, UK, and Germany) published 62% of the HIPEs, whereas four institutions published a quarter of the HIPEs: the Max Planck Institute (MPI, Germany), The Sainsbury Laboratory (TSL, UK), the National Research Institute for Agriculture, Food, and Environment (INRAE, France) and the Wageningen University & Research (WUR, Netherlands). Also, four journals (Science, Annual Review of Phytopathology, PNAS, and The Plant Cell) contributed over a quarter of the HIPEs. Altogether, this analysis indicates that HIPEs are shared by a restricted number of academic actors mostly based in Western Europe and in the USA.

Table 1. Top countries, institutions, and journals that publish the most HIPEs.

Country, institution, or journal ^a	Number of HIPEs	Number of citations	Number of corresponding authors	Current 5-year journal impact factor
USA	88	25,167	52	-
UK	35	13,939	25	-
Germany	31	7,581	19	-
INRAE (France)	18	3,099	13	-
TSL (UK)	15	10,082	7	-
MPI (Germany)	15	4,034	10	-
WUR (Netherlands)	14	3,190	6	-
Science	20	7,013	-	44.37
Annual Review of Phytopathology	19	4,925	-	13.87
PNAS	17	4,702	-	10.62
The Plant Cell	17	3,686	-	10.14

^a USA: United States of America; UK: United Kingdom; INRAE: Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement; TSL: The Sainsbury Laboratory; MPI: Max Planck Institute; WUR: Wageningen University & Research; PNAS: Proceedings of the National Academy of Science of the USA.

HIPEs collectively address seven main research questions, whose relative importance within the HIPE collection evolved over time

To identify the main research questions addressed by the HIPEs, we performed an iterative analytical reading combined with key word tagging of all the collection aimed at identifying HIPEs main research topics and sub-topics. This analysis identified seven main research topics as follow: 1) the 'PTI' (PAMP-triggered immunity; *what is the interplay between PTI and effectors?*; 10 HIPEs), 2) the 'ETI' (Effector-triggered immunity; *what is the interplay between ETI and effectors?*; 41 HIPEs), 3) the 'ETS' (Effector-triggered susceptibility; *how do effectors modulate host functions?*; 78 HIPEs), 4) the 'Effector

trafficking' topic (*how do pathogens deliver effectors to the host?*; 16 HIPEs), 5) the 'Pathogen highlight' topic (*what is the current knowledge in the field for specific pathogen species?*; 12 HIPEs), 6) the 'Pathoresources' topic (*how to build and leverage technological innovation and resources to better understand plant-pathogen interactions?*; 53 HIPEs), and 7) the 'General review' topic (*how do we conceptually understand the role of effectors in plant-pathogen interactions?*; 39 HIPEs) (see [Supplementary Text](#) for details). Interestingly, the annual citation rate is comparable between these main research topics ([Supplementary Figure S3](#)).

To gain a more accurate understanding of HIPEs research questions, we further grouped HIPEs into 20 sub-topics ([Figure 2](#)). Thus, each of the

seven main research topics comprises two to five sub-topics that pertain to a more specific research question. For example, the ETI topic comprises two sub-topics: 'Immune receptors' (*what are the receptors that recognize effectors?*) and 'Effector recognition' (*how do immune receptors recognize effectors and signal*

that recognition?). Overall, these sub-topics highlight several specific research questions and the main addressed are: '*what is the function of pathogenic effectors in the host?*' (18% of HIPEs, ETS topic) and '*how do we develop and use omics data to identify pathogenic effectors?*' (16% of HIPEs, Pathoresources topic).

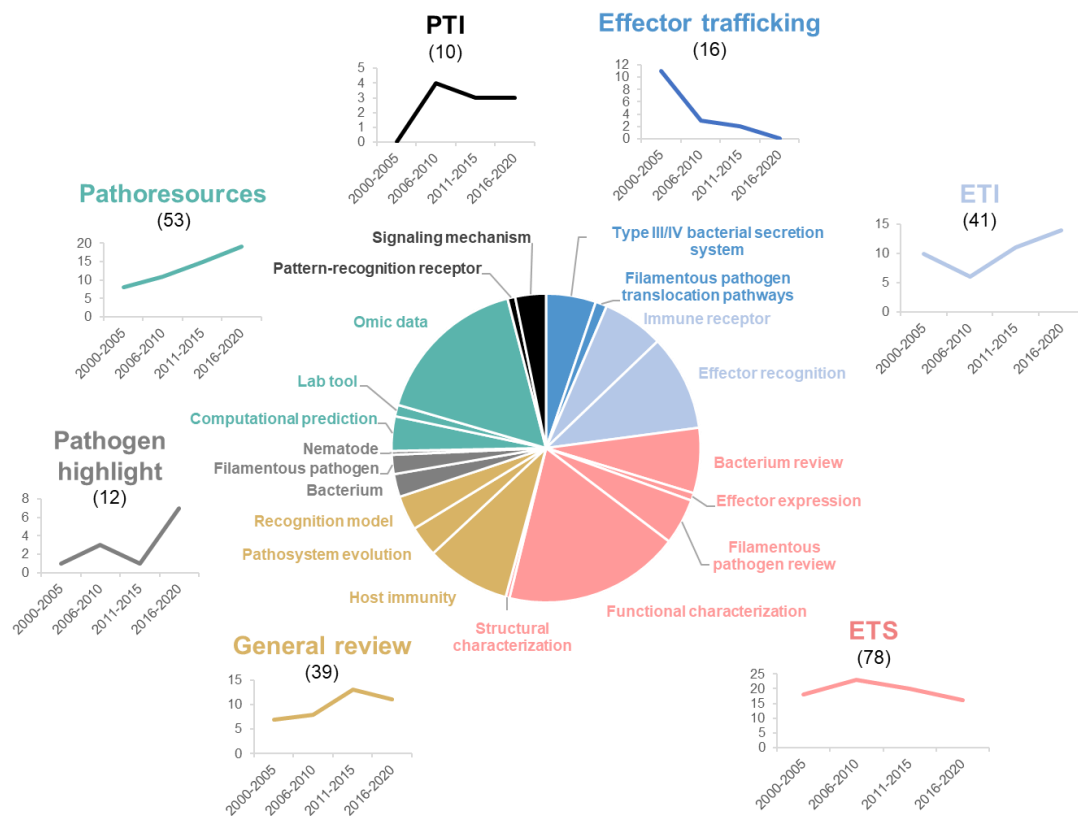


Figure 2. HIPEs pertain to seven main research topics

Pie chart displaying the seven main research topics and 20 sub-topics addressed by the HIPEs and their publication trends over time. The main research topics, sub-topics and trendlines associated are color-coded as indicated in Figure S3. Research sub-topics are indicated as separated pie segments within a main topic. The categorization of each HIPEs was based on iterative expert reading and key word association of the entire HIPE collection. Numbers above the main research topics indicate the total number of HIPEs for each topic. Trendlines indicate the number of HIPEs for each topic according to four five-year time frames: 2000-2005; 2006-2010; 2011-2015 and 2016-2020. PTI: PAMP-triggered immunity; ETI: Effector-triggered immunity; ETS: Effector-triggered susceptibility. The raw data used to build this figure are available in the [Dataset 1](#).

To identify potential research trends within the HIPEs, we analyzed the evolution of the number of publications in each of the seven main topic between 2000 and 2020, by five-year time frames (*i.e.* 2000-2005, 2006-2010, 2011-2015, and 2016-2020). That analysis showed that most topics remain stable over time. In contrast, the two topics Effector trafficking and Pathoresources showed marked trends of

decrease and increase over time, respectively. The Effector trafficking topic declined markedly over the years, mainly due to the reduction of HIPEs addressing the bacterial Type III or Type IV secretion system. The strong controversy on the mechanisms of delivery of filamentous pathogen effectors may also explain the decline of this topic (Anderson *et al.*, 2015; Tyler *et al.*, 2013; Wawra *et al.*, 2013; Wawra *et al.*, 2017).

At the opposite, the Pathoressources topic steadily increased, probably benefiting from the progresses in genomics that helped the identification of candidate effectors (Figure 2). In conclusion, this set of analyses show that HIPEs pertain to key research questions that address well-defined aspects of the molecular interaction between plants and pathogens; the relative importance of some of those increased (*i.e.* Pathoressources) or declined (*i.e.* Effector trafficking) over the last two decades.

HIPEs address a handful of key organisms and proteins

To identify the main objects (*i.e.* organisms or molecules) investigated by the HIPEs, we performed a word occurrence analysis of the title and abstracts combined with word cloud generation and iterative text enrichment for words referring to organisms or molecules (Dataset 2; see Supplementary Methods for

details). That pipeline helped to generate a world cloud of the 200 most frequently used words referring to organisms or molecules (Figure 3A). As expected, the most used words refer to key groups of organisms (pathogen, *Arabidopsis*, bacterium, fungus, *Pseudomonas*) or groups of molecules (effector, receptor, NLR, gene, protein, genome). We further quantitatively analyzed Dataset 2 to identify the top five most frequently referred to plant species, pathogen species, immune receptors, and effectors (Figure 3B-E). Firstly, the top five model plants comprise a Brassicaceae (*Arabidopsis thaliana*), two Poaceae (*i.e.* cereals; rice and wheat), and two Solanaceae (potato and tomato). The fact that three out of these five model plants are key crops providing staple food worldwide (*i.e.* rice, wheat, and potato; Savary *et al.*, 2019) shows the alignment of research efforts with agricultural efforts to meet global food security (Figure 3B).

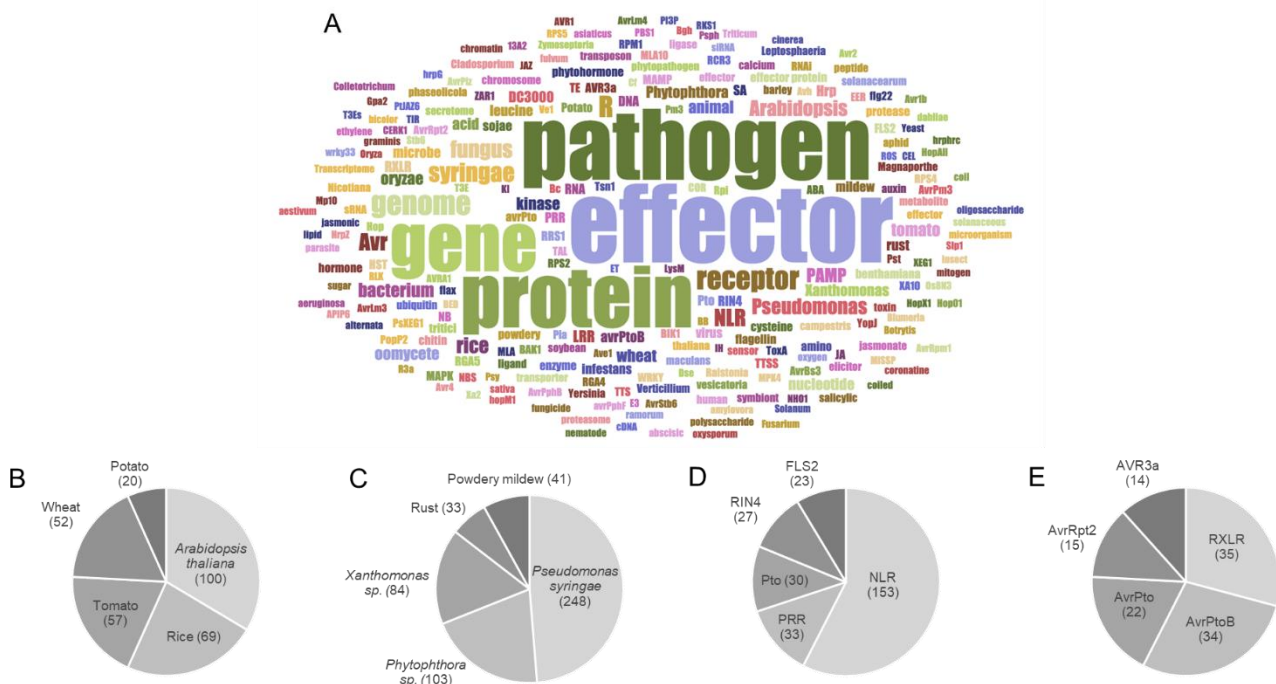


Figure 3. HIPEs rely on a handful of model organisms and proteins

(A) Word cloud displaying the most frequent words referring to organisms or molecules in the title and abstract of the HIPEs. The word cloud was built using a filtered text file including HIPEs metadata (publication title and abstract) deprived from words that did not explicitly refer to organisms or molecules. Word colors were randomly generated to assist visual word discrimination. The word cloud displays 200 words. The size of the words positively correlates with their frequency in the text file. A top five of plant organisms (B), plant-associated pathogens (C), immune receptors (D) and pathogen effectors (E) was identified based on the Dataset 2. Specific additional key words were considered for the following topics: *Arabidopsis thaliana* ('*Arabidopsis*' and '*thaliana*'), *Pseudomonas syringae* ('*Pseudomonas*', '*syringae*', 'DC3000' and 'pst'), *Phytophthora sp.* ('*Phytophthora*', '*infestans*', '*ramorum*' and '*sojae*'), *Xanthomonas sp.* ('*Xanthomonas*', '*campestris*' and '*oryzae*' if used in a

meaningful context), Powdery mildews ('Powdery' and 'mildews'), NLR ('NLR', 'LRR', 'NB-LRR', 'TNL', 'CNL', 'sNLR' and 'hNLR'). NLR: nucleotide-binding/leucine-rich-repeat receptor; PRR: pattern recognition receptors. The raw data used to build this figure are available in the [Dataset 2](#).

Secondly, the top five model pathogens comprise two bacteria (*Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas* species), two groups of fungi (Pucciniales and Erysiphales, causing rust and powdery mildew diseases), and one genus of oomycetes (*Phytophthora* species) ([Figure 3C](#)). These pathogens collectively cause a wide range of diseases that significantly impact agricultural production worldwide (Fones *et al.*, 2020; Savary *et al.*, 2019). Thirdly, the top five model receptors comprise two general groups of immune receptors (NLRs and PRRs), as well as three specific proteins: FLS2 (the PRR responsible for flagellin recognition), Pto (a cytosolic kinase), and RIN4 (a regulator of immunity). The prominence of NLRs mirrors their importance in ETI, and the importance of ETI as a research topic within HIPEs ([Figure 3D](#)). Finally, the top five model groups of effectors comprise three *P. syringae* effectors (AvrPto, AvrPtoB, and AvrRpt2) and two oomycete effector families (the RXLR superfamily, and the AVR3a family) ([Figure 3E](#)). Altogether, these analyses reveal the prominence of *A. thaliana*, *P. syringae*, as well as receptor and effector gene families as model objects in effector biology. We refer readers to [Supplementary Text](#) for a more detailed and contextualized analysis of the organisms and molecules listed above.

Temporal analysis of model pathogens reveals the increasing importance of plant pathogenic fungi

To get a more detailed understanding of the model pathogens addressed in HIPEs, we performed an iterative analytical reading of all HIPEs and categorized them according to the taxonomic group of the pathogens they emphasized (if any). This analysis revealed that 80% of the HIPEs emphasize a specific pathogen; we grouped those HIPEs into six

categories: bacteria (96 HIPEs), fungi (74), oomycetes (33), viruses (3), nematodes (2), and aphids (1) ([Dataset 1](#)) ([Figure 4A](#)). Only a handful of HIPEs emphasize aphids, viruses and nematodes, suggesting that the effector biology community revolves mostly around bacterial, fungal and oomycete model systems. Notably, the categories bacteria of oomycetes (33% and 13% of the collection, respectively) show low diversity, as they mostly address *Pseudomonas* and *Phytophthora* species, respectively ([Dataset 1](#)). In contrast, the fungal group (28% of the HIPEs) shows a high diversity, as it addresses 15 different fungal genera ([Dataset 1](#)). This indicates that bacteria and oomycete groups are dominated by a limited number of key model species, while the fungal group addresses a broader diversity of species. Interestingly, the size of the categories evolved drastically between 2000 and 2020 ([Figure 4B](#)). Indeed, between the 2000-2005 and the 2016-2020 time periods, studies focusing on bacteria declined from 75% to 21% of the HIPE collection, while studies focusing on oomycetes and fungi increased from 2% to 13% and from 2% to 40%, respectively. These results indicate that in the early 2000s model bacterial systems vastly dominated effector biology, but that over time filamentous pathogens (*i.e.* fungi and oomycetes) gained importance. This likely reflects the impact of pathogenomics and the possibility for systematic effectors prediction in sequenced genomes of a larger number of microbes, particularly fungi.

The influence of publications addressing fungal effectors increased over time: analysis of the 'HIPE-fun' collection

To perform an objective analysis of the most prominent fungal species in influential publications addressing fungal plant pathogen effectors, we repeated the bibliometric analysis

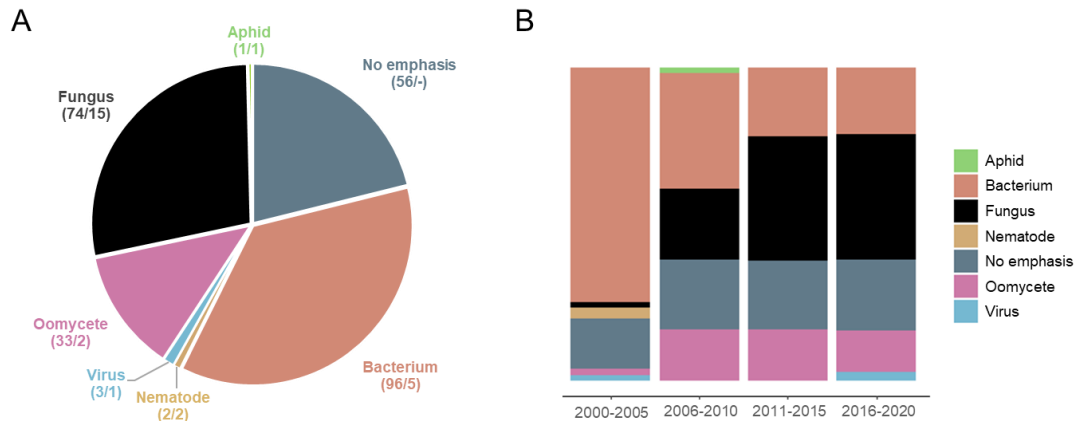


Figure 4. Studies emphasizing fungi gain importance over time.

(A) Pie chart displaying the seven taxonomic groups of pathogens emphasized (if any) addressed by the HIPEs. The assignment of each HIPE was based on iterative expert reading of the publications. For each taxonomic group, the number of HIPEs and the total number of species are indicated (e.g. '74/15'). (B) Percent stacked bar chart displaying the evolution of the relative size of taxonomic groups over four five-year time periods: 2000-2005; 2006-2010; 2011-2015 and 2016-2020. Color code is the same as in (A). The raw data used to build this figure are available in the [Dataset 1](#).

that identified the HIPE collection, by considering only the research articles on fungi. This helped to build a collection of 100 HIPEs focusing on fungi (thereafter referred to as 'HIPE-funs'; [Dataset 3](#); see [Supplementary Methods](#) and [Supplementary Figure S2](#) for details), archived on the following public web address: https://www.zotero.org/groups/441090/5/hipe-fun_collection/library.

To understand the expansion of publications focus on fungi in HIPEs, we extracted the number of publications addressing plant pathogen effectors and the citation rank over years of the HIPE-funs (i.e. rank of the publication on the Web of Science database based on the number of citations). This analysis highlighted an obvious increase in the citation rank over years of the HIPE-funs associated with the expansion in the number of publications addressing plant pathogen effectors. Between 2000-2005 and 2016-2020, studies on fungi were ranked on average from 33rd place out of 56 publications to 7th place out of 192 publications ([Figure 5A](#)). This result displays the significant increase in the influence of publications related to fungi over time, and more precisely by two predominant trophic lifestyles: biotrophy and hemibiotrophy (45% for both; [Figure 5B](#)).

The HIPE-funs are related to influential fungal species in the field of molecular plant pathology

In 2012, Dean and colleagues surveyed hundreds of mycologists who voted for the most important fungal species in molecular plant pathology based on their scientific and economic importance (495 votes in total). We performed a comparative analysis to evaluate the correspondence between the fungal species addressed in HIPE-funs and the top 10 list from Dean et al. (2012). We first identified a total of 21 fungal genera covered in the HIPE-funs. We ranked fungal genera according to HIPE-funs numbers and annual citation rates, and then we compared this ranking with the list by Dean and colleagues ([Table 2](#)). First, this analysis showed that all top 10 species occur in at least one HIPE-fun, highlighting an excellent correspondence between the two lists ([Dataset 3](#)). Notably, the genera *Magnaporthe* and *Puccinia* appear in the top of both lists ([Table 2](#); Dean et al., 2012). These genera comprise species that trigger dramatic epidemics on rice and/or wheat, threatening global food security (Figuroa et al., 2018; Talbot, 2003; Wilson and Talbot, 2009). That may explain why they represent important fungal models in the field of fungal effector

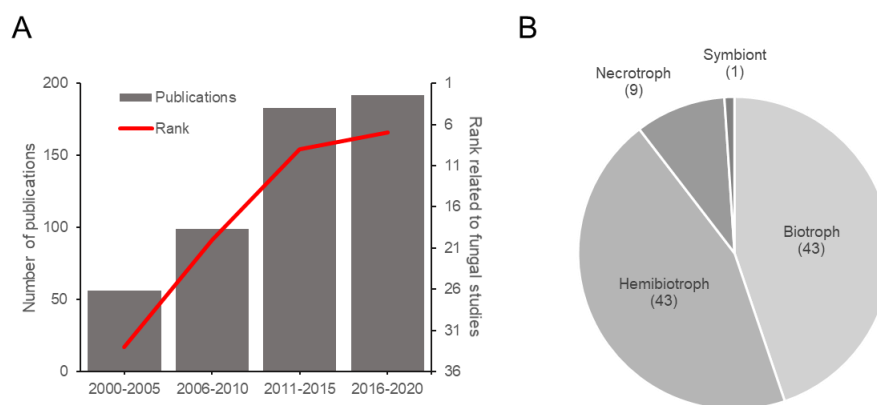


Figure 5. Publications addressing effectors of (hemi)biotrophic fungi gain prominence over time.

(A) Evolution of the number of publications related to plant pathogen effectors and the citation rank for HIPE-funs. Each citation rank was calculated based on the mean of rank of publications by time frames (*i.e.* position of the publication on the Web of Science website based on the number of citations). (B) Pie chart displaying the proportion of each lifestyle of plant pathogenic fungi studied in the HIPE-funs. The categorization of each lifestyle was based on iterative expert reading and association with the pathogenic species studied for the entire HIPE-fun collection. Numbers above lifestyle topics indicate the total number of HIPE-funs for each topic. The raw data used to build this figure are available in the [Dataset 3](#).

biology. In contrast, the ranking of some species differs between the two lists. For instance, the genus *Botrytis sp.* dominates the top 10 list of Dean et al. (2012), but it is barely represented in the HIPE-funs (2nd place in the previous report vs. 13th place in this study; [Table 2](#)). This genus, and notably the species *Botrytis cinerea*, is a strong model for molecular plant pathology but not in effector biology. This is probably because

of its necrotrophic lifestyle (poorly represented by the HIPE-funs; [Figure 5B](#)); a lifestyle that is though not to rely much on effectors during host infection, but rather on toxins. To conclude, our analysis of HIPE-funs confirms the importance of well-established fungal pathogens as agronomical models in both effector biology and molecular plant pathology.

Table 2. Main fungal plant pathogens with the highest number of publications and annual citations based on HIPE-funs.

Fungal pathogen	Rank	Number of publications	Citation rate (per year)	Rank based on Dean <i>et al.</i> , 2012 top 10 list
<i>Blumeria sp.</i>	1	12	240	6
<i>Magnaporthe sp.</i>	2	10	206	1
<i>Leptosphaeria sp.</i>	3	10	136	-
<i>Cladosporium sp.</i>	4	9	171	-
<i>Puccinia sp.</i>	5	9	73	3
<i>Verticillium sp.</i>	6	6	163	-
<i>Melampsora sp.</i>	7	6	121	10
<i>Zymoseptoria sp.</i>	8	6	117	7
<i>Fusarium sp.</i>	9	6	84	4 & 5
<i>Colletotrichum sp.</i>	10	4	124	8
<i>Ustilago sp.</i>	11	4	87	9
<i>Sclerotinia sp.</i>	12	4	67	-
<i>Botrytis sp.</i>	13	2	117	2

Conclusion and outlook

To conclude, the present study shows that top tiers plant pathogen effector biology has developed as a well-structured research area, with key academic actors and objects (*i.e.* molecules or organisms). The study also reveals that the focus of the most cited publications in the field has partially shifted over time, from bacterial pathogens to filamentous pathogens (notably fungi). As an outlook for the next twenty years, we anticipate that the research area will continue to diversify the organisms it addresses (*i.e.* aphids, herbivores, viruses), which may help understand better the diversity of virulence strategies that arose throughout evolution.

Acknowledgments

We acknowledge M. Saubin, F. Zannini, and the members of the UMR IAM for fruitful discussions and continuous support throughout the course of this project. The authors also acknowledge members of the community met over the past ten years at the different meetings of the Effectome network (supported by the INRAE scientific divisions SPE and EFPA) for stimulating discussions on the topic of plant pathogen effectors.

Authors contribution

CL acquired data and wrote the manuscript. CL performed data analysis and interpretation, with inputs from BP and SD. All authors conceived and designed the study, as well as critically revised and edited the manuscript.

Funding

The authors are supported by the Pôle Scientifique A2F of the Université de Lorraine and by the French “Investissement d’Avenir” program ANR- 11-LABX-0002-01, Lab of Excellence ARBRE. Clémentine Louet is supported by a PhD fellowship from the Région Lorraine and the French National Research Agency (ANR-18-CE32-0001, Clonix2D project).

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Emails, ORCIDs, & Correspondence

CL, Clementine.Louet@inrae.fr, ORCID ID 0000-0002-9749-6940

SD, sebastien.duplessis@inrae.fr, ORCID ID 0000-0002-2072-2989

PF, pascal.frey@inrae.fr, ORCID ID 0000-0001-6294-737X

BP, benjamin.petre@univ-lorraine.fr, ORCID ID 0000-0002-3204-4249

Corresponding author: Benjamin PETRE
UMR IAM, Faculté des Sciences et Technologies - site Aiguillettes, entrée 1B, étage 6, 54506, VANDOEUVRE-LES-NANCY, France

References

Anderson, R.G., Deb, D., Fedkenheuer, K. and McDowell, J.M. (2015) Recent progress in RXLR effector research. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **28**, 1063–1072.

Dean, R., Kan, J.A.L. Van, Pretorius, Z.A., et al. (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. **13**, 414–430.

Figueroa, M., Hammond-Kosack, K.E. and Solomon, P.S. (2018) A review of wheat diseases—a field perspective. *Molecular Plant Pathology*. **19**, 1523–1536.

Fones, H.N., Bebbler, D.P., Chaloner, T.M., Kay, W.T., Steinberg, G. and Gurr, S.J. (2020) Threats to global food security from emerging fungal and oomycete crop pathogens. *Nature Food*. **1**, 332–342.

Jones, J.D.G. and Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature*. **444**, 323–329.

Petre, B., Louet, C., Lintz, J. and Duplessis, S. (2021) 2000-2019: twenty years of highly influential publications in plant immunity.

Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S.J., Esker, P., McRoberts, N. and Nelson, A. (2019) The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology and Evolution*. **3**, 430–439.

Talbot, N.J. (2003) On the trail of a cereal killer: exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Microbiology*. **57**, 177–202.

Tyler, B.M., Kale, S.D., Wang, Q., et al. (2013) Microbe-independent entry of oomycete RxLR effectors and fungal RxLR-like effectors into plant and animal cells is specific and reproducible. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **26**, 611–616.

Wawra, S., Djamei, A., Albert, I., Nürnberger, T., Kahmann, R. and West, P. Van (2013) In vitro translocation experiments with RxLR-reporter fusion proteins of Avr1b from *Phytophthora sojae* and AVR3a from *Phytophthora infestans* fail to demonstrate specific autonomous uptake in plant and animal cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **26**, 528–536.

Wawra, S., Trusch, F., Matena, A., et al. (2017) The RxLR motif of the host targeting effector AVR3a of *Phytophthora infestans* is cleaved before secretion. *The Plant Cell*. **29**, 1184–1195.

Wilson, R.A. and Talbot, N.J. (2009) Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nature Reviews Microbiology*. **7**, 185–195.

Win, J., Chaparro-Garcia, A., Belhaj, K. and Yoshida, K. (2012) Effector biology of plant-associated organisms: Concepts and perspectives. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. **77**, 235–247.

SUPPLEMENTARY METHODS

Building of the HIPE and HIPE-fun collections

To identify and extract publications in plant pathogen effectors that have been published between 2000 and 2020 and that have been highly cited, we used a step-by-step pipeline that used the Web of Science website as described previously by Petre et al. (2021), with the following modifications. We used the Mendeley software instead of Zotero. We selected publications following searches with three groups of keywords: 'plant pathogen effector', 'plant pathogen avirulence effector' and 'plant pathogen virulence effector'. We defined 12-time periods (2000-2001; 2002-2003; 2004-2005; 2006-2007; 2008-2009; 2010-2011; 2012-2013; 2014-2015; 2016-2017; 2018; 2019; 2020). The last three years have been considered separately due to low citation numbers (grouping them in pairs would have excluded publications from the most recent year). Three publications per year were considered (*e.g.* we selected six publications for the time period 2000-2002 and only three publications for the year 2020). In order to import all the metadata of the publications (*e.g.* PDF, title, abstract, author list, journal, ...), we used the 'Mendeley Web Importer' tool. Finally, we removed all redundant publications between the three different extraction to obtain a collection of 249 non-redundant publications (HIPE collection). In addition, we reformed this step-by-step pipeline included all variations cited above in order to extract a corpus of 100 research articles focused only on fungal pathogens (HIPE-fun collection). We archived both HIPE and HIPE-fun collections in a public Mendeley web folder as follow: 'HIPE collection' (https://www.zotero.org/groups/4410902/hipe_collection/library) and 'HIPE-fun collection' (https://www.zotero.org/groups/4410905/hipe-fun_collection/library).

Categorization of publications into research topics and organisms studied

To group HIPEs according to their research topics, we performed an iterative analytical reading of the publications and keywords aimed

at identifying their main research questions and the organism studied, as described previously (Petre *et al.*, 2021). Throughout this process, we grouped the HIPEs into (i) topics and subtopics according to the main research and specific questions they address or (ii) the pathogenic organisms or group of pathogenic organisms addressed by HIPEs ([Dataset 1](#)). In addition, to evaluate the temporal distribution of the HIPEs within each group cited above, we quantified their number per five-year time frames: 2000-2005, 2006-2010, 2011-2015 and 2016-2020.

Generation of word clouds and analysis of key organisms and molecules

To analyze text content, we built the text files using Microsoft Excel and Text Wrangler softwares, as described previously (Petre *et al.*, 2021). We first manually copied and pasted the relevant text from Mendeley metadata (publication title and abstract) into a Microsoft Excel spreadsheet ([Dataset 1](#)) and we then generated the word clouds containing only words referring to organisms and molecules with filtered text files ([Dataset 2](#)). An accurate quantification of the most frequent words was performed using the online WordClouds generator (<https://www.wordclouds.com/>). To generate Excel spreadsheets with the word occurrences, we imported our filtered text files and we used the 'Word list' function to export them.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure S1

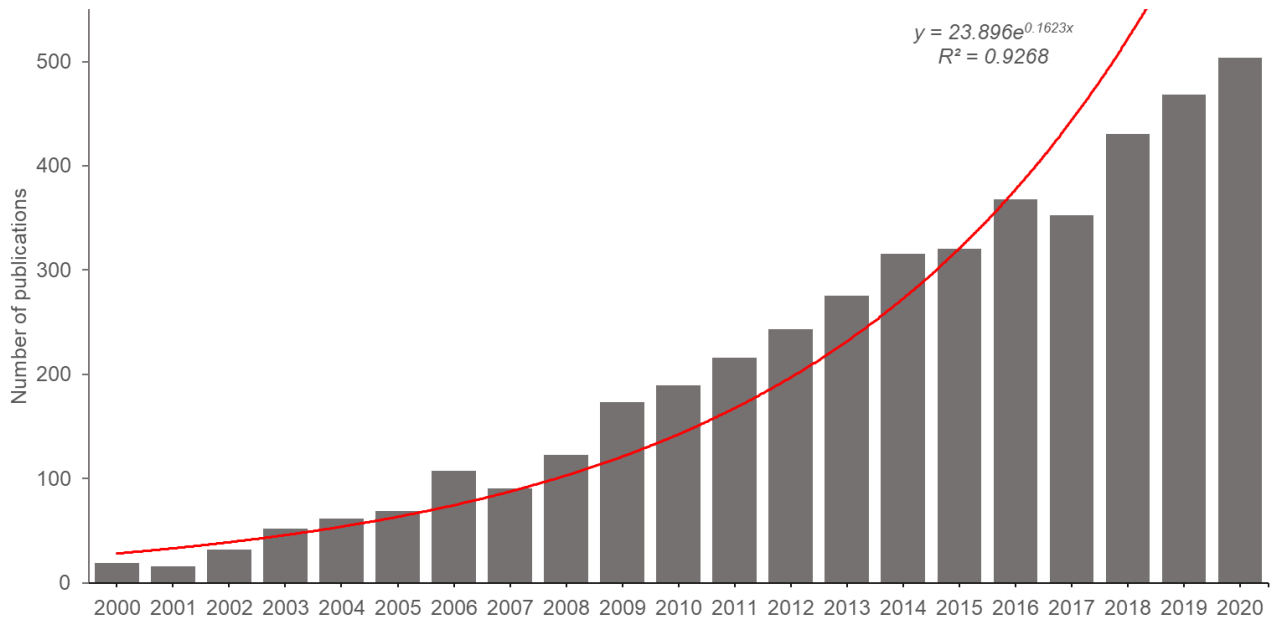


Figure S1. The number of publications pertaining to plant pathogen effectors increases exponentially over time.

Figure S2

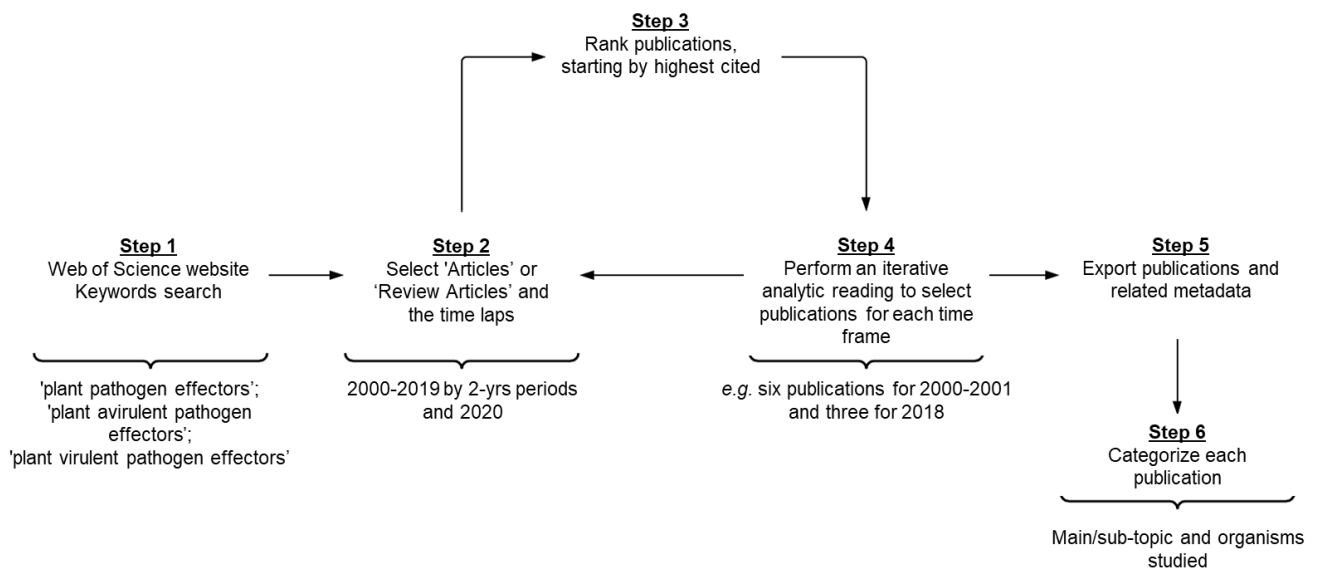
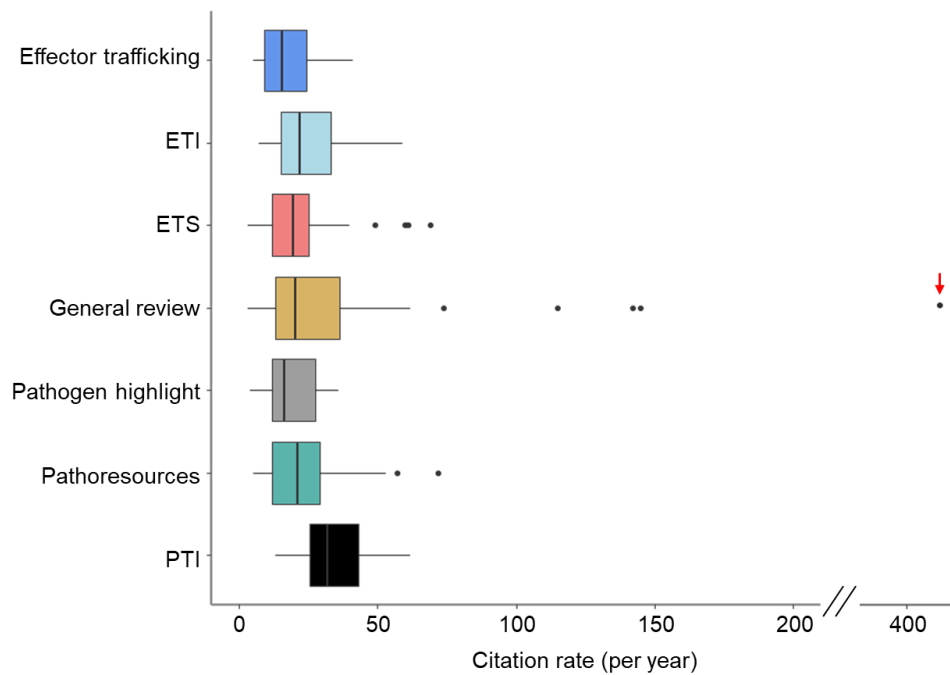


Figure S2. Operational diagram displaying the step-by-step pipeline used to build the HIPE and HIPE-fun collections.

Figure S3**Figure S3. The seven main research topics show comparable citation rates.**

Boxplots indicating the annual citation rate of the seven main research topics addressed by the HIPEs. The red arrow indicates the HIPE with the highest annual citation rate, which corresponds to the 2006 review by Jones and Dangl that presented the seminal zig-zag model of the plant immune system. The raw data used to build this figure are available in the [Dataset 1](#).

Dataset 1. Raw dataset including the 249 HIPEs and main meta data.

Dataset 2. Filtered text file of the 249 HIPE titles and abstracts.

Dataset 3. Raw dataset including the 100 HIPE-funs and main meta data.

SUPPLEMENTARY TEXT

Effector trafficking topic studies how pathogens secrete effectors in the host

The 'Effector trafficking' topic comprises 16 publications (six research articles and ten reviews) that collectively gathered around 4.4k citations. Among them, bacterial studies predominate, as only three publications focused on filamentous pathogens. The topic comprises two subtopics. The 'Type III/IV bacterial system' subtopic comprises 13 publications. The majority address the current knowledge on the Type III secretion system (TTSS) and associated effectors (Alfano and Collmer, 2004; Büttner and Bonas, 2002a; Büttner and Bonas, 2002b; Cornelis and Van Gijsegem, 2000; Galán *et al.*, 2014; He *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2003; Lindeberg *et al.*, 2012) and the Type IV secretion system (Christie, 2001; Christie and Vogel, 2000). On another hand, three publications describe and analyze how *hrp/hrc* genes encode the Hrp (type III secretion) system and other putative effectors as well as its associated secretion mechanisms (Alfano *et al.*, 2000; Collmer *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001). The 'Filamentous pathogen translocation pathways' subtopic comprises three publications. One publication addresses the functioning of the biotrophic interfacial complex (BIC) of *Magnaporthe oryzae* (Khang *et al.*, 2010), and two publications focus on how effectors traffic to the host cell cytosol (Whisson *et al.*, 2007) (Kale *et al.*, 2010).

ETI (Effector-triggered immunity) topic highlights the immune resistance with the specific recognition of effectors

The 'ETI' (Effector-triggered immunity) topic comprises 41 publications (30 research articles and 11 reviews) that collectively gathered around 9.7k citations. Near 76% of those publications emphasize a specific organism (or group of organisms), including notably fungi and bacteria (41 and 27%, respectively). This topic comprises two subtopics. The 'Immune receptor' subtopic comprises 17 publications that summarize and discuss recent findings on the diversity, the structure, and the function of NLRs (nucleotide-binding leucine-rich repeat receptors) (Bai *et al.*, 2012; Belkhadir *et al.*, 2004; Cesari *et al.*, 2014; DeYoung and Innes, 2006; Jubic *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2016; Marchal *et al.*, 2018; Martin *et al.*, 2003; McHale *et al.*, 2006; Pedley and Martin, 2003; Saintenac *et al.*,

2018; Shen *et al.*, 2007; van Der Vossen *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2019a; Wang *et al.*, 2019b; Williams *et al.*, 2014) or compare plant and animal immune systems (Maekawa *et al.*, 2011). The 'Effector recognition' subtopic comprises 24 publications. The first set of publications addresses direct and indirect recognition of pathogens by the plant immune system (Ellis *et al.*, 2007; Kourelis and Van Der Hoorn, 2018; Petit-Houdenot and Fudal, 2017). A second set is focused on the direct recognition model following the gene-for-gene model (Allen *et al.*, 2004; Bourras *et al.*, 2015; Bourras *et al.*, 2019; Dodds *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2005; de Jonge *et al.*, 2012; Navathe *et al.*, 2020; Paulus *et al.*, 2020; Saur *et al.*, 2019; Vleeshouwers *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2006). The last set of publications studies the indirect recognition of pathogen effectors (Tian *et al.*, 2014) following the guard model (Axtell and Staskawicz, 2003; Deslandes *et al.*, 2003; Mackey *et al.*, 2002; Shao *et al.*, 2003) and finally the recognition mediated by NLR-ID following the decoy model (Cesari *et al.*, 2013; Kroj *et al.*, 2016; Le Roux *et al.*, 2015; Sarris *et al.*, 2015; Sarris *et al.*, 2016).

ETS (Effector-triggered susceptibility) topic explains how pathogens deploy effectors to promote infection disease

The 'ETS' (Effector-triggered susceptibility) topic comprises 78 publications (45 research articles and 33 reviews) that collectively gathered around 17k citations. Nearly 94% of those publications emphasize a specific or a group of organisms with a preponderance of bacterial studies in contrast to studies focused on filamentous pathogens (60 and 40%, respectively). This topic comprises five subtopics. The 'Bacteria review' subtopic comprises 17 publications. A first well-defined set of publications summarizes our knowledge on Type III bacterial effectors (Boch and Bonas, 2010; Büttner, 2016; Greenberg and Vinatzer, 2003; Gürlebeck *et al.*, 2006; Macho, 2016; Macho and Zipfel, 2015; Oh and Beer, 2005; Winstanley and Hart, 2001). Another set of publications reviews the recent investigations on intricate molecular interactions with bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity (Abramovitch *et al.*, 2006; Deslandes and Rivas, 2012) and comprises comparative analyses with the fungal pathogens (Hogenhout *et al.*, 2009;

Khan *et al.*, 2018) or animal-specific bacteria (Büttner and Bonas, 2003; Orth, 2002). One publication studies the impact of auxin on pathogenesis and during the interactions with bacterial pathogens (Kunkel and Harper, 2018). Finally, a last set of publications summarize researches on the infection pathways of the genus *Xanthomonas sp.* (Büttner and Bonas, 2010) and more precisely the contribution of transcription activator-like effectors (TALEs) (Perez-Quintero and Szurek, 2019). The 'Effector expression' subtopic comprises two publications and highlights the epigenetic regulation of effector gene expression in the fungus *Leptosphaeria maculans* (Soyer *et al.*, 2014) and the regulation of the *hrp* gene cluster encoding the type III protein secretion system (TTSS) (Noël *et al.*, 2001). The 'Filamentous pathogen review' subtopic comprises 12 publications reviewing the recent findings on fungal effectors (Anderson *et al.*, 2015; Franceschetti *et al.*, 2017; Giraldo and Valent, 2013; Han and Kahmann, 2019; Lo Presti *et al.*, 2015; de Sain and Rep, 2015; Selin *et al.*, 2016; Stergiopoulos *et al.*, 2013; Stergiopoulos and de Wit, 2009; Tsuge *et al.*, 2013), on oomycete effectors (Schornack *et al.*, 2009), and on the use of effectors as cellular probes (Toruño *et al.*, 2016). The 'Functional characterization' subtopic comprises 46 publications. Nearly 71% of those publications study the modulation of immune responses by effectors (Bos *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2019; Gimenez-Ibanez *et al.*, 2009; Göhre *et al.*, 2008; Hou *et al.*, 2019; Houterman *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Mackey *et al.*, 2003; Nomura, 2006; Park *et al.*, 2012; Rooney, 2005; Wang *et al.*, 2016; Weiberg *et al.*, 2013; Xia, 2004; Xiang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010), compare bacterial and fungal modulation of plant immunity (Göhre and Robatzek, 2008), address phytohormone modulation (Gimenez-Ibanez *et al.*, 2014; Kazan and Lyons, 2014; Liu *et al.*, 2014; Plett *et al.*, 2014), or focus on plant trafficking modulation (Aung *et al.*, 2020; Brooks *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2010; DebRoy *et al.*, 2004; de Jonge *et al.*, 2010; Kay *et al.*, 2007; Mentlak *et al.*, 2012; Orth, 2000; Shan *et al.*, 2008; de Torres-Zabala *et al.*, 2007). A second set of publications identifies avirulence genes and validates their Avr activity (Tsiamis *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2017) and highlights the masking model as a counter-defense of pathogen to evade the immune system (Ma *et al.*, 2017; Plissonneau *et al.*, 2016). Five publications

characterize the activity of type III bacterial effectors (Abramovitch *et al.*, 2003; Abramovitch and Martin, 2005; He *et al.*, 2006; Jamir *et al.*, 2004; Nimchuk *et al.*, 2000) and the associated environmental influences (Xin *et al.*, 2016). Finally, two publications study the virulence activity and virulent motifs of effectors secreted by the soybean pathogen *Phytophthora sojae* (Dou *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2015). The 'Structural characterization' subtopic comprises one publication that reports the crystal structure of the TALE PthXo1 of *Xanthomonas oryzae* (Mak *et al.*, 2012).

General review topic conceptualizes our knowledge on plant-pathogen interactions

The 'General review' topic comprises 39 publications (all reviews) that collectively gathered around 18k citations. Nearly 77% of those publications do not emphasize on a specific or a group of organisms. It comprises three subtopics. The 'Host immunity' subtopic comprises 22 publications. A first series of nine publications summarizes recent findings on ETI (Cui *et al.*, 2015; Thordal-Christensen, 2020; Wu *et al.*, 2014), PTI (PAMP-triggered immunity) (Boller and Felix, 2009; Hématy *et al.*, 2009), compares them (Chisholm *et al.*, 2006; Dodds and Rathjen, 2010; Liu *et al.*, 2013; Qiu *et al.*, 2008; Thomma *et al.*, 2011; Tsuda and Katagiri, 2010), or emphasize some taxonomic groups (Liu *et al.*, 2014; Zvereva and Pooggin, 2012). The other set of publications describes the contribution of phytohormones to plant immunity (Zhang and Li, 2019), the regulation and the signaling pathways of host immunity (Feys and Parker, 2000; Hacquard *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020), the antiviral immunity (Calil and Fontes, 2017; Gouveia *et al.*, 2017), the defense priming (Conrath, 2011), or the non-host resistance in plant (Nürnberger and Lipka, 2005). Finally, two publications compare immunity between plants and animals (Staskawicz *et al.*, 2001) and between bacteria and fungi (van't Slot and Knogge, 2002). The 'Pathosystem evolution' subtopic comprises eight publications that summarize our knowledge on evolutionary models and mechanisms of plant-pathogen interactions (Brown and Tellier, 2011; Dong *et al.*, 2015; Frantzeskakis *et al.*, 2019; Raffaele and Kamoun, 2012; Schulze-Lefert and Panstruga, 2011) with a focus on climate change (Velásquez

et al., 2018) and R-Avr (Resistance gene – Avirulence gene) interactions (Białas *et al.*, 2018). Finally, one publication compares the evolution in bacterial and fungal pathosystems (Dou and Zhou, 2012). The 'Recognition model' subtopic comprises nine publications and proposed different conceptual models focused on the plant immune system (Bent and Mackey, 2007; Bonas and Lahaye, 2002; van Der Hoorn and Kamoun, 2008; Jones and Takemoto, 2004; Jones and Dangl, 2006; Nimchuk *et al.*, 2001; Stotz *et al.*, 2014) and comparative analyses with the animal immune system (Jones *et al.*, 2016). Finally, one publication summarizes specifically bacterial recognitions models (Khan *et al.*, 2016).

Pathogen highlight topic emphasizes on specific organisms

The 'Pathogen highlight' topic comprises 12 publications (all reviews) that collectively gathered around 1.6k citations. These reviews emphasize bacteria (6), fungi (4), oomycetes (1) and nematodes (1). It comprises three subtopics. The 'Bacterium' subtopic comprises six publications and summarize recent findings on the genera *Xanthomonas* (An *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2020; Niño-Liu *et al.*, 2006; Timilsina *et al.*, 2020) and *Pseudomonas* (Xin *et al.*, 2018; Xin and He, 2013). The 'Filamentous pathogen' subtopic comprises five publications and summarize recent findings on the oomycete *Phytophthora infestans* (Fry, 2008), the fungus *Cladosporium fulvum* (de Wit, 2016), the rust fungi (Lorrain *et al.*, 2019), the mycorrhizal fungi (Genre *et al.*, 2020) and an overview of selected fungal species with a focus on PAMPs and associated effectors (de Wit *et al.*, 2009). The 'nematode' subtopic comprises one publication on the model species *Caenorhabditis elegans* (Alegado *et al.*, 2003).

Pathoresources uses omics approaches and technological innovations to study plant-pathogen interactions

The 'Pathoresources' topic comprises 53 publications (42 research articles and 11 reviews) that collectively gathered around 11k citations. It comprises three subtopics. The 'Omic data' subtopic comprises 41 publications. Almost half of those publications provides genomic data (Baltrus *et al.*, 2011; Buell *et al.*, 2003; Cooke *et al.*, 2012; Dale *et al.*, 2019; Duan *et al.*, 2009; Faino *et al.*, 2016; Genin and

Boucher, 2004; Genin and Denny, 2012; Grandaubert *et al.*, 2014; Haas *et al.*, 2009; Joardar *et al.*, 2005; Kema *et al.*, 2018; Laflamme *et al.*, 2020; Levy *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2020; O'Connell *et al.*, 2012; Rouxel *et al.*, 2011; Salanoubat *et al.*, 2002; Spanu *et al.*, 2010; Thieme *et al.*, 2005; Tyler *et al.*, 2006; Wyatt *et al.*, 2020; Yoshida *et al.*, 2009) and four publications perform comparative analyses of genomic data (Fouché *et al.*, 2018; Fouché *et al.*, 2020; Spanu, 2012; de Wit *et al.*, 2012). A second set of publications reports effectoromic analyses (Jiang *et al.*, 2008; Vleeshouwers *et al.*, 2008), secretomic analyses (Bos *et al.*, 2010; Kamoun, 2006; Kamoun, 2007; Poueymiro and Genin, 2009; Vincent *et al.*, 2020), transcriptomic analyses (Rudd *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2011) and studies of the effector-target interactome network (Mukhtar *et al.*, 2011; Weßling *et al.*, 2014). Finally, three publications describe the pathogen–host interactions database (PHI-base) providing curated molecular and biological information on gene catalogues associated with pathogen–host interactions (Urban *et al.*, 2015; Urban *et al.*, 2017; Urban *et al.*, 2020). The 'Lab tool' subtopic comprises three publications and describe molecular genetic tools to enhance lab investigations for a better comprehension of plant-pathogen interactions (Fang and Tyler, 2016; Ghislain *et al.*, 2019; Nowara *et al.*, 2010). Finally, the 'Computational prediction' subtopic comprises nine publications which describe pipelines to identify and characterize effectors of filamentous pathogens (Saunders *et al.*, 2012; Sperschneider *et al.*, 2016; Sperschneider *et al.*, 2017; Sperschneider *et al.*, 2018a; Sperschneider *et al.*, 2018b), of bacteria (Chang *et al.*, 2005; Collmer *et al.*, 2002; Lindeberg *et al.*, 2005), or to annotate NLRs (Steuernagel *et al.*, 2020).

PTI topic describes the basal disease resistance of plant

The 'PTI' topic comprises ten publications (four research articles and six reviews) that collectively gathered around 2.7k citations. Among them, five publications do not focus on a specific organism or a group of organisms, four study specifically focus on a bacterium and only one on a fungus. It comprises two subtopics. The 'Pattern-recognition receptor' (PRR) subtopic comprises two publications. These two reviews summarize and discuss recent findings on plant PRRs, their diversity to recognize different

ligands, and the ability of pathogen effectors to interfere with early PRR signaling (Tang *et al.*, 2017; Zipfel, 2009). The 'Signaling mechanisms' subtopic comprises eight publications. Four publications describe downstream molecular events with: two summarize the complex network of signaling pathways occurring during PTI with an emphasis on mitogen-activated protein kinases (MAPK) and effectors employed to suppress it (Bigeard *et al.*, 2015; Meng and Zhang, 2013); and two highlight the activity of MAPK4 (Qiu *et al.*, 2008) and BIK1 (Lu *et al.*, 2010) in the early signaling pathways and effectors associated with that process. On another hand, two publications study the contribution of phytohormones to the effector recognition (Tsuda and Katagiri, 2010; Yang *et al.*, 2019), one addresses the role of reactive oxygen species (ROS) in signaling and defense reactions against filamentous fungi and fungal effectors that suppress the host oxidative burst (Heller and Tudzynski, 2011), and one provides evidence of calcium-dependent PAMP-triggered immunity in plants (Tian *et al.*, 2019).

References

- Abramovitch, R.B., Anderson, J.C. and Martin, G.B.** (2006) Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 601–611.
- Abramovitch, R.B., Kim, Y.J., Chen, S., Dickman, M.B. and Martin, G.B.** (2003) *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *The EMBO Journal* **22**, 60–69.
- Abramovitch, R.B. and Martin, G.B.** (2005) AvrPtoB: a bacterial type III effector that both elicits and suppresses programmed cell death associated with plant immunity. *FEMS Microbiology Letters* **245**, 1–8.
- Alegado, R.A., Campbell, M.C., Chen, W.C., Slutz, S.S. and Tan, M.W.** (2003) Characterization of mediators of microbial virulence and innate immunity using the *Caenorhabditis elegans* host-pathogen model. *Cellular Microbiology* **5**, 435–444.
- Alfano, J.R., Charkowski, A.O., Deng, W.L., Badel, J.L., Petnicki-Ocwieja, T., Van Dijk, K. and Collmer, A.** (2000) The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity. *PNAS* **97**, 4856–4861.
- Alfano, J.R. and Collmer, A.** (2004) Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 385–414.
- Allen, R.L., Bittner-Eddy, P.D., Grenville-Briggs, L.J., Meitz, J.C., Rehmany, A.P., Rose, L.E. and Beynon, J.L.** (2004) Host-parasite coevolutionary conflict between *Arabidopsis* and downy mildew. *Science* **306**, 1957–1960.
- An, S.Q., Potnis, N., Dow, M., et al.** (2020) Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. *FEMS Microbiology Reviews* **44**, 1–32.
- Anderson, R.G., Deb, D., Fedkenheuer, K. and McDowell, J.M.** (2015) Recent progress in RXLR effector research. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **28**, 1063–1072.
- Aung, K., Kim, P., Li, Z., Joe, A., Kvitko, B., Alfano, J.R. and Hea, S.Y.** (2020) Pathogenic bacteria target plant plasmodesmata to colonize and invade surrounding tissues. *The Plant Cell* **32**, 595–611.
- Axtell, M.J. and Staskawicz, B.J.** (2003) Initiation of *RPS2*-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* **112**, 369–377.
- Bai, S., Liu, J., Chang, C., et al.** (2012) Structure-function analysis of barley NLR immune receptor MLA10 reveals its cell compartment specific activity in cell death and disease resistance. *PLoS Pathogens* **8**, e1002752.
- Baltrus, D.A., Nishimura, M.T., Romanchuk, A., et al.** (2011) Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *PLoS Pathogens* **7**, e1002132.
- Belkhadir, Y., Subramaniam, R. and Dangi, J.L.** (2004) Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 391–399.
- Bent, A.F. and Mackey, D.** (2007) Elicitors, effectors, and *R* genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annual Review of Phytopathology* **45**, 399–436.
- Bialas, A., Zess, E.K., De La Concepcion, J.C., et al.** (2018) Lessons in effector and NLR biology of plant-microbe systems. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **31**, 34–45.
- Bigeard, J., Colcombet, J. and Hirt, H.** (2015) Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular Plant* **8**, 521–539.
- Boch, J. and Bonas, U.** (2010) *Xanthomonas*

- AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annual Review of Phytopathology* **48**, 419–436.
- Boller, T. and 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**, 379–407.
- Bonas, U. and Lahaye, T.** (2002) Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: Refined models of specific recognition. *Current Opinion in Microbiology* **5**, 44–50.
- Bos, J.I.B., Kanneganti, T.D., Young, C., Cakir, C., Huitema, E., Win, J., Armstrong, M.R., Birch, P.R.J. and Kamoun, S.** (2006) The C-terminal half of *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Journal* **48**, 165–176.
- Bos, J.I.B., Prince, D., Pitino, M., Maffei, M.E., Win, J. and Hogenhout, S.A.** (2010) A functional genomics approach identifies candidate effectors from the aphid species *Myzus persicae* (green peach aphid). *PLoS Genetics* **6**, e1001216.
- Bourras, S., Kunz, L., Xue, M., et al.** (2019) The *AvrPm3-Pm3* effector-NLR interactions control both race-specific resistance and host-specificity of cereal mildews on wheat. *Nature Communications* **10**, 2292.
- Bourras, S., McNally, K.E., Ben-David, R., et al.** (2015) Multiple avirulence loci and allele-specific effector recognition control the *Pm3* race-specific resistance of wheat to powdery mildew. *The Plant Cell* **27**, 2991–3012.
- Brooks, D.M., Bender, C.L. and Kunkel, B.N.** (2005) The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology* **6**, 629–639.
- Brown, J.K.M. and Tellier, A.** (2011) Plant-parasite coevolution: bridging the gap between genetics and ecology. *Annual Review of Phytopathology* **49**, 345–367.
- Buell, C.R., Joardar, V., Lindeberg, M., et al.** (2003) The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *PNAS* **100**, 10181–10186.
- Büttner, D.** (2016) Behind the lines-actions of bacterial type III effector proteins in plant cells. *FEMS Microbiology Reviews* **40**, 894–937.
- Büttner, D. and Bonas, U.** (2003) Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 312–319.
- Büttner, D. and Bonas, U.** (2002a) Getting across - bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *The EMBO Journal* **21**, 5313–5322.
- Büttner, D. and Bonas, U.** (2002b) Port of entry - the type III secretion translocon. *Trends in Microbiology* **10**, 186–192.
- Büttner, D. and Bonas, U.** (2010) Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiology Reviews* **34**, 107–133.
- Calil, I.P. and Fontes, E.P.B.** (2017) Plant immunity against viruses: antiviral immune receptors in focus. *Annals of Botany* **119**, 711–723.
- Cesari, S., Kanzaki, H., Fujiwara, T., et al.** (2014) The NB-LRR proteins RGA4 and RGA5 interact functionally and physically to confer disease resistance. *The EMBO Journal* **33**, 1941–1959.
- Cesari, S., Thilliez, G., Ribot, C., 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**, 1463–1481.
- Chang, J.H., Urbach, J.M., Law, T.F., Arnold, L.W., Hu, A., Gombar, S., Grant, S.R., Ausubel, F.M. and Dangl, J.L.** (2005) A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. *PNAS* **102**, 2549–2554.
- Chen, L.Q., Hou, B.H., Lalonde, S., et al.** (2010) Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468**, 527–532.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B. and Staskawicz, B.J.** (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**, 803–814.
- Christie, P.J.** (2001) Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Molecular Microbiology* **40**, 294–305.
- Christie, P.J. and Vogel, J.P.** (2000) Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends in Microbiology* **8**, 354–360.
- Collmer, A., Badel, J.L., Charkowski, A.O., et al.** (2000) *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. *PNAS* **97**, 8770–8777.
- Collmer, A., Lindeberg, M., Petnicki-Ocwieja,**

- T., Schneider, D.J. and Alfano, J.R.** (2002) Genomic mining type III secretion system effectors in *Pseudomonas syringae* yields new picks for all TTSS prospectors. *Trends in Microbiology* **10**, 462–469.
- Conrath, U.** (2011) Molecular aspects of defence priming. *Trends in Plant Science* **16**, 524–531.
- Cooke, D.E.L., Cano, L.M., Raffaele, S., et al.** (2012) Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the Irish potato famine pathogen. *PLoS Pathogens* **8**, e1002940.
- Cornelis, G.R. and Gijsegem, F. Van** (2000) Assembly and function of type III secretory systems. *Annual Review of Microbiology* **54**, 735–774.
- Cui, H., Tsuda, K. and Parker, J.E.** (2015) Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annual Review of Plant Biology* **66**, 487–511.
- Dale, A.L., Feau, N., Everhart, S.E., et al.** (2019) Mitotic recombination and rapid genome evolution in the invasive forest pathogen *Phytophthora ramorum*. *mBio* **10**, e02452-18.
- DeRoy, S., Thilmony, R., Kwack, Y.-B., Nomura, K. and He, S.Y.** (2004) A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. *PNAS* **101**, 9927–9932.
- de Jonge, R., Van Esse, H.P., Kombrink, A., et al.** (2010) Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science* **329**, 953–955.
- de Jonge, R., Van Esse, H.P., Maruthachalam, K., et al.** (2012) Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing. *PNAS* **109**, 5110–5115.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D.X., Khounloham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S. and Marco, Y.** (2003) Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *PNAS* **100**, 8024–8029.
- Deslandes, L. and Rivas, S.** (2012) Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends in Plant Science* **17**, 644–655.
- de Torres-Zabala, M., Truman, W., Bennett, M.H., Lafforgue, G., Mansfield, J.W., Rodriguez Egea, P., Bögre, L. and Grant, M.** (2007) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* hijacks the *Arabidopsis* abscisic acid signalling pathway to cause disease. *The EMBO Journal* **26**, 1434–1443.
- de Wit, P.J.G.M.** (2016) *Cladosporium fulvum* effectors: weapons in the arms race with tomato. *Annual Review of Phytopathology* **54**, 1–23.
- de Wit, P.J.G.M., Van Der Burgt, A., Ökmen, B., et al.** (2012) The genomes of the fungal plant pathogens *Cladosporium fulvum* and *Dothistroma septosporum* reveal adaptation to different hosts and lifestyles but also signatures of common ancestry. *PLoS Genetics* **8**, e1003088.
- de Wit, P.J.G.M., Mehrabi, R., Van Den Burg, H.A. and Stergiopoulos, I.** (2009) Fungal effector proteins: past, present and future. *Molecular Plant Pathology* **10**, 735–747.
- DeYoung, B.J. and Innes, R.W.** (2006) Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nature Immunology* **7**, 1243–1249.
- Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Catanzariti, A.-M., Teh, T., Wang, C.-I.A., Ayliffe, M.A., Kobe, B. and Ellis, J.G.** (2006) Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *PNAS* **103**, 8888–8893.
- Dodds, P.N. and Rathjen, J.P.** (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* **11**, 539–548.
- Dong, S., Raffaele, S. and Kamoun, S.** (2015) The two-speed genomes of filamentous pathogens: Waltz with plants. *Current Opinion in Genetics and Development* **35**, 57–65.
- Dou, D., Kale, S.D., Wang, Xinle, et al.** (2008) Conserved C-terminal motifs required for avirulence and suppression of cell death by *Phytophthora sojae* effector Avr1b. *The Plant Cell* **20**, 1118–1133.
- Dou, D. and Zhou, J.M.** (2012) Phytopathogen effectors subverting host immunity: different foes, similar battleground. *Cell Host and Microbe* **12**, 484–495.
- Duan, Y., Zhou, L., Hall, D.G., et al.** (2009) Complete genome sequence of citrus huanglongbing bacterium, “*Candidatus liberibacter asiaticus*” obtained through metagenomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**, 1011–1020.
- Ellis, J.G., Dodds, P.N. and Lawrence, G.J.** (2007) Flax rust resistance gene specificity is based on direct resistance-avirulence protein interactions. *Annual Review of Phytopathology* **45**, 289–306.
- Faino, L., Seidl, M.F., Shi-Kunne, X., Pauper, M., Van Den Berg, G.C.M., Wittenberg, A.H.J. and Thomma, B.P.H.J.** (2016)

- Transposons passively and actively contribute to evolution of the two-speed genome of a fungal pathogen. *Genome Research* **26**, 1091–1100.
- Fang, Y. and Tyler, B.M.** (2016) Efficient disruption and replacement of an effector gene in the oomycete *Phytophthora sojae* using CRISPR/Cas9. *Molecular Plant Pathology* **17**, 127–139.
- Feng, F., Yang, F., Rong, W., Wu, X., Zhang, J., Chen, S., He, C. and Zhou, J.M.** (2012) A *Xanthomonas* uridine 5'-monophosphate transferase inhibits plant immune kinases. *Nature* **485**, 114–118.
- Feys, B.J. and Parker, J.E.** (2000) Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics* **16**, 449–455.
- Fouché, S., Badet, T., Oggenfuss, U., Plissonneau, C., Francisco, C.S. and Croll, D.** (2020) Stress-Driven Transposable Element Depression Dynamics and Virulence Evolution in a Fungal Pathogen. *Molecular Biology and Evolution* **37**, 221–239.
- Fouché, S., Plissonneau, C. and 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. and Banfield, M.J.** (2017) Effectors of filamentous plant pathogens: commonalities amid diversity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **81**, e00066-16.
- Frantzeskakis, L., Di Pietro, A., Rep, M., Schirawski, J., Wu, C.H. and Panstruga, R.** (2019) Rapid evolution in plant–microbe interactions – a molecular genomics perspective. *New Phytologist* **225**, 1134–1142.
- Fry, W.** (2008) *Phytophthora infestans*: the plant (and *R* gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology* **9**, 385–402.
- Galán, J.E., Lara-Tejero, M., Marlovits, T.C. and Wagner, S.** (2014) Bacterial type III secretion systems: Specialized nanomachines for protein delivery into target cells. *Annual Review of Microbiology* **68**, 415–438.
- Gao, F., Zhang, B., Sen, Zhao, J.H., Huang, J.F., Jia, P.S., Wang, S., Zhang, J., Zhou, J.M. and Guo, H.S.** (2019) Deacetylation of chitin oligomers increases virulence in soil-borne fungal pathogens. *Nature Plants* **5**, 1167–1176.
- Genin, S. and Boucher, C.** (2004) Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 107–134.
- Genin, S. and Denny, T.P.** (2012) Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annual Review of Phytopathology* **50**, 67–89.
- Genre, A., Lanfranco, L., Perotto, S. and Bonfante, P.** (2020) Unique and common traits in mycorrhizal symbioses. *Nature Reviews Microbiology* **18**, 649–660.
- Ghislain, M., Byarugaba, A.A., Magembe, E., et al.** (2019) Stacking three late blight resistance genes from wild species directly into African highland potato varieties confers complete field resistance to local blight races. *Plant Biotechnology Journal* **17**, 1119–1129.
- Gimenez-Ibanez, S., Boter, M., Fernández-Barbero, G., Chini, A., Rathjen, J.P. and Solano, R.** (2014) The bacterial effector HopX1 targets JAZ transcriptional repressors to activate jasmonate signaling and promote infection in Arabidopsis. *PLoS Biology* **12**, e1001792.
- Gimenez-Ibanez, S., Hann, D.R., Ntoukakis, V., Petutschnig, E., Lipka, V. and Rathjen, J.P.** (2009) AvrPtoB targets the LysM receptor kinase CERK1 to promote bacterial virulence on plants. *Current Biology* **19**, 423–429.
- Giraldo, M.C. and Valent, B.** (2013) Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nature Reviews Microbiology* **11**, 800–814.
- Göhre, V. and Robatzek, S.** (2008) Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual Review of Phytopathology* **46**, 189–215.
- Göhre, V., Spallek, T., Häweker, H., Mersmann, S., Mentzel, T., Boller, T., de Torres, M., Mansfield, J.W. and Robatzek, S.** (2008) Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Current Biology* **18**, 1824–1832.
- Gouveia, B.C., Calil, I.P., Machado, J.P.B., Santos, A.A. and Fontes, E.P.B.** (2017) Immune receptors and co-receptors in antiviral innate immunity in plants. *Frontiers in Microbiology* **7**, 2139.
- Grandaubert, J., Lowe, R.G.T., Soyer, J.L., et al.** (2014) Transposable element-assisted evolution and adaptation to host plant within the *Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa* species complex of fungal pathogens. *BMC Genomics* **15**, 891.
- Greenberg, J.T. and Vinatzer, B.A.** (2003) Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cells. *Current Opinion in Microbiology* **6**, 20–28.
- Gu, K., Yang, B., Tian, D., et al.** (2005) *R* gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature* **435**, 1122–1125.

- Gürlebeck, D., Thieme, F. and Bonas, U.** (2006) Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *Journal of Plant Physiology* **163**, 233–255.
- Haas, B.J., Kamoun, S., Zody, M.C., et al.** (2009) Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* **461**, 393–398.
- Hacquard, S., Spaepen, S., Garrido-Oter, R. and Schulze-Lefert, P.** (2017) Interplay between innate immunity and the plant microbiota. *Annual Review of Phytopathology* **55**, 565–589.
- Han, X. and Kahmann, R.** (2019) Manipulation of phytohormone pathways by effectors of filamentous plant pathogens. *Frontiers in Plant Science* **10**, 822.
- He, P., Shan, L., Lin, N.C., Martin, G.B., Kemmerling, B., Nürnberger, T. and Sheen, J.** (2006) Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity. *Cell* **125**, 563–575.
- He, S.Y., Nomura, K. and Whittam, T.S.** (2004) Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *BBA* **1694**, 181–206.
- Heller, J. and Tudzynski, P.** (2011) Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease. *Annual Review of Phytopathology* **49**, 369–390.
- Hématy, K., Cherk, C. and Somerville, S.** (2009) Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 406–413.
- Hogenhout, S.A., Van Der Hoorn, R.A.L., Terauchi, R. and Kamoun, S.** (2009) Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**, 115–122.
- Hou, Y., Zhai, Y., Feng, L., et al.** (2019) A *Phytophthora* effector suppresses trans-kingdom RNAi to promote disease susceptibility. *Cell Host and Microbe* **25**, 153-165.e5.
- Houterman, P.M., Cornelissen, B.J.C. and Rep, M.** (2008) Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. *PLoS Pathogens* **4**.
- Jamir, Y., Guo, M., Oh, H.S., Petnicki-Ocwieja, T., Chen, S., Tang, X., Dickman, M.B., Collmer, A. and Alfano, J.R.** (2004) Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast. *The Plant Journal* **37**, 554–565.
- Jiang, R.H.Y., Tripathy, S., Govers, F. and Tyler, B.M.** (2008) RXLR effector reservoir in two *Phytophthora* species is dominated by a single rapidly evolving superfamily with more than 700 members. *PNAS* **105**, 4874–4879.
- Jin, Q., Thilmony, R., Zwiesler-Vollick, J. and He, S.Y.** (2003) Type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Microbes and Infection* **5**, 301–310.
- Joardar, V., Lindeberg, M., Jackson, R.W., et al.** (2005) Whole-genome sequence analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition. *Journal of Bacteriology* **187**, 6488–6498.
- Jones, D.A. and Takemoto, D.** (2004) Plant innate immunity - direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Current Opinion in Immunology* **16**, 48–62.
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L.** (2006) The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329.
- Jones, J.D.G., Vance, R.E. and Dangl, J.L.** (2016) Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Science* **354**, aaf6395.
- Jubic, L.M., Saile, S., Furzer, O.J., Kasmi, F. El and Dangl, J.L.** (2019) Help wanted: helper NLRs and plant immune responses. *Current Opinion in Plant Biology* **50**, 82–94.
- Kale, S.D., Gu, B., Capelluto, D.G.S., et al.** (2010) External lipid PI3P mediates entry of eukaryotic pathogen effectors into plant and animal host cells. *Cell* **142**, 284–295.
- Kamoun, S.** (2006) A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Review of Phytopathology* **44**, 41–60.
- Kamoun, S.** (2007) Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 358–365.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G. and Bonas, U.** (2007) A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* **318**, 648–651.
- Kazan, K. and Lyons, R.** (2014) Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors. *The Plant Cell* **26**, 2285–2309.
- Kema, G.H.J., Mirzadi Gohari, A., Aouini, L., et al.** (2018) Stress and sexual reproduction affect the dynamics of the wheat pathogen effector AvrStb6 and strobilurin resistance. *Nature Genetics* **50**, 375–380.
- Khan, M., Seto, D., Subramaniam, R. and Desveaux, D.** (2018) Oh, the places they'll go! A survey of phytopathogen effectors and their host targets. *The Plant Journal* **93**, 651–663.

- Khan, M., Subramaniam, R. and Desveaux, D.** (2016) Of guards, decoys, baits and traps: pathogen perception in plants by type III effector sensors. *Current Opinion in Microbiology* **29**, 49–55.
- Khang, C.H., Berruyer, R., Giraldo, M.C., Kankanala, P., Park, S.Y., Czymmek, K., Kang, S. and Valent, B.** (2010) Translocation of *Magnaporthe oryzae* effectors into rice cells and their subsequent cell-to-cell movement. *The Plant Cell* **22**, 1388–1403.
- Kim, M.G., Da Cunha, L., McFall, A.J., Belkhadir, Y., DebRoy, S., Dangl, J.L. and Mackey, D.** (2005) Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in *Arabidopsis*. *Cell* **121**, 749–759.
- Kourelis, J. and Van Der Hoorn, R.A.L.** (2018) Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function. *The Plant Cell* **30**, 285–299.
- Kroj, T., Chanclud, E., Michel-Romiti, C., Grand, X. and Morel, J.B.** (2016) Integration of decoy domains derived from protein targets of pathogen effectors into plant immune receptors is widespread. *New Phytologist* **210**, 618–626.
- Kumar, A., Kumar, R., Sengupta, D., et al.** (2020) Deployment of genetic and genomic tools toward gaining a better understanding of rice-*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* interactions for development of durable bacterial blight resistant rice. *Frontiers in Plant Science* **11**, 1152.
- Kunkel, B.N. and Harper, C.P.** (2018) The roles of auxin during interactions between bacterial plant pathogens and their hosts. *Journal of Experimental Botany* **69**, 245–254.
- Laflamme, B., Dillon, M.M., Martel, A., Almeida, R.N.D., Desveaux, D. and Guttman, D.S.** (2020) The pan-genome effector-triggered immunity landscape of a host-pathogen interaction. *Science* **367**, 763–768.
- Lee, J., Klüsener, B., Tsiamis, G., et al.** (2001) HrpZPsph from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore *in vitro*. *PNAS* **98**, 289–294.
- Le Roux, C., Huet, G., Jauneau, A., et al.** (2015) A receptor pair with an integrated decoy converts pathogen disabling of transcription factors to immunity. *Cell* **161**, 1074–1088.
- Levy, A., Salas Gonzalez, I., Mittelviehhaus, M., et al.** (2018) Genomic features of bacterial adaptation to plants. *Nature Genetics* **50**, 138–150.
- Li, X., Lin, H., Zhang, W., Zou, Y., Zhang, J., Tang, X. and Zhou, J.M.** (2005) Flagellin induces innate immunity in nonhost interactions that is suppressed by *Pseudomonas syringae* effectors. *PNAS* **102**, 12990–12995.
- Li, Y., Xia, C., Wang, M., Yin, C. and Chen, X.** (2020) Whole-genome sequencing of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* mutant isolates identifies avirulence gene candidates. *BMC Genomics* **21**, 247.
- Lindeberg, M., Cunnac, S. and Collmer, A.** (2012) *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in endless arguments. *Trends in Microbiology* **20**, 199–208.
- Lindeberg, M., Stavrinides, J., Chang, J.H., Alfano, J.R., Collmer, A., Dangl, J.L., Greenberg, J.T., Mansfield, J.W. and Guttman, D.S.** (2005) Proposed guidelines for a unified nomenclature and phylogenetic analysis of type III hop effector proteins in the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**, 275–282.
- Liu, T., Song, T., Zhang, X., et al.** (2014) Unconventionally secreted effectors of two filamentous pathogens target plant salicylate biosynthesis. *Nature Communications* **5**, 4686.
- Liu, W., Liu, J., Ning, Y., Ding, B., Wang, X., Wang, Z. and Wang, G.L.** (2013) Recent progress in understanding PAMP-and effector-triggered immunity against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant* **6**, 605–620.
- Liu, W., Liu, J., Triplett, L., Leach, J.E. and Wang, G.L.** (2014) Novel insights into rice innate immunity against bacterial and fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **52**, 213–241.
- Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., Zuccaro, A., Reissmann, S. and Kahmann, R.** (2015) Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual Review of Plant Biology* **66**, 513–545.
- Lorrain, C., Gonçalves dos Santos, K.C., Germain, H., Hecker, A. and Duplessis, S.** (2019) Advances in understanding obligate biotrophy in rust fungi. *New Phytologist* **222**, 1190–1206.
- Lu, D., Wu, S., Gao, X., Zhang, Y., Shan, L. and He, P.** (2010) A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *PNAS* **107**, 496–501.
- Lu, X., Kracher, B., Saur, I.M.L., Bauer, S., Ellwood, S.R., Wise, R., Yaeno, T., Maekawa, T. and Schulze-Lefert, P.** (2016) Allelic barley MLA immune receptors recognize sequence-unrelated avirulence effectors of the powdery

- mildew pathogen. *PNAS* **113**, E6486–E6495.
- Ma, Z., Song, T., Zhu, L., et al.** (2015) A *Phytophthora sojae* glycoside hydrolase 12 protein is a major virulence factor during soybean infection and is recognized as a PAMP. *The Plant Cell* **27**, 2057–2072.
- Ma, Z., Zhu, L., Song, T., et al.** (2017) A paralogous decoy protects *Phytophthora sojae* apoplastic effector PsXEG1 from a host inhibitor. *Science* **355**, 710–714.
- Macho, A.P.** (2016) Subversion of plant cellular functions by bacterial type-III effectors: beyond suppression of immunity. *New Phytologist* **210**, 51–57.
- Macho, A.P. and Zipfel, C.** (2015) Targeting of plant pattern recognition receptor-triggered immunity by bacterial type-III secretion system effectors. *Current Opinion in Microbiology* **23**, 14–22.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R. and Dangl, J.L.** (2003) *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* **112**, 379–389.
- Mackey, D., Holt, B.F., Wiig, A. and Dangl, J.L.** (2002) RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* **108**, 743–754.
- Maekawa, T., Kufer, T.A. and Schulze-Lefert, P.** (2011) NLR functions in plant and animal immune systems: so far and yet so close. *Nature Immunology* **12**, 818–826.
- Mak, A.N.S., Bradley, P., Cernadas, R.A., Bogdanove, A.J. and Stoddard, B.L.** (2012) The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science* **335**, 716–719.
- Marchal, C., Zhang, J., Zhang, P., et al.** (2018) BED-domain-containing immune receptors confer diverse resistance spectra to yellow rust. *Nature Plants* **4**, 662–668.
- Martin, G.B., Bogdanove, A.J. and Sessa, G.** (2003) Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 23–61.
- McHale, L., Tan, X., Koehl, P. and Michelmore, R.W.** (2006) Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biology* **7**, 212.
- Meng, X. and Zhang, S.** (2013) MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual Review of Phytopathology* **51**, 245–266.
- Mentlak, T.A., Kombrink, A., Shinya, T., et al.** (2012) Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. *The Plant Cell* **24**, 322–335.
- Mukhtar, M.S., Carvunis, A.R., Dreze, M., et al.** (2011) Independently evolved virulence effectors converge onto hubs in a plant immune system network. *Science* **333**, 596–601.
- Navathe, S., Yadav, P.S., Chand, R., Mishra, V.K., Vasistha, N.K., Meher, P.K., Joshi, A.K. and Gupta, P.K.** (2020) ToxA-TSN1 interaction for spot blotch susceptibility in Indian wheat: an example of inverse gene-for-gene relationship. *Plant Disease* **104**, 71–81.
- Nimchuk, Z., Marois, E., Kjemtrup, S., Leister, R.T., Katagiri, F. and Dangl, J.L.** (2000) Eukaryotic fatty acylation drives plasma membrane targeting and enhances function of several type III effector proteins from *Pseudomonas syringae*. *Cell* **101**, 353–363.
- Nimchuk, Z., Rohmer, L., Chang, J.H. and Dangl, J.L.** (2001) Knowing the dancer from the dance: *R*-gene products and their interactions with other proteins from host and pathogen. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 288–294.
- Niño-Liu, D.O., Ronald, P.C. and Bogdanove, A.J.** (2006) *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. *Molecular Plant Pathology* **7**, 303–324.
- Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D. and Bonas, U.** (2001) cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular Microbiology* **41**, 1271–1281.
- Nomura, K.** (2006) A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science* **313**, 220–223.
- Nowara, D., Schweizer, P., Gay, A., Lacomme, C., Shaw, J., Ridout, C., Douchkov, D., Hensel, G. and Kumlehn, J.** (2010) HIGS: Host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *The Plant Cell* **22**, 3130–3141.
- Nürnberg, T. and Lipka, V.** (2005) Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology* **6**, 335–345.
- O’Connell, R.J., Thon, M.R., Hacquard, S., et al.** (2012) Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics* **44**, 1060–1065.
- Oh, C.S. and Beer, S. V.** (2005) Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. *FEMS Microbiology Letters* **253**, 185–192.
- Orth, K.** (2000) Disruption of Signaling by

- Yersinia Effector YopJ, a Ubiquitin-Like Protein Protease. *Science* **290**, 1594–1597.
- Orth, K.** (2002) Function of the *Yersinia* effector YopJ. *Current Opinion in Microbiology* **5**, 38–43.
- Park, C.H., Chen, S., Shirsekar, G., et al.** (2012) The *Magnaporthe oryzae* effector AvrPiz-t targets the RING E3 ubiquitin ligase APIP6 to suppress pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity in rice. *The Plant Cell* **24**, 4748–4762.
- Paulus, J.K., Kourelis, J., Ramasubramanian, S., et al.** (2020) Extracellular proteolytic cascade in tomato activates immune protease Rcr3. *PNAS* **117**, 17409–17417.
- Pedley, K.F. and Martin, G.B.** (2003) Molecular basis of *Pto*-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. *Annual Review of Phytopathology* **41**, 215–243.
- Perez-Quintero, A.L. and Szurek, B.** (2019) A Decade Decoded: Spies and Hackers in the History of TAL Effectors Research. *Annual Review of Phytopathology* **57**, 459–481.
- Petit-Houdenot, Y. and 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.
- Plett, J.M., Daguerre, Y., Wittulsky, S., et al.** (2014) Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the *Populus* JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. *PNAS* **111**, 8299–8304.
- Plissonneau, C., Daverdin, G., Ollivier, B., Blaise, F., Degrave, A., Fudal, I., Rouxel, T. and Balesdent, M.-H.** (2016) A game of hide and seek between avirulence genes *AvrLm4-7* and *AvrLm3* in *Leptosphaeria maculans*. *The New phytologist* **209**, 1613–24.
- Poueymiro, M. and Genin, S.** (2009) Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. *Current Opinion in Microbiology* **12**, 44–52.
- Qiu, J.L., Fiil, B.K., Petersen, K., et al.** (2008) *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *The EMBO Journal* **27**, 2214–2221.
- Raffaele, S. and Kamoun, S.** (2012) Genome evolution in filamentous plant pathogens: why bigger can be better. *Nature Reviews Microbiology* **10**, 417–430.
- Rooney, H.C.E.** (2005) *Cladosporium* Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science* **308**, 1783–1786.
- Rouxel, T., Grandaubert, J., Hane, J.K., et al.** (2011) Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by repeat-induced point mutations. *Nature Communications* **2**, 202.
- Rudd, J.J., Kanyuka, K., Hassani-Pak, K., et al.** (2015) Transcriptome and metabolite profiling of the infection cycle of *Zymoseptoria tritici* on wheat reveals a biphasic interaction with plant immunity involving differential pathogen chromosomal contributions and a variation on the hemibiotrophic lifestyle. *Plant Physiology* **167**, 1158–1185.
- Sain, M. de and Rep, M.** (2015) The role of pathogen-secreted proteins in fungal vascular wilt diseases. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 23970–23993.
- Saintenac, C., Lee, W.S., Cambon, F., et al.** (2018) Wheat receptor-kinase-like protein Stb6 controls gene-for-gene resistance to fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Nature Genetics* **50**, 368–374.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., et al.** (2002) Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* **415**, 497–502.
- Sarris, P.F., Cevik, V., Dagdas, G., Jones, J.D.G. and Krasileva, K. V.** (2016) Comparative analysis of plant immune receptor architectures uncovers host proteins likely targeted by pathogens. *BMC Biology* **14**.
- Sarris, P.F., Duxbury, Z., Huh, S.U., et al.** (2015) A plant immune receptor detects pathogen effectors that target WRKY transcription factors. *Cell* **161**, 1089–1100.
- Saunders, D.G.O., Win, J., Cano, L.M., Szabo, L.J., Kamoun, S. and Raffaele, S.** (2012) Using hierarchical clustering of secreted protein families to classify and rank candidate effectors of rust fungi. *PLoS ONE* **7**.
- Saur, I.M.L., Bauer, S., Kracher, B., et al.** (2019) Multiple pairs of allelic MLA immune receptor-powdery mildew AVR effectors argue for a direct recognition mechanism. *eLife* **8**.
- Schorneck, S., Huitema, E., Cano, L.M., et al.** (2009) Ten things to know about oomycete effectors. *Molecular Plant Pathology* **10**, 795–803.
- Schulze-Lefert, P. and Panstruga, R.** (2011) A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation. *Trends in Plant Science* **16**, 117–125.
- Selin, C., Kievit, T.R. de, Belmonte, M.F. and Fernando, W.G.D.** (2016) Elucidating the role of effectors in plant-fungal interactions: progress

- and challenges. *Frontiers in Microbiology* **7**, 600.
- Shan, L., He, P., Li, J., Heese, A., Peck, S.C., Nürnberger, T., Martin, G.B. and Sheen, J.** (2008) Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. *Cell Host and Microbe* **4**, 17–27.
- Shao, F., Golstein, C., Ade, J., Stoutemyer, M., Dixon, J.E. and Innes, R.W.** (2003) Cleavage of Arabidopsis PBS1 by a bacterial type III effector. *Science* **301**, 1230–1233.
- Shen, Q.-H., Saijo, Y., Mauch, S., et al.** (2007) Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. *Science* **315**, 1098–1103.
- Soyer, J.L., Ghalid, M. El, Glaser, N., et al.** (2014) Epigenetic control of effector gene expression in the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *PLoS Genetics* **10**, 1004227.
- Spanu, P.D.** (2012) The genomics of obligate (and nonobligate) biotrophs. *Annual Review of Phytopathology* **50**, 91–109.
- Spanu, P.D., Abbott, J.C., Amselem, J., et al.** (2010) Genome expansion and gene loss in powdery mildew fungi reveal tradeoffs in extreme parasitism. *Science* **330**, 1543–1546.
- Sperschneider, J., Catanzariti, A.M., Deboer, K., Petre, B., Gardiner, D.M., Singh, K.B., Dodds, P.N. and Taylor, J.M.** (2017) LOCALIZER: Subcellular localization prediction of both plant and effector proteins in the plant cell. *Scientific Reports* **7**.
- Sperschneider, J., Dodds, P.N., Gardiner, D.M., Singh, K.B. and Taylor, J.M.** (2018a) Improved prediction of fungal effector proteins from secretomes with EffectorP 2.0. *Molecular Plant Pathology* **19**, 2094–2110.
- Sperschneider, J., Dodds, P.N., Singh, K.B. and Taylor, J.M.** (2018b) ApoplastP: prediction of effectors and plant proteins in the apoplast using machine learning. *New Phytologist* **217**, 1764–1778.
- Sperschneider, J., Gardiner, D.M., Dodds, P.N., Tini, F., Covarelli, L., Singh, K.B., Manners, J.M. and Taylor, J.M.** (2016) EffectorP: predicting fungal effector proteins from secretomes using machine learning. *New Phytologist* **210**, 743–761.
- Staskawicz, B.J., Mudgett, M.B., Dangl, J.L. and Galan, J.E.** (2001) Common and contrasting themes of plant and animal diseases. *Science* **292**, 2285–2289.
- Stergiopoulos, I., Collemare, J., Mehrabi, R. and de Wit, P.J.G.M.** (2013) Phytotoxic secondary metabolites and peptides produced by plant pathogenic Dothideomycete fungi. *FEMS Microbiology Reviews* **37**, 67–93.
- Stergiopoulos, I. and de Wit, P.J.G.M.** (2009) Fungal effector proteins. *Annual Review of Phytopathology* **47**, 233–263.
- Steuernagel, B., Witek, K., Krattinger, S.G., et al.** (2020) The NLR-annotator tool enables annotation of the intracellular immune receptor repertoire. *Plant Physiology* **183**, 468–482.
- Stotz, H.U., Mitrousis, G.K., de Wit, P.J.G.M. and Fitt, B.D.L.** (2014) Effector-triggered defence against apoplastic fungal pathogens. *Trends in Plant Science* **19**, 491–500.
- Tang, D., Wang, G. and Zhou, J.M.** (2017) Receptor kinases in plant-pathogen interactions: more than pattern recognition. *The Plant Cell* **29**, 618–637.
- Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., et al.** (2005) Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *Journal of Bacteriology* **187**, 7254–7266.
- Thomma, B.P., Nurnberger, T. and Joosten, M.H.** (2011) Of PAMPs and effectors: The blurred PTI-ETI dichotomy. *The Plant Cell* **23**, 4–15.
- Thordal-Christensen, H.** (2020) A holistic view on plant effector-triggered immunity presented as an iceberg model. *Cellular and Molecular Life Sciences* **77**, 3963–3976.
- Tian, D., Wang, J., Zeng, X., et al.** (2014) The rice TAL effector-dependent resistance protein XA10 triggers cell death and calcium depletion in the endoplasmic reticulum. *The Plant Cell* **26**, 497–515.
- Tian, W., Hou, C., Ren, Z., et al.** (2019) A calmodulin-gated calcium channel links pathogen patterns to plant immunity. *Nature* **572**, 131–135.
- Timilsina, S., Potnis, N., Newberry, E.A., Liyanapathirana, P., Iruegas-Bocardo, F., White, F.F., Goss, E.M. and Jones, J.B.** (2020) *Xanthomonas* diversity, virulence and plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Microbiology* **18**, 415–427.
- Toruño, T.Y., Stergiopoulos, I. and Coaker, G.** (2016) Plant-pathogen effectors: cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners. *Annual Review of Phytopathology* **54**, 419–441.
- Tsiamis, G., Mansfield, J.W., Hockenhull, R., et**

- al.** (2000) Cultivar-specific avirulence and virulence functions assigned to *avrPphF* in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the cause of bean halo-blight disease. *The EMBO Journal* **19**, 3204–3214.
- Tsuda, K. and Katagiri, F.** (2010) Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 459–465.
- Tsuge, T., Harimoto, Y., Akimitsu, K., Ohtani, K., Kodama, M., Akagi, Y., Egusa, M., Yamamoto, M. and Otani, H.** (2013) Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *FEMS Microbiology Reviews* **37**, 44–66.
- Tyler, B.M., Tripathy, S., Zhang, X., et al.** (2006) *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* **313**, 1261–1266.
- Urban, M., Cuzick, A., Rutherford, K., et al.** (2017) PHI-base: a new interface and further additions for the multi-species pathogen-host interactions database. *Nucleic Acids Research* **45**, D604–D610.
- Urban, M., Cuzick, A., Seager, J., et al.** (2020) PHI-base: The pathogen-host interactions database. *Nucleic Acids Research* **48**, D613–D620.
- Urban, M., Pant, R., Raghunath, A., Irvine, A.G., Pedro, H. and Hammond-Kosack, K.E.** (2015) The pathogen-host interactions database (PHI-base): additions and future developments. *Nucleic Acids Research* **43**, D645–D655.
- van Der Hoorn, R.A.L. and Kamoun, S.** (2008) From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *The Plant Cell* **20**, 2009–2017.
- van't Slot, K.A.E. and Knogge, W.** (2002) A dual role for microbial pathogen-derived effector proteins in plant disease and resistance. *Critical Reviews in Plant Sciences* **21**, 229–271.
- Velásquez, A.C., Castroverde, C.D.M. and He, S.Y.** (2018) Plant–pathogen warfare under changing climate conditions. *Current Biology* **28**, R619–R634.
- Vincent, D., Rafiqi, M. and Job, D.** (2020) The Multiple Facets of Plant–Fungal Interactions Revealed Through Plant and Fungal Secretomics. *Frontiers in Plant Science* **10**.
- Vleeshouwers, V.G.A.A., Raffaele, S., Vossen, J.H., et al.** (2011) Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors. *Annual Review of Phytopathology* **49**, 507–531.
- Vleeshouwers, V.G.A.A., Rietman, H., Krennek, P., et al.** (2008) Effector genomics accelerates discovery and functional profiling of potato disease resistance and *Phytophthora infestans* avirulence genes. *PLoS ONE* **3**, e2875.
- Vossen, E.A.G. van Der, Voort, J.N.A.M.R. van Der, Kanyuka, K., Bendahmane, A., Sandbrink, H., Baulcombe, D.C., Bakker, J., Stiekema, W.J. and Klein-Lankhorst, R.M.** (2000) Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. *The Plant Journal* **23**, 567–576.
- Wang, Jizong, Hu, M., Wang, Jia, et al.** (2019a) Reconstitution and structure of a plant NLR resistosome conferring immunity. *Science* **364**, eaav5870.
- Wang, Jizong, Wang, Jia, Hu, M., et al.** (2019b) Ligand-triggered allosteric ADP release primes a plant NLR complex. *Science* **364**, eaav5868.
- Wang, M., Weiberg, A., Lin, F.M., Thomma, B.P.H.J., Huang, H. Da and Jin, H.** (2016) Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature Plants* **2**, 16151.
- Wang, Q., Han, C., Ferreira, A.O., et al.** (2011) Transcriptional programming and functional interactions within the *Phytophthora sojae* RXLR effector repertoire. *The Plant Cell* **23**, 2064–2086.
- Wang, W., Feng, B., Zhou, J.M. and Tang, D.** (2020) Plant immune signaling: advancing on two frontiers. *Journal of Integrative Plant Biology* **62**, 2–24.
- Weiberg, A., Wang, M., Lin, F.-M., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., Huang, H.-D. and Jin, H.** (2013) Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science* **342**, 118–123.
- Weßling, R., Epple, P., Altmann, S., et al.** (2014) Convergent targeting of a common host protein-network by pathogen effectors from three kingdoms of life. *Cell Host and Microbe* **16**, 364–375.
- Whisson, S.C., Boevink, P.C., Moleleki, L., et al.** (2007) A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* **450**, 115–118.
- Williams, S.J., Sohn, K.H., Wan, L., et al.** (2014) Structural basis for assembly and function of a heterodimeric plant immune receptor. *Science* **344**, 299–303.
- Winstanley, C. and Hart, C.A.** (2001) Type III secretion systems and pathogenicity islands. *Journal of Medical Microbiology* **50**, 116–126.
- Wu, L., Chen, H., Curtis, C. and Fu, Z.Q.** (2014) Go in for the kill: how plants deploy effector-

- triggered immunity to combat pathogens. *Virulence* **5**, 710–721.
- Wyatt, N.A., Richards, J.K., Brueggeman, R.S. and Friesen, T.L.** (2020) A comparative genomic analysis of the barley pathogen *Pyrenophora teres* f. *teres* identifies subtelomeric regions as drivers of virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **33**, 173–188.
- Xia, Y.** (2004) Proteases in pathogenesis and plant defence. *Cellular Microbiology* **6**, 905–913.
- Xiang, T., Zong, N., Zou, Y., et al.** (2008) *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Current Biology* **18**, 74–80.
- Xin, X.-F., Nomura, K., Aung, K., Velásquez, A.C., Yao, J., Boutrot, F., Chang, J.H., Zipfel, C. and He, S.Y.** (2016) Bacteria establish an aqueous living space in plants crucial for virulence. *Nature* **539**, 524–529.
- Xin, X.F. and He, S.Y.** (2013) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annual Review of Phytopathology* **51**, 473–498.
- Xin, X.F., Kvitko, B. and He, S.Y.** (2018) *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology* **16**, 316–328.
- Yang, B., Sugio, A. and White, F.F.** (2006) *Os8N3* is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *PNAS* **103**, 10503–10508.
- Yang, J., Duan, G., Li, C., Liu, L., Han, G., Zhang, Y. and Wang, C.** (2019) The crosstalks between jasmonic acid and other plant hormone signaling highlight the involvement of jasmonic acid as a core component in plant response to biotic and abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science* **10**, 1349.
- Yoshida, Kentaro, Saitoh, H., Fujisawa, S., et al.** (2009) Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Cell* **21**, 1573–1591.
- Zhang, J., Li, W., Xiang, T., et al.** (2010) Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. *Cell Host and Microbe* **7**, 290–301.
- Zhang, J., Shao, F., Li, Y., et al.** (2007) A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host and Microbe* **1**, 175–185.
- Zhang, Y. and Li, X.** (2019) Salicylic acid: biosynthesis, perception, and contributions to plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **50**, 29–36.
- Zhong, Z., Marcel, T.C., Hartmann, F.E., et al.** (2017) A small secreted protein in *Zymoseptoria tritici* is responsible for avirulence on wheat cultivars carrying the *Stb6* resistance gene. *New Phytologist* **214**, 619–631.
- Zipfel, C.** (2009) Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 414–420.
- Zvereva, A.S. and Pooggin, M.M.** (2012) Silencing and innate immunity in plant defense against viral and non-viral pathogens. *Viruses* **4**, 2578–2597.

4. Les Pucciniales : état de l'art des connaissances

4.1. Les rouilles : symptômes et conséquences

Les champignons de l'ordre des Pucciniales sont des agents phytopathogènes responsables des maladies de la rouille, induisant des symptômes souvent spectaculaires d'infection sur leur(s) hôte(s) ([Figure 11](#)). Les Pucciniales sont des champignons biotrophes obligatoires qui ne peuvent accomplir leur cycle de vie sans leurs plantes hôtes. Ainsi, ils ne peuvent se nourrir, croître et se reproduire qu'au sein de leur(s) hôte(s). Afin d'établir cette relation intime, ils produisent des structures d'infection spécifiques telles que les haustoria invaginés à l'intérieur des tissus infectés de l'hôte ([Voegelé and Mendgen 2011](#); [Dracatos et al. 2018](#)). Cet ordre est l'un des plus grands du royaume des champignons,

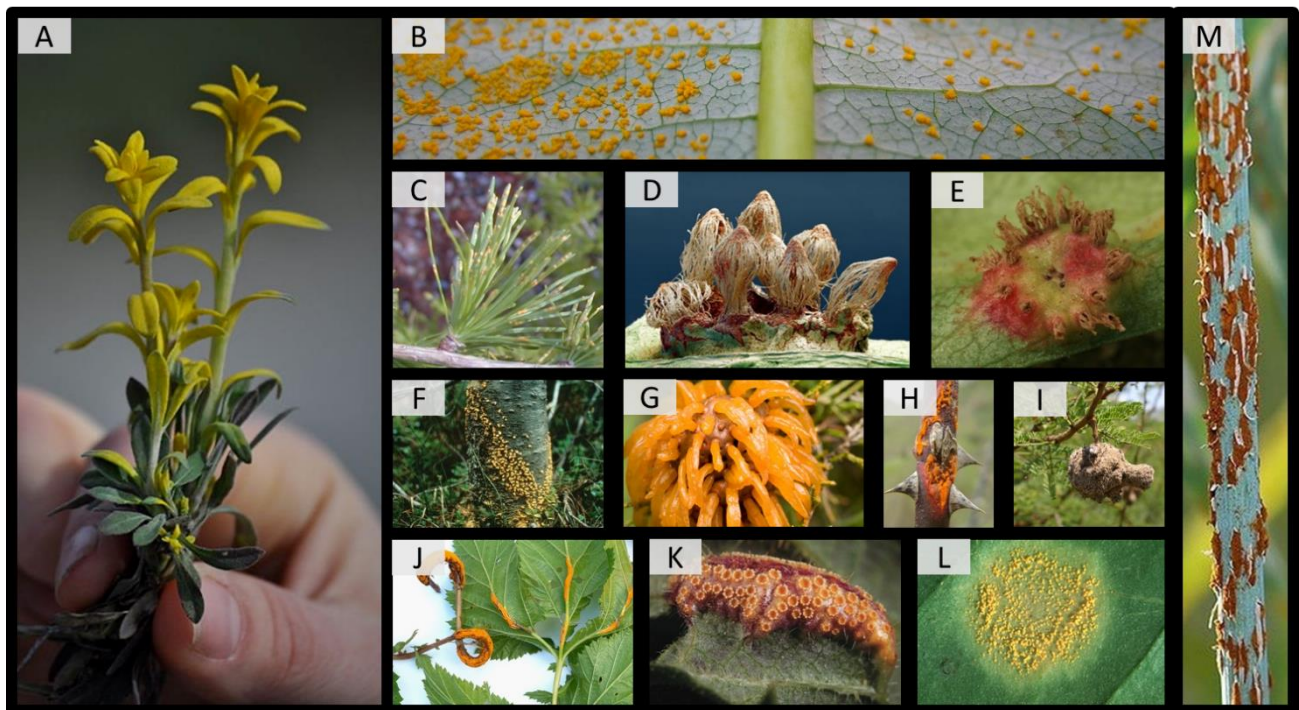


Figure 11. Les agents de la rouille induisent de spectaculaires phénotypes d'infection sur l'hôte.

Plusieurs exemples de symptômes typiques de rouilles sont représentés dans cette figure et induits par : (A) *Puccinia monoica* sur arabis ; (B) *Melampsora larici-populina* sur peuplier ; (C) *Melampsora larici-populina* sur mélèze ; (D) *Gymnosporangium sabiniae* sur poirier ; (E) *Gymnosporangium clavariiforme* sur aubépine ; (F) *Cronartium ribicola* sur pin ; (G) *Gymnosporangium juniperi-virginianae* sur cèdre ; (H) *Phragmidium tuberculatum* sur rosier ; (I) *Ravelenia* spp. sur acacia ; (J) *Triphragmium ulmariae* sur reine des près ; (K) *Puccinia urticata* sur ortie ; (L) *Hemileia vastatrix* sur caféier ; (M) *Puccinia graminis* sur blé. Modifié d'après [Petre 2012](#).

avec plus de 7 000 espèces regroupées en sept sous-ordres et 18 familles (Aime and McTaggart 2021). Ces champignons pathogènes représentent un danger pour l'agriculture moderne à l'échelle mondiale en menaçant des grandes cultures comme le blé et le soja (Singh et al. 2015; Godoy et al. 2016; Figueroa et al. 2018; Savary et al. 2019). Globalement, les pertes mondiales annuelles de la production de blé associées aux agents de la rouille jaune, *P. striiformis* f. sp. *tritici*, et de la rouille brune, *Puccinia triticina*, sont estimées entre quatre et cinq milliards de dollars (Figueroa et al. 2018). Depuis les années 1990, le champignon, *Phakopsora pachyrhizi*, responsable de la rouille du soja, s'est propagé au Brésil et représente pour les cultivateurs deux milliards de dollars par an en pertes de rendement et coûts de traitement par fongicides (Godoy et al. 2016). Ces exemples font notamment partie des principales épidémies causées par des agents pathogènes ces 150 dernières années (Figure 1). Le principal moyen de lutte contre ces champignons pathogènes a été, de manière générale, le déploiement massif de variétés porteuses de résistances qualitatives. Cependant, au fil des années, les champignons se sont adaptés en surmontant complètement les résistances des plantes (Ellis et al. 2014). Cette grande capacité évolutive est notamment liée à la complexité de leur cycle de vie et à leur régime de reproduction (Aime et al. 2018; McDonald and Linde 2002).

4.2. Des cycles de vie complexes

Les Pucciniales possèdent les cycles de vie les plus complexes du règne fongique (Aime et al. 2018). Ces cycles de vie sont divers avec pour les plus complexes une alternance entre deux hôtes taxonomiquement non apparentés (cycle hétéroïque) et la production de cinq types de spores différents (cycle macrocyclique) : spermaties, écidiospores, urédiniospores, téliospores et basidiospores (Figure 12 ; Lorrain et al. 2019). Ils peuvent être également à la fois macrocycliques et autoïques lorsqu'ils produisent les cinq stades de spores sur un hôte unique. L'hétérocécie (caractère hétéroïque) de certains Pucciniales fait que la reproduction sexuée se déroule en partie sur une plante-hôte distinctes, forçant ainsi le brassage génétique des allèles issus de la méiose avant leur recombinaison sur l'hôte écidien. Pour quelques Pucciniales, les cycles de vie complets n'ont jamais été observés. Par exemple, on ne connaît pas les hôtes alternants des agents de la rouille du soja *P. pachyrhizi* et de la rouille du caféier *Hemileia vastatrix* (Slaminko et al. 2008; Talhinhos et al. 2017). Enfin, dans des conditions tempérées, les Pucciniales peuvent également entrer dans une phase d'hivernage (ou de dormance pendant l'été pour la rouille du blé) au cours de laquelle les spores deviennent dormantes (Duplessis et al. 2021). Les transitions d'entrée et de sortie de dormance sont probablement contrôlées par des signaux environnementaux (Mendgen 1984; Duplessis et al. 2021).

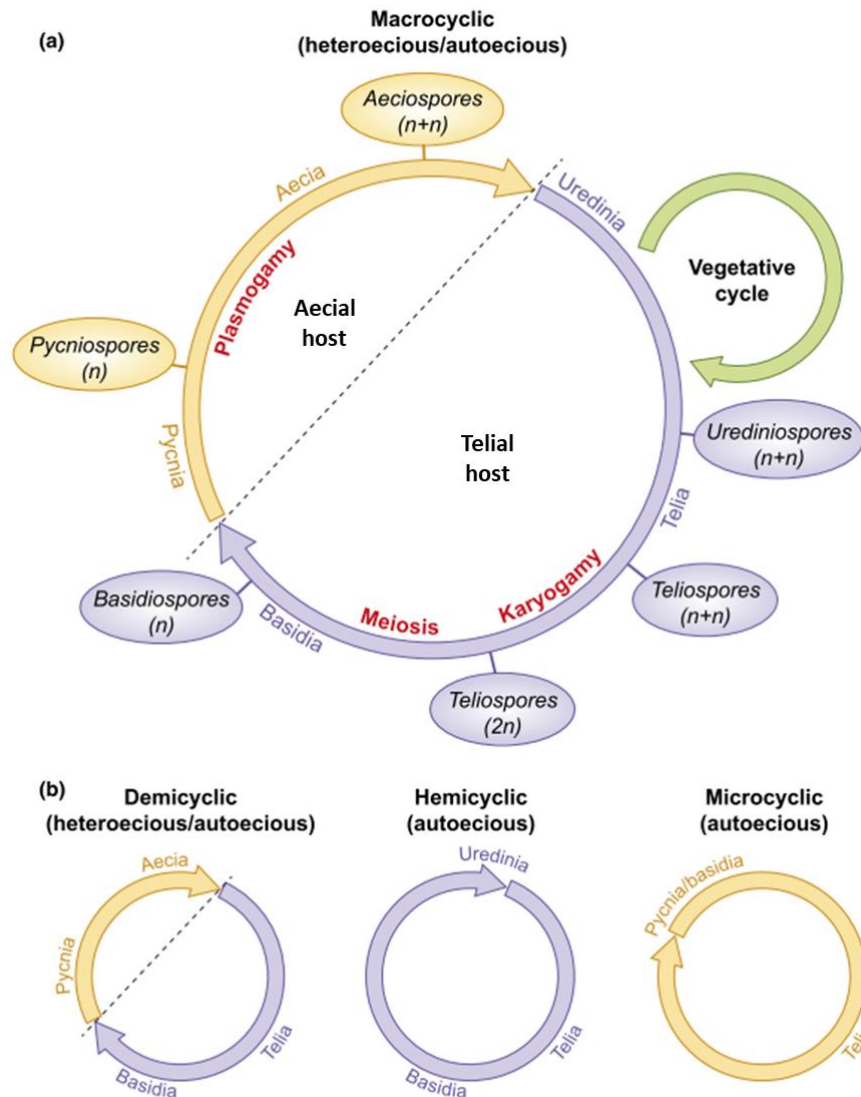


Figure 12. Les Pucciniales possèdent des cycles de vie complexes.

(a) Cycle de vie macrocyclique : Les agents de rouilles sont macrocycliques lorsqu'ils produisent cinq stades de spores et ils sont autoïques ou hétéroïques (c'est-à-dire que le cycle de vie nécessite une ou deux plantes hôtes, respectivement). Les urédiniospores dicaryotiques ($n+n$) sont produites de manière répétée par des cycles de reproduction asexuée sur l'hôte télien ; les téliospores ($n+n$) sont formées dans les télies ; la caryogamie se produit dans les téliospores et la méiose commence ; les basides se différencient et produisent des basidiospores haploïdes (n). Les basidiospores infectent l'hôte écidien ; les spermogonies (ou pycnies) produisent des spermaties (ou pycniospores) (n) ; après une plasmogamie, les écidies dicaryotiques libèrent des écidiospores ($n+n$) qui infectent à nouveau l'hôte télien. (b) Cycles de vie dérivés : les champignons avec un cycle demicycliques peuvent être hétéroïques ou autoïques et ne forment pas d'urédiniospore ; les champignons avec un cycle hémicycliques sont autoïques avec l'absence de formation de spermogonies ainsi que d'écidiospores ; le cycle de vie microcyclique se réduit aux téliospores et aux basides ou aux spermogonies, selon les espèces. D'après Lorrain et al. 2019.

L'intégration de ces divers signaux et la diversité des processus de développement, impliqués aussi bien dans le contournement des défenses de l'hôte que dans la réalisation du cycle de vie, suggère une coordination stricte de différents programmes génétiques finement régulés, impliquant probablement une diversité de facteurs de transcription (*Transcription Factors* ; TF) (cf. [Chapitre IV](#) ; [Article 3](#)).

4.3. Identification des effecteurs chez les agents de la rouille

En raison de leurs effets potentiellement dévastateurs sur la production agricole mondiale, le vingtième siècle a été le témoin d'intenses efforts d'étude sur les Pucciniales par microscopie, biochimie, approches moléculaires et génétiques ([Bakkeren and Szabo 2020](#)). La dernière décennie a vu l'avènement du séquençage de leur génome ([Aime et al. 2017](#)). Les premiers génomes de Pucciniales séquencés ont été ceux de *P. graminis* f. sp. *tritici* et *M. larici-populina* ([Duplessis et al. 2011a](#)), suivis rapidement par plusieurs autres ([Aime et al. 2017](#); [Duplessis et al. 2014](#)). La plupart de ces génomes sont disponibles dans la base de données du Mycocosm au JGI ce qui permet de réaliser des études comparatives ([Grigoriev et al. 2014](#)). Les Pucciniales ont des génomes de grande taille, de 60 à plus de 300 Mb (avec des limites supérieures pouvant atteindre 2 Gb), bien au-delà de la moyenne 40 Mb estimée pour l'ordre des Basidiomycètes auxquels ils appartiennent ([Aime et al. 2017](#)). Ils possèdent également un grand nombre de gènes (de 15 000 à 20 000 selon les espèces), dont une grande partie est spécifique aux Pucciniales, et environ la moitié sans annotation fonctionnelle ([Aime et al. 2017](#)). De plus, il y aurait entre 1000 et 2000 gènes codant pour des protéines sécrétées (environ 10% de l'espace codant) et 18 à 75% de TE par génome ([Lorrain et al. 2019](#)), suggérant l'implication de ces derniers dans l'expansion des génomes des Pucciniales. La disponibilité de l'ensemble de ces ressources omiques est une chance pour la communauté scientifique pour étudier leur biologie complexe au niveau moléculaire. Dans ce sens, le répertoire des protéines effectrices sécrétées candidates (CSEP) peut être établi en utilisant des pipelines bioinformatiques ou en étudiant les données transcriptomiques (RNA-seq) lorsqu'aucun génome de référence n'est disponible. De longues listes de CSEP ont ainsi été établies chez les Pucciniales, dont la plupart ont une fonction inconnue et présentent une spécificité élevée au niveau de l'ordre, de la famille ou de l'espèce, reflétant une nouvelle fois une adaptation potentielle à leurs plantes hôtes ([Aime et al. 2018](#); [Lorrain et al. 2019](#)). Une poignée d'effecteurs a été spécifiquement identifiée, notamment AvrM, AvrL567, AvrP123, et AvrP4 chez *M. lini*, responsable de la rouille du lin ([Catanzariti 2006](#); [Rafiqi et al. 2010](#)) ; RTP1 chez *Uromyces fabae*, responsable de la rouille du haricot ([Kemen et al. 2005](#)) ; et RGDGP, VPS9 et PGTAUSPE-10-1 chez *P. graminis* f. sp. *tritici*, responsable de la rouille noire du blé ([Nirmala et al. 2011](#); [Upadhyaya et al. 2014](#)). Parmi eux, les gènes *Avr* rapportés jusqu'à présent codent de petites protéines

sécrétées de fonction inconnue. De manière générale, seule le caractère d'avirulence est caractérisé comme chez *P. graminis* f. sp. *tritici* avec la validation de *AvrSr35* par infiltration de la fraction protéique produite dans *Escherichia coli* (Salcedo et al. 2017) ou la validation de *AvrSr50* via l'utilisation du virus BSMV (*Barley stripe mosaic virus*) (Chen et al. 2017) qui entraîne la reconnaissance spécifique des protéines de résistance associées et la production de HR.

La biotrophie stricte des Pucciniales rend leur manipulation en laboratoire difficile, avec une production limitée de mycélium (Staples 2000), car ils ne peuvent pas être cultivés sur des milieux artificiels. Cette caractéristique représente donc un challenge, expliquant le manque d'analyses fonctionnelles poussées sur les effecteurs chez les Pucciniales (Lorrain et al. 2019). Par exemple, peu de cas de transformation stable ont été répertoriés, le plus marquant étant la transformation stable de *M. lini* par *Agrobacterium* et la validation du caractère d'avirulence de l'effecteur *AvrL567* par extinction de sa fonction (Lawrence et al. 2010). Certaines études ont pu contourner cet obstacle via l'utilisation de descendances et de cartographies génétiques pour réaliser des caractérisations de manière indirecte comme chez *P. graminis* f. sp. *tritici* (Zambino et al., 2000), *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme* (Kubisiak et al. 2011) et *P. striiformis* f. sp. *tritici* (Wang et al., 2018). De nombreuses autres études reposent sur l'utilisation de systèmes plante-hôte hétérologues pour améliorer les connaissances sur les cibles et les lieux de destination des effecteurs (Lorrain et al. 2018b). De manière générale, ces études révèlent donc des alternatives séduisantes pour la caractérisation d'effecteurs chez les Pucciniales.

5. Le pathosystème peuplier / *Melampsora larici-populina*

5.1. Le peuplier : un arbre d'intérêt agronomique

En France, le peuplier (genre *Populus*) est une essence forestière appréciée pour ses capacités de croissance et ses nombreux usages, par exemple, pour le bois de déroulage (contreplaqué) et les panneaux de particules. Après le chêne, elle constitue ainsi la 2^{ème} essence feuillue en volume récolté sur le territoire (IGN 2019). En général des hybrides interaméricains (*Populus trichocarpa* x *Populus deltoides*) ou euraméricains (*P. deltoides* x *Populus nigra*) sont cultivés dans les peupleraies (Figure 14A) et les grumes sont récoltées à 15-20 ans. Par ailleurs, le peuplier fut le premier arbre dont le génome a été séquencé (*P. trichocarpa* 'Nisqually-1' ; Tuskan et al. 2006). Aussi, certains clones de peuplier sont facilement manipulables en laboratoire (par exemple, le clone INRAE 717-1B4 se prête bien à la culture *in vitro* et à la transformation génétique ; Leple et al. 1992). L'ensemble de ces critères en font une espèce modèle de référence en biologie forestière. En France, la populiculture est fortement impactée par plusieurs risques sanitaires (Figure 14B), notamment par *M. larici-populina*, qui est le principal agent pathogène responsable de la rouille du peuplier (Pinon and Frey 2005). Ce champignon peut diminuer de 60% la croissance radiale du tronc et causer éventuellement la mort des plants suite à des épidémies successives (Figure 13).

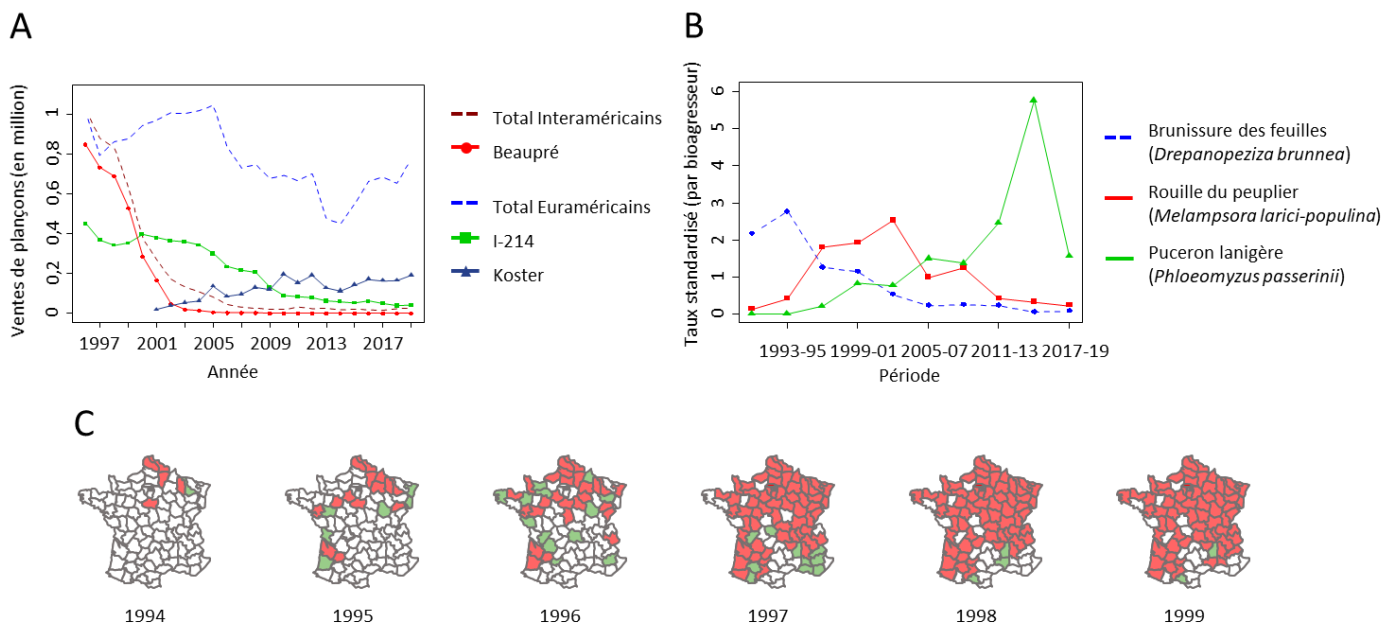


Figure 13. Les épidémies successives de *Melampsora larici-populina* peuvent conduire, à terme, à des dépérissements des arbres infectés.

(A) Évolution temporelle des ventes de plançons de peupliers de 1996 à 2019, illustrant la prédominance initiale du cultivar interaméricain 'Beaupré' (en rouge) puis la chute rapide de sa vente

suite au contournement de sa résistance en 1994 (données du Ministère de l’Agriculture et de l’Alimentation). (B) Évolution temporelle des mentions de trois bioagresseurs majeurs sur peuplier (données du Département de la Santé des Forêts) : une prédominance du champignon pathogène *Drepanopeziza brunnea*, responsable du brunissement des feuilles (en bleu), entre 1995 et 1999 ; une prédominance du champignon *M. larici-populina*, responsable de la rouille foliaire (en rouge), entre 1995 (suite au contournement de la résistance RMIp7 du cultivar 'Beaupré') et 2005 ; et des attaques massives de puceron lanigère (en vert) qui culminent en 2016. (C) Suivi spatiotemporel de la dispersion des isolats virulent (a7) de 1994 (date du contournement de la résistance RMIp7) à 1999 : en rouge, les départements où des isolats a7 ont été détectés ; en vert, les départements où aucun isolat a7 n’a été détecté ; en blanc, les départements où aucun échantillon n’a été analysé. Modifié d’après [Fabre et al. 2021](#).

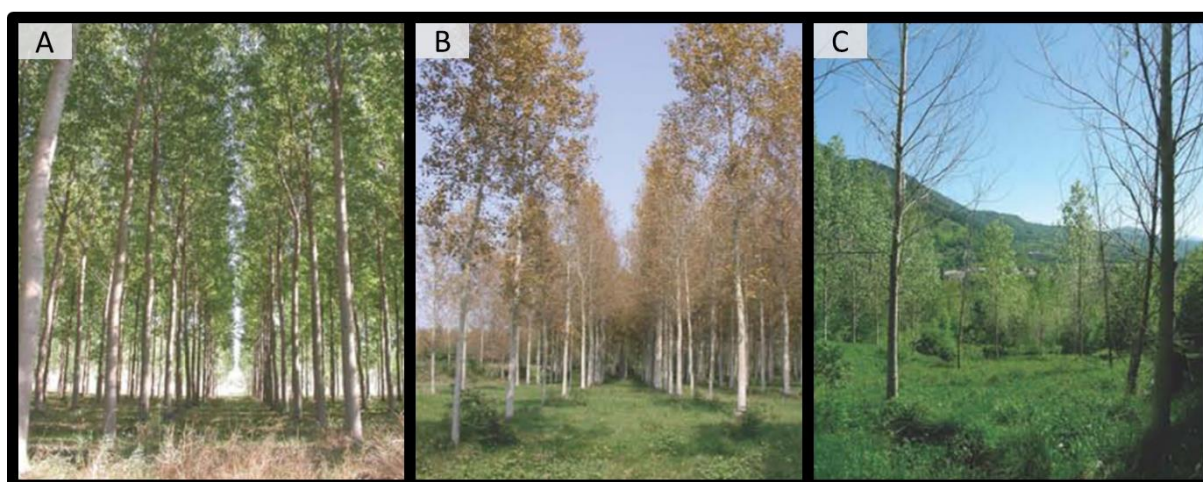


Figure 14. Les peupleraies ont subi de profonds remaniements notamment liés à *Melampsora larici-populina*.

Des degrés de symptômes liés à la rouille sont représentés dans cette figure : (A) Peupleraie peu infectée ; (B) Peupleraie fortement infectée ; (C) Peupleraie jouxtant une parcelle de mélèzes et possédant des peupliers morts à cause d’épidémies répétées de rouille. Sources des photographies : P. Frey.

5.2. *Melampsora larici-populina* : le principal agent pathogène des peupleraies européennes

M. larici-populina, un des agents de la rouille du peuplier (Basidiomycète, Pucciniomycète), est un champignon biotrophe obligatoire appartenant à l’ordre des Pucciniales (cf. [Chapitre I partie 4](#)). A lui seul, le genre *Melampsora* compte plus d’une cinquantaine d’espèces dont 17 sont pathogènes des peupliers ([Vialle et al. 2011](#)). Neuf espèces sont présentes en Europe (dont *Melampsora allii-populina* et *Melampsora medusae* f. sp. *deltoidae*) mais *M. larici-populina* reste la principale cause de dégâts dans les peupleraies françaises ([Pinon and Frey 2005](#)). Ce champignon pathogène possède un des cycles de vie les plus complexes du règne fongique. Il est dit hétéroïque (c’est-à-dire qu’il réalise son cycle de vie sur deux hôtes) et macrocyclique (produisant cinq types de spores différents) (cf. [Chapitre I](#)

[partie 4.2](#)). Après une phase de reproduction sexuée sur les aiguilles de mélèze *Larix* sp. (hôte écidien), les urédiniospores dicaryotiques réalisent plusieurs cycles de reproduction asexuée sur les feuilles de peuplier (hôte télien) du printemps jusqu'à l'automne ([Figure 15](#)).

Le génome de *M. larici-populina* est l'un des deux premiers génomes parmi les Pucciniales à avoir été séquencé ([Duplessis et al. 2011a](#)). Le séquençage du génome de l'isolat 98AG31 par la technologie Sanger (isolat virulent vis-à-vis de la résistance RMIp7 devenu isolat de référence ; cf. [Chapitre I partie 5.3](#)) a été initié en 2006 par l'UMR IAM du Centre INRAE de Nancy et un consortium international en collaboration avec le JGI. Ce champignon présente un génome de grande taille vis-à-vis des champignons en général (101 Mb ; [Aime et al. 2017](#); [Duplessis et al. 2011](#)) et porte typiquement des caractéristiques partagées par les génomes de champignons biotrophes obligatoires ([Spanu 2012](#)), avec notamment une expansion de familles de gènes impliqués dans l'interaction avec l'hôte comme ceux codant des protéines sécrétées (16 399 protéines prédites et 1 184 SSP ; [Duplessis et al. 2011](#)) et une large proportion de TE (environ 50%) ([Duplessis et al. 2014](#); [Raffaele and Kamoun 2012](#)). Par la suite, l'amélioration des programmes d'assemblage, l'acquisition d'une carte génétique à haute résolution (mise en évidence de 18 groupes de liaison) et le reséquençage (> 100X) de l'isolat 98AG31 a permis d'obtenir une seconde version de meilleure qualité du génome ([Pernaci, 2015](#) ; Duplessis & collab. non publié).

Enfin, *M. larici-populina* est également un modèle pionnier pour la génomique des Pucciniales avec des ressources transcriptomiques qui englobent l'ensemble du cycle de vie, c'est-à-dire l'infection des deux plantes hôtes et les cinq types de spores ([Duplessis et al. 2011a](#); [Hacquard et al. 2013](#); [Lorrain et al. 2019](#)). Ainsi, ces ressources permettent de réaliser des analyses de transcriptomique au cours de son cycle de vie pour étudier des catégories de gènes spécifiques ([Duplessis et al. 2021](#) ; cf. [Chapitre IV ; Article 3](#)). Toutefois, le fait que cet agent pathogène soit un champignon biotrophe obligatoire amène à ne pas considérer ce dernier comme un modèle en phytopathologie au sens strict, comme c'est le cas avec des champignons tels que *M. oryzae* ou *U. maydis* dont la culture *in vitro* et la manipulation génétique sont possibles en laboratoire. En effet, les mécanismes moléculaires sous-jacents à la colonisation des cellules foliaires de peuplier par *M. larici-populina* restent à élucider, notamment la compréhension du rôle potentiel des effecteurs candidats mis à jour. Jusqu'à présent, une vingtaine d'effecteurs candidats de *M. larici-populina* ont été étudiés dans un système d'expression hétérologue, chez *Nicotiana benthamiana* ([Petre et al. 2016a, 2015](#)) ou *Arabidopsis thaliana* ([Germain et al. 2018](#)), et seule leur localisation *in planta* a été établie de façon systématique ([Lorrain et al. 2018b](#)).

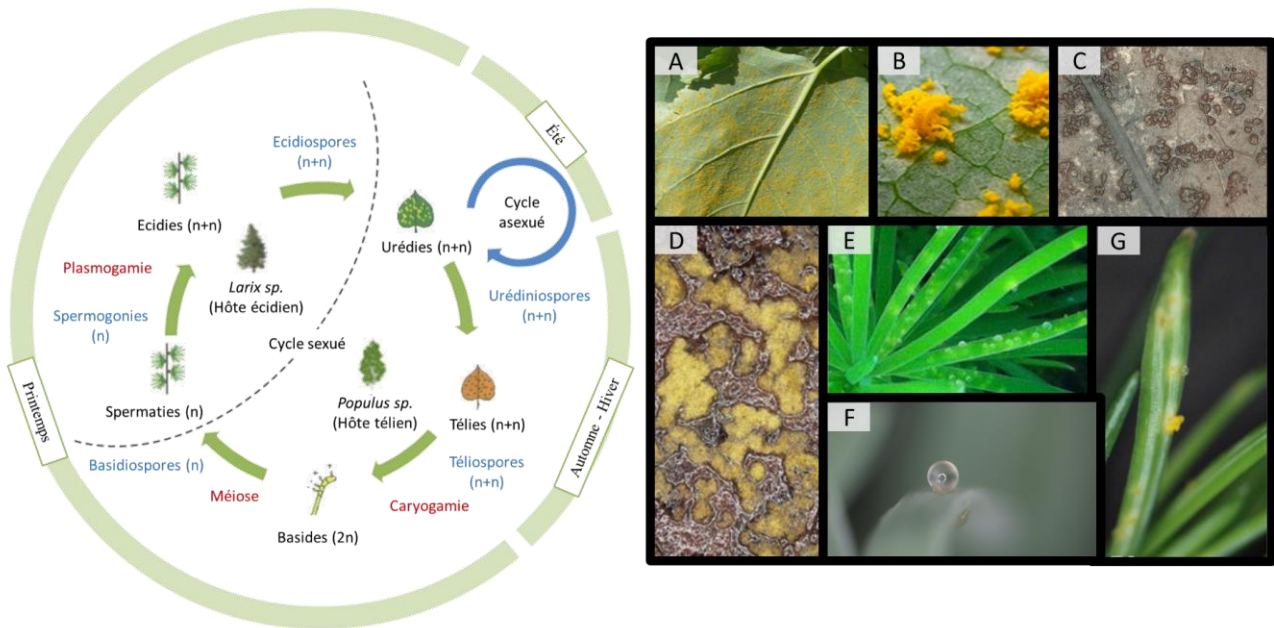


Figure 15. *Melampsora larici-populina* possède l'un des cycles de vie les plus complexes du règne fongique.

Melampsora larici-populina est dit « hétéroïque » car il nécessite deux plantes hôtes (le peuplier et le mélèze) pour effectuer son cycle de vie et « macrocyclique » car il produit cinq types de spores. Au cours de l'été, les urédiniospores dicaryotiques (n+n) sont produites de manière répétée pendant de nombreux cycles de reproduction asexuée sur les feuilles de l'hôte télén, le peuplier (A et B). En automne, les feuilles de peuplier entrent en sénescence et l'agent pathogène forme des croûtes noires appelées télies (C). Ces dernières contiennent des téliospores (n+n) subissant une caryogamie (2n) puis une méiose, qui se terminera suite à une période de dormance. Après l'hiver, les basides (D) se différencient et produisent des basidiospores (n), qui sont disséminées par le vent et infectent l'hôte écidien, le mélèze. Par la suite, des fructifications sur les jeunes aiguilles du mélèze, appelées les spermogonies (ou pycnies) (E et F), se forment et portent des types sexuels différents (+ ou -). Des spermaties (ou pycniospores) haploïdes (n) sont produites par les spermogonies et fécondent les spermogonies de signe sexuel opposé *via* une plasmogamie. Des écidies dicaryotiques (n+n) (G) se forment sur les aiguilles de mélèze et libèrent des écidiospores (n+n) qui vont réinfecter le peuplier. Modifié d'après [Hacquard et al. 2011](#). Sources des photographies : B. Petre ; C. Louet ; P. Frey et S. Duplessis.

5.3. Sélection variétale et lutte contre la rouille du peuplier : zoom sur le contournement de la résistance RMIp7

Afin de limiter les pertes économiques occasionnées par *M. larici-populina*, de nombreuses variétés de peuplier génétiquement résistantes ont été développées. Historiquement, les programmes génétiques avaient pour objectif la création de variétés de peuplier porteuses de résistances totales à la maladie. Il s'est avéré par la suite que ces résistances, plus faciles à sélectionner pour l'améliorateur,

étaient des résistances qualitatives, qui malheureusement étaient également plus rapidement contournées par l'agent pathogène (Fabre et al. 2021). A l'inverse, les résistances quantitatives sont plus difficiles à sélectionner, mais elles sont supposées plus durables (Johnson 1979; Fabre et al. 2012b). Cependant, la populiculture est devenue particulièrement vulnérable vis-à-vis de *M. larici-populina* en raison du déploiement massif de plantations monoclonales (Gérard et al. 2006). En 2020, les peupleraies monospécifiques et monoclonales représentent la totalité de la surface où le peuplier est cultivé.

Entre 1970 et 2020, dix résistances qualitatives (RMIp1 à RMIp10) ont été contournées par *M. larici-populina* (Fabre et al. 2021; Pinon and Frey 2005). Le contournement de résistance le plus remarquable et dommageable s'est produit en 1994 car cet événement a conduit à des pertes économiques importantes et à l'invasion des isolats porteurs de la virulence 7 (a7) sur tout le territoire français (Persoons et al. 2017; Xhaard et al. 2011). En 1996, les cultivars de peuplier porteurs de la résistance RMIp7, tels que *Populus × interamericana* 'Beaupré', représentaient 57 % de toutes les plantations de peupliers en France et jusqu'à 80 % dans le nord de la France (Pinon and Frey 2005). Quatre années seulement se sont écoulées entre la détection des premiers isolats a7 en 1994 en Belgique et dans le Nord de la France, et la propagation de ces isolats dans toute la France (Figure 14C; Pinon et al. 1998; Pinon and Frey 2005). Même si la plantation de 'Beaupré' a diminué jusqu'à l'arrêt total en 2005 (Figure 14A), ce cultivar a encore prédominé dans le paysage populicole durant 20 ans, en raison de la nature pérenne des plantations de peupliers, maintenant une forte pression de sélection sur les populations de *M. larici-populina*.

Des études de génétique des populations démontrent que les populations françaises de *M. larici-populina* ont en effet été fortement impactées au niveau de leur structure et de leur distribution (Xhaard et al. 2011; Persoons et al. 2014, 2021). En utilisant à la fois les profils de virulence et des marqueurs neutres sur une collection rétrospective d'isolats (de 1982 à 2011), l'étude de Persoons et al. (2017) a mis en évidence l'existence de trois groupes génétiques distincts : un groupe ancestral avirulent 7 (A7) appelé « Fossile » qui a décliné à partir de 1994 et disparu en 1998 ; un nouveau groupe génétique appelé « Cultivé » constitué presque exclusivement d'isolats virulent a7 et dont l'émergence est daté à partir de 1994 au moment du contournement de la résistance ; et un outgroup exclusivement composé d'isolats avirulent A7 appelé « Sauvage » prédominant dans le sud-est de la France (Xhaard et al. 2011) où les populations de *M. larici-populina* se trouvent principalement sur les peupliers sauvages et ne sont pas affectées par les plantations commerciales de peupliers, moins fréquentes dans cette région (Figure 16).

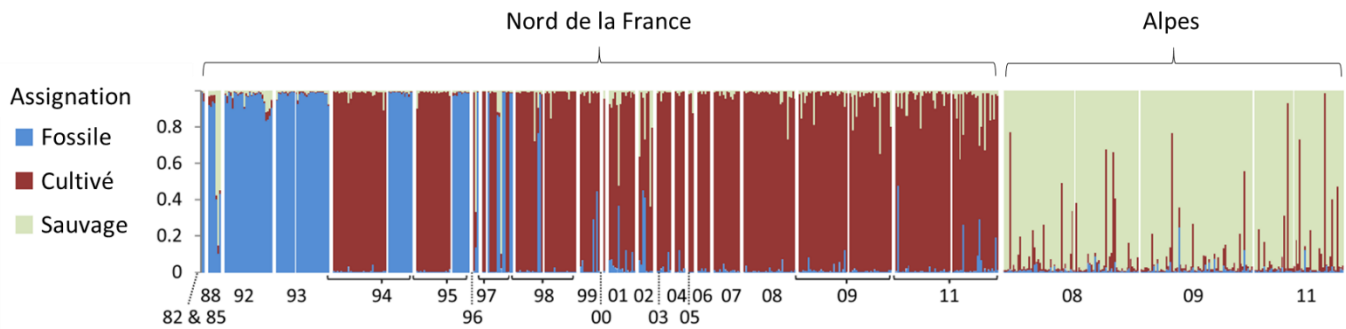


Figure 16. Les populations françaises de *Melampsora larici-populina* ont été fortement impactées au niveau de leur structure génétique suite au contournement de la résistance RMIp7.

Histogrammes des probabilités d'appartenance à différents groupes génétiques pour des isolats individuels issus d'une collection d'échantillonnage historique (analyse d'assignation bayésienne à trois groupes génétiques). Chaque barre verticale représente un isolat dont le génome est fractionné entre les trois groupes génétiques identifiés : fossile, cultivé et sauvage. La longueur du segment est proportionnelle à la probabilité d'appartenance au groupe génétique. Modifié d'après [Persoons, 2015](#); [Persoons et al. 2017](#).

A partir d'un sous-échantillonnage au sein de ces trois groupes génétiques, des analyses par scan génomique et par GWAS ont identifié un locus sous sélection positive sur le chromosome 15 du génome de *M. larici-populina* ([Figure 17](#) ; [Persoons et al. 2021](#)). Cette région génomique abrite un seul gène prédit et soutenu par des données d'expression RNAseq, qui a été défini comme le gène d'avirulence candidat *AvrMlp7* ([Persoons et al. 2021](#)). Celui-ci n'a aucune similarité de séquence dans les bases de données publiques et ne présente aucune annotation fonctionnelle. Il code une protéine qui partagent certaines caractéristiques des effecteurs fongiques typiques, comme une petite taille et un enrichissement en cystéine ([Petre et al. 2014](#)), et présente un signal de sécrétion *via* des voies de sécrétions alternatives ([Bendtsen et al. 2004](#)). Trois SNP sont associés au phénotype de virulence au niveau de ce locus, dont un SNP non synonyme conduisant à une substitution d'acide aminé sérine en glycine à la position 81 de la protéine, ci-après abrégé en S⁸¹G. De plus, certains individus virulents a7 ne présentent aucune couverture de séquence au locus candidat lors du séquençage de leur génome par la technique Illumina, ce qui suggère une délétion par rapport au génome de référence 98AG31. Une telle délétion de toute ou d'une partie de la séquence du gène pourrait agir comme un second événement mutationnel conférant la virulence envers RMIp7 ([Persoons et al. 2021](#)). La caractérisation de ce facteur de virulence semble être à portée, ce qui constituerait une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes infectieux dans le pathosystème peuplier-*M. larici-populina* et au-delà, chez les Pucciniales, agents de rouille fongique des plantes.

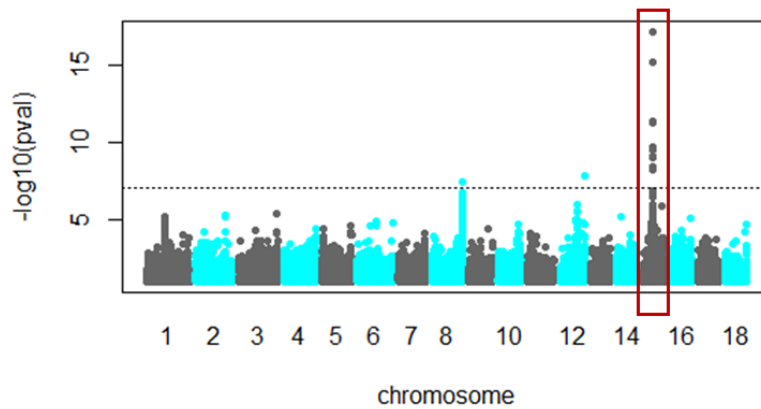


Figure 17. Un seul locus putatif lié au contournement de la résistance RMIp7 a été mis en évidence sur le chromosome 15 de *Melampsora larici-populina*.

Une approche d'association pan-génomique (*Genome-Wide Association Study* ; GWAS) le long des 18 chromosomes de *M. larici-populina* a été réalisée pour identifier le gène d'avirulence *AvrMlp7*. Les SNP expliquant le mieux le clivage phénotypique avirulent A7 vs. virulent a7 sont localisés sur le chromosome 15 (encadré rouge), dont trois dans un unique gène. Modifié d'après [Maupetit 2018](#).

6. Contexte et objectifs de la thèse

Lors de mon arrivée en thèse au sein de l'Unité Mixte de Recherche 1136 Interactions Arbres/Micro-organismes (UMR 1136 IAM), des études de génétique des populations menées sur le pathosystème peuplier/*M. larici-populina* avaient déjà mis en évidence un effecteur candidat expliquant probablement le contournement de la résistance qualitative *RMlp7* du peuplier (Persoons et al. 2021). Parallèlement, plusieurs avancées ont été réalisées sur le plan moléculaire dans l'analyse de l'interaction entre l'agent pathogène et ses deux hôtes, le peuplier et le mélèze (Duplessis et al. 2021). Notamment, des données de transcriptomique ont été générées pour l'ensemble du cycle de vie, c'est-à-dire aussi bien durant les stades asexués sur peuplier (Duplessis et al. 2011b; Hacquard et al. 2012) que les stades sexués sur mélèze (Lorrain et al. 2019). Ces travaux ont fait de *M. larici-populina* un modèle pour étudier le cycle de vie des Pucciniales et l'adaptation moléculaire lors d'un contournement.

Sur ces bases, le projet de thèse qui m'a été confié a porté sur deux principaux axes découlant directement des travaux mentionnés ci-dessus. Le premier objectif a été de caractériser l'évolution de l'effecteur identifié chez *M. larici-populina* au cours du contournement de la résistance *RMlp7* puis d'évaluer sa fonction en tant qu'effecteur mais également en tant que gène d'avirulence potentiel. A ce titre, j'ai développé des outils moléculaires applicables à large échelle pour étudier les polymorphismes de séquence de ce candidat et j'ai pu contribuer au développement de certains outils d'analyse fonctionnelle au sein de l'UMR. En parallèle, le second objectif de ma thèse a été d'initier l'exploitation du transcriptome de cet agent pathogène en analysant finement une classe de gènes orchestrant l'expression de gènes fondamentaux pour la pathogénicité. Ces deux objectifs ont été divisés en trois questions de recherche, présentées dans les chapitres II à IV de ce manuscrit.

Quel est la relation entre la diversité génétique du gène codant l'effecteur décrit chez *M. larici-populina* et le contournement de la résistance *RMlp7* ? (Chapitre II)

Afin de caractériser la diversité génétique au locus codant l'effecteur candidat, deux outils moléculaires ont été développés à partir des polymorphismes de séquence préalablement identifiés par les travaux de Persoons et al. (2021). Pour suivre l'évolution au locus en lien avec l'évènement de contournement de la résistance qualitative *RMlp7* du peuplier, nous avons appliqué deux méthodes de caractérisation haut-débit à une collection 281 isolats de *M. larici-populina* couvrant une large série temporelle, de 1989 à 2016. Ainsi, cette analyse nous a permis de confronter l'évolution génique de cet effecteur avec l'évolution phénotypique mais également l'évolution génétique neutre, révélant l'histoire démographique de cet agent pathogène.

Quel est la fonction de virulence de cet effecteur et possède-t-il un caractère d'avirulence ? (Chapitre III)

Afin d'évaluer la ou les fonctions de cet effecteur, nous avons engagé des investigations fonctionnelles visant à caractériser aussi bien l'activité effectrice de virulence que l'activité probable d'avirulence de ce dernier. Dans le but de déterminer son activité de virulence, des travaux ont été engagés sur l'identification de sa localisation subcellulaire *in planta* et la production de la protéine recombinante. Dans le but de caractériser la fonction d'avirulence potentielle de l'effecteur, nous avons investi nos efforts dans la réalisation de nouveaux protocoles inédits dans l'UMR qu'il reste à finaliser et qui sont décrits dans ce chapitre.

Quels sont les éléments moléculaires orchestrant le cycle de vie des Pucciniales ? (Chapitre IV)

Afin d'approfondir notre compréhension des éléments moléculaires orchestrant le cycle de vie chez les Pucciniales, nous avons engagé des analyses de génomique comparative, de transcriptomique et des analyses fonctionnelles sur la classe des facteurs de transcription, des éléments primordiaux dans la régulation de l'expression génique chez les eucaryotes pour la coordination de processus développementaux ou encore d'interactions entre organismes (Charoensawan et al. 2010; Weirauch and Hughes 2011). Après avoir extrait l'ensemble des facteurs de transcription annotés des génomes publiés d'ascomycètes et de basidiomycètes (données disponibles sur le site du JGI ; <https://jgi.doe.gov/>), nous avons plus précisément étudié les familles de gènes annotées chez les Pucciniales. Nous avons ensuite entrepris l'analyse de l'expression de ces gènes en se focalisant sur le transcriptome du cycle de vie de *M. larici-populina*, qui était à notre disposition au moment de la mise en place de ce projet. L'ensemble de ces résultats nous a permis de décrire plus finement la phylogénie, l'expression et la fonction d'une famille de facteurs de transcription (cold-shock proteins) en expansion chez les Pucciniales et associée à un stade spécifique du cycle de vie du pathogène lors de la transition entre dormance hivernale et infection de l'hôte mélèze.

Chapitre II – Caractérisation et analyse
évolutive du gène d'avirulence candidat
AvrMlp7

1. Contexte

Melampsora larici-populina a la capacité de rapidement s'adapter aux gènes de résistance majeurs des cultivars de peuplier. Ainsi, dans les 50 dernières années, dix résistances qualitatives (*RMlp1* à *RMlp10*) ont été contournées par cet agent pathogène (Pinon and Frey 2005; Fabre et al. 2021). Douze ans après la mise sur le marché des premiers cultivars porteurs de la résistance *RMlp7*, une large population virulente (a7) a émergé remplaçant peu à peu la population ancestrale avirulente (A7) (Persoons et al. 2017). Outre la mise en évidence d'une structuration de la population de l'agent pathogène (Persoons et al. 2017; Xhaard et al. 2011), une approche de génomique des populations a permis d'identifier un seul locus soumis à sélection positive lors du contournement de la résistance *RMlp7*. Ce locus, situé sur le chromosome 15 de *M. larici-populina* comporte un seul gène qui serait donc le gène d'avirulence candidat AvrMlp7 (Persoons et al. 2021). Le gène identifié code un effecteur candidat présentant des caractéristiques classiques des effecteurs typiquement décrits chez les champignons filamenteux (Persoons et al. 2021; Petre et al. 2014) mais surtout deux altérations de ce gène semblent être associés au phénotype de virulence : une mutation ponctuelle entraînant un changement d'acide aminé S⁸¹G dans la protéine candidate d'avirulence et une délétion complète du gène au locus concerné.

L'objectif de ce chapitre est de décrire le polymorphisme et l'évolution du locus candidat AvrMlp7 au cours du contournement de la résistance *RMlp7* sur un large échantillonnage temporel. Nous avons décidé de combiner des approches de génétiques des populations et des approches moléculaires pour pallier les limites associées à l'étude d'un pathosystème difficilement manipulable pour des approches fonctionnelles. Deux approches moléculaires, caractérisant à haut débit le polymorphisme au locus candidat AvrMlp7, nous ont permis de mettre en évidence une corrélation quasi-parfaite entre l'état allélique à ce locus et le phénotype associé vis-à-vis de la résistance *RMlp7*. De plus, l'interaction entre les deux altérations au locus est en accord avec le processus démographique décrit précédemment. Ces résultats sont ici présentés sous la forme d'un article de recherche intitulé « **A point mutation and large deletion at the candidate avirulence locus AvrMlp7 in the poplar rust fungus correlate with poplar RMlp7 resistance breakdown** », qui a été accepté en novembre 2021 pour publication dans la revue *Molecular Ecology* et pour lequel je suis première auteure (<https://doi.org/10.1111/mec.16294>).

Une analyse complémentaire a également été engagée, notamment afin de déterminer un possible lien entre les éléments transposables et la délétion au locus candidat AvrMlp7 de *M. larici-populina* et de caractériser l'état génotypique au locus chez des mutants devenus virulents suite à un traitement aux UV. Les résultats préliminaires de ces travaux sont présentés à la fin de ce chapitre.

2. Article n°2 – A point mutation and large deletion at the candidate avirulence locus *AvrMlp7* in the poplar rust fungus correlate with poplar RMIp7 resistance breakdown

Clémentine Louet, Méline Saubin, Axelle Andrieux, Antoine Persoons, Mathilde Gorse, Jérémy Pétrowski, Bénédicte Fabre, Stéphane De Mita, Sébastien Duplessis, Pascal Frey and Fabien Halkett

Article accepté pour publication en novembre 2021 dans la revue *Molecular Ecology*.

A point mutation and large deletion at the candidate avirulence locus *AvrMlp7* in the poplar rust fungus correlate with poplar *RMlp7* resistance breakdown

Clémentine LOUET*, Méline SAUBIN*, Axelle ANDRIEUX*, Antoine PERSOONS*, Mathilde GORSE*†, Jérémy PETROWSKI*, Bénédicte FABRE*, Stéphane DE MITA*‡, Sébastien DUPLESSIS*, Pascal FREY* and Fabien HALKETT*

*Université de Lorraine, INRAE, IAM, F-54000 Nancy, France

†Present address: INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, BIOGER, F-78850 Thiverval-Grignon, France

‡Present address: INRAE, Cirad, IRD, Montpellier SupAgro, Université de Montpellier, PHIM, F-34000 Montpellier, France

Corresponding author:

Fabien Halkett

INRAE Centre Grand-Est – Nancy, UMR 1136 Interactions Arbres-Microorganismes, F-54280, Champenoux, France

E-mail: fabien.halkett@inrae.fr

Abstract

The deployment of plant varieties carrying resistance genes (*R*) exerts strong selection pressure on pathogen populations. Rapidly evolving avirulence genes (*Avr*) allow pathogens to escape *R*-mediated plant immunity through a variety of mechanisms, leading to virulence. The poplar rust fungus *Melampsora larici-populina* is a damaging pathogen of poplars in Europe. It underwent a major adaptive event in 1994, with the breakdown of the poplar *RMlp7* resistance gene. Population genomics studies identified a locus in the genome of *M. larici-populina* that likely corresponds to the candidate avirulence gene *AvrMlp7*. Here, to further characterize this effector, we used a population genetics approach on a comprehensive set of 281 individuals recovered throughout a 28-year period encompassing the resistance breakdown event. Using two dedicated molecular tools, genotyping at the candidate locus highlighted two different alterations of a predominant allele found mainly before the resistance breakdown: a non-synonymous mutation and a complete deletion of this locus. This results in six diploid genotypes: three genotypes related to the avirulent phenotype and three related to the virulent phenotype. The temporal survey of the candidate locus revealed that both alterations were found in association during the resistance breakdown event. They pre-existed before the breakdown in a heterozygous state with the predominant allele cited above. Altogether, these results suggest that the association of both alterations at the candidate locus *AvrMlp7* drove the poplar rust adaptation to *RMlp7*-mediated immunity. This study demonstrates for the first time a case of adaptation from standing genetic variation in rust fungi during a qualitative resistance breakdown.

Keywords

molecular evolution, gene-for-gene interaction, fungal pathogen, effector

1. INTRODUCTION

Fungal plant pathogens are a major threat to food security and biodiversity worldwide (Savary et al. 2019). Therefore, it is essential to gain more insight into the evolutionary history of plant pathogens to better control these harmful microorganisms by knowing the limits of their adaptive potential (Zhan et al., 2015).

To colonize and exploit host plants, fungal pathogens express a specific set of genes encoding secreted proteins (Petre et al., 2020). Among these, pathogenicity factors (or effector proteins) modulate host defense responses. To control diseases, modern agriculture widely uses plants with qualitative resistances relying on major resistance genes (*R*) (Stukenbrock & McDonald, 2008). Typically, *R* proteins recognize effector proteins and trigger host defense responses (Kourelis & Van Der Hoorn, 2018). The genes encoding such recognized effectors are termed avirulence (*Avr*) genes, according to the gene-for-gene model (Flor, 1971) and the avirulent (*Avr*) allele is dominant over virulent (*avr*) allele(s) (Flor, 1956).

R–*Avr* interactions usually result in an all-or-nothing infection outcome and thus tend to cause strong selection pressure on pathogen populations, ultimately resulting in resistance breakdown (Möller & Stukenbrock, 2017; Scholthof, 2006). *R* genes deployed in genetically uniform monocultures are the main risk factor causing pathogen evolution towards resistance breakdown (McDonald & Linde, 2002). Such breakdowns may result from different types of alteration in *Avr* genes. The two most common alterations are non-synonymous SNPs (single nucleotide polymorphisms) mutating *Avr* genes, and partial or complete deletion of *Avr* genes causing their inactivation (Fouché et al., 2018; Frantzeskakis et al., 2020; Rouxel & Balesdent, 2017; Sánchez-Vallet et al., 2018). A single pathogen species can evolve *via* multiple routes to become virulent on a given host. For instance, in *Leptosphaeria maculans*, virulence towards the same *R*-mediated resistance can be conferred by different alterations at the same locus that coexist in pathogen populations (Daverdin et al., 2012; Rouxel & Balesdent, 2017).

Fundamental questions about the dynamics of alterations during a resistance breakdown remain. Two evolutionary scenarios can be considered. On the one hand, adaptation is driven by a *de novo* mutation: virulent individuals emerge rapidly when a new allele appears. On the other hand, adaptation results from standing genetic variation (Barrett & Schluter, 2008): all alleles already exist in the population, but must be combined properly to produce an adapted phenotype. A way to disentangle these two scenarios is to examine the temporal evolution of the alterations leading to resistance breakdown. Here, we tackled this issue in the poplar rust fungus, a plant pathogen subjected to enduring selection pressure exerted by the deployment of *R* genes in the environment (Xhaard et al., 2011).

The poplar rust fungus *Melampsora larici-populina* (Basidiomycota, Pucciniales) is a biotrophic pathogen. The poplar rust life cycle consists of clonal multiplication on poplars alternating with annual sexual reproduction on larch (Duplessis et al., 2021). Commercial poplar cultivation is particularly susceptible to poplar rust because of the intensive and monoclonal poplar plantations carrying selected qualitative resistances (Gérard et al., 2006) that are overcome systematically by the pathogen (Pinon & Frey, 2005). The most damaging resistance breakdown occurred in 1994 when the rust resistance gene *RMlp7* (carried by, e.g., *Populus × interamericana* ‘Beaupré’) was overcome, leading to the invasion in Western Europe of virulent 7 (a7) individuals of *M. larici-populina* (Persoons et al., 2017; Xhaard et al., 2011). Only four years elapsed between detection of the first virulent a7 individuals in Belgium in 1994 and the spread of these individuals throughout France, causing damaging epidemics (Pinon & Frey, 2005; Pinon et al., 1998). Although planting of ‘Beaupré’ decreased, and indeed totally ceased by 2005, this cultivar still predominated in the landscape for around 20 years, maintaining a strong selection pressure on *M. larici-populina* populations. As a consequence, the genetic structure and distribution of poplar rust populations in France was strongly impacted (Persoons et al., 2017; Xhaard et al., 2011). Three genetic groups were identified in France: (i) an ancestral group called ‘Fossil’, containing only avirulent 7 (A7) individuals, which declined from 1994 and vanished in 1998; (ii) a contemporaneous genetic group called ‘Cultivated’, containing almost exclusively virulent a7 individuals, which emerged at the time of the resistance breakdown (1994), and (iii) a third genetic

group called ‘Wild’, containing exclusively avirulent A7 individuals that predominates mostly in south-eastern France where pathogen populations are found mostly on wild poplars and are not affected by commercial poplar plantations (Xhaard et al., 2011; Persoons et al., 2017).

Population genomic analyses identified a unique genomic region under positive selection on chromosome 15 of the *M. larici-populina* 98AG31 reference genome (Persoons et al., 2021; Duplessis et al., 2011). This region harbors a candidate gene that may be associated with *RMlp7*-mediated recognition (Persoons et al., 2021) and thus likely corresponds to the avirulence gene *AvrMlp7*. Three SNPs targeting this gene are associated with the virulence phenotype a7 (Fig. 1), including a non-synonymous SNP at position 2.233.369 (leading to a serine to glycine amino acid substitution at position 81, hereafter abbreviated to S⁸¹G). Because the A7 and a7 alleles were found predominantly in avirulent A7 or virulent a7 populations, respectively (Persoons et al., 2021), we denominated them as Avr (avirulent) and avr (virulent) alleles. Moreover, 11% of virulent individuals appeared to have no sequence coverage at the candidate locus, which would indicate that this region is deleted in comparison to the 98AG31 reference genome (Persoons et al., 2021). This points to a second putative alteration of the avirulent allele.

The aim of this study was to further elucidate whether evolution of the candidate gene is related to resistance breakdown, and which scenario holds for the evolution of allelic frequencies. For this purpose, we used a historical collection of 281 *M. larici-populina* individuals encompassing the resistance breakdown event (i.e. individuals sampled between 1989 and 2016). We thus expanded to a greater extent the sampling used in Persoons et al. (2021), which focused on only four populations representative of the three genetic groups. In the following, we (i) investigated the occurrence of the two alterations at the candidate locus, (ii) assessed genotypes and tested the link with phenotypes, and (iii) examined the temporal evolution of allele frequencies in relation to the neutral population structure.

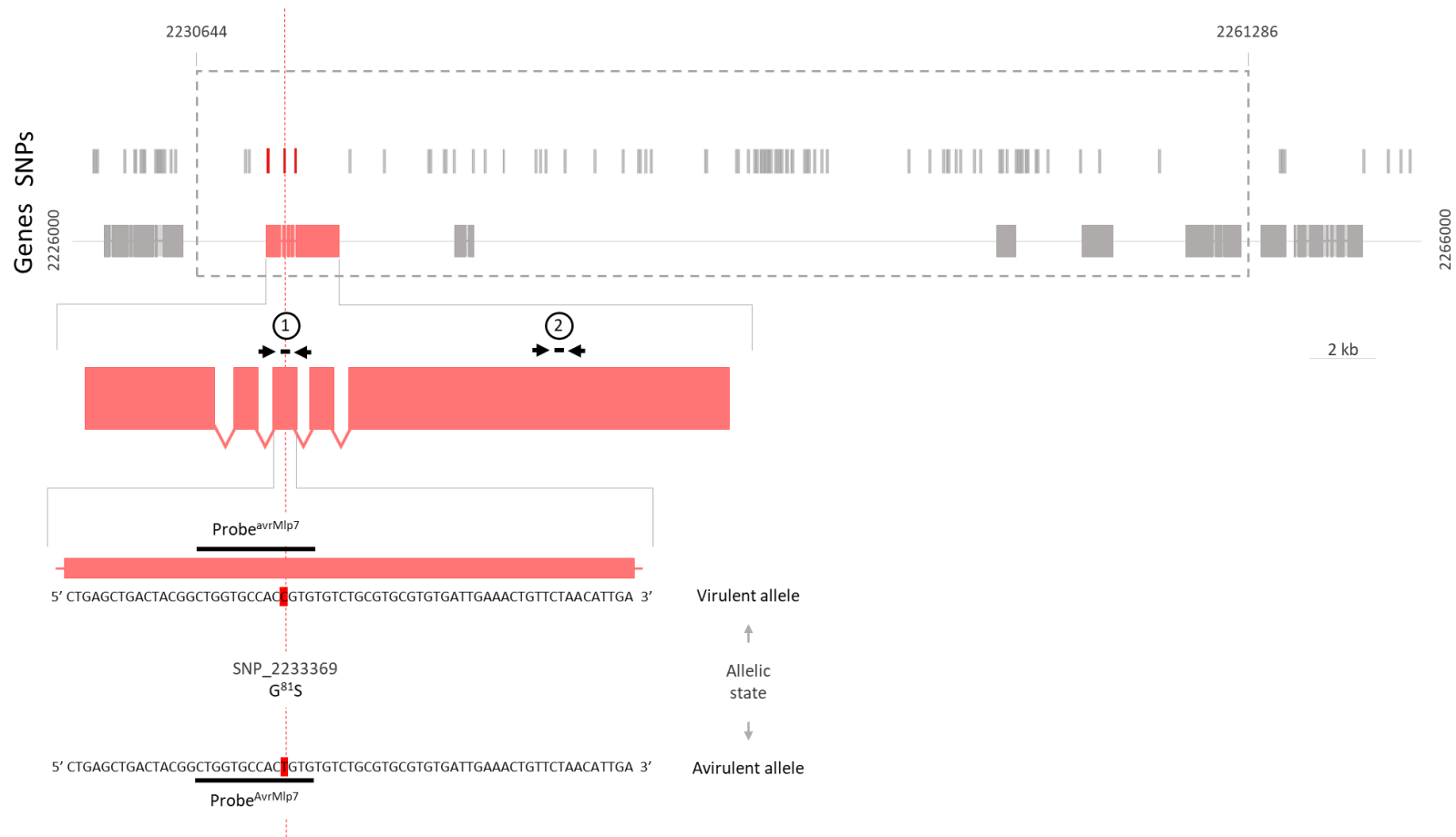


Fig. 1 Genomic organization in the region containing the candidate gene *AvrMlp7*, based on the *Melampsora larici-populina* reference genome 98AG31.

Synonymous single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and non-synonymous SNPs are indicated by grey and red bars, respectively. Displayed SNPs occurred in at least 10% of genomes (i.e. minor allele frequency above 0.1). Genes and the candidate gene are indicated in grey and pink, respectively. The exact limits of the deletion are indicated by the grey dotted box. The vertical red dotted line highlights the non-synonymous SNP at position 2.233.369 on chromosome 15 (C²⁴¹T) leading to a G⁸¹S amino acid substitution in the predicted protein. Relative positions of primers and probes for the allelic discrimination at the SNP_2233369 (1) and testing the copy number variation (2) are shown in the enlargement of the candidate gene. The third exon nucleotide sequences of the candidate gene and the probe locations (Probe^{avrMlp7} and Probe^{AvrMlp7}) used for allelic discrimination at SNP_2233369 are indicated for both virulent and avirulent alleles.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *Melampsora larici-populina* individuals

Sampling comprised 354 individuals collected from 1989 to 2016, mainly in the Northeast part of France and Belgium (where the resistance breakdown occurred). These individuals were selected from a historical collection maintained at INRAE Grand-Est Nancy, France. This sampling included most individuals from the previous study of Persoons et al. (2017) and extended the time-period covered by the analysis (Table 1; Table S1, Supporting Information).

Individuals were phenotyped for their ability to overcome *RMlp7*-mediated recognition (Section 2.3) and were genotyped with 22 microsatellite loci (Section 2.4). A total of 73 individuals were excluded from further analyses either because they had missing data, they were clonemates or they appeared to be mixtures of genotypes. Of the remaining 281 individuals, 111 were original for this study.

Table 1 *Melampsora larici-populina* individuals used in the study, with their phenotype towards the *RMlp7*-mediated resistance and their assignment to one of three genetic groups (Fossil, Cultivated, Wild).

Year	Phenotype [†]		No. of isolates	Genetic group			
	A7	a7		Fossil	Cultivated	Wild	Hybrid [‡]
1989	10	-	10	8	-	-	2
1990	5	-	5	5	-	-	-
1991	13	-	13	13	-	-	-
1992	24	-	24	23	-	-	1
1993	19	-	19	19	-	-	-
1994	11	28	39	9	29	1	-
1995	8	22	30	8	22	-	-
1996	3	2	5	1	2	1	1
1997	7	6	13	6	6	1	-
1998	2	22	24	1	21	1	1
1999	3	8	11	-	9	-	2
2001	1	12	13	-	11	2	-
2008	20	30	50	-	30	18	2
2016	2	23	25	-	25	-	-
Total	128	153	281	93	155	24	9

[†]A7, avirulent 7 phenotype towards *RMlp7*; a7, virulent 7 phenotype towards *RMlp7*.

[‡]Hybrids were considered as missing data for subsequent analyses.

2.2. Investigation and delineation of the deletion

The genomes of 66 individuals had previously been sequenced at high depth (80x on average) using Illumina technology, and mapped on the *M. larici-populina* 98AG31 reference genome version 2 (Persoons et al., 2021).

To detect structural variants and identify the boundaries of the deletion, we used GROM (Smith et al., 2017), which operates on paired-end short reads. As recommended by the authors, we aligned reads using the BWA (v.0.7.17) MEM command with default settings. We ran GROM (v.1.0.3) with the -M option (duplicate read filtering). We extracted from GROM's output all structural variants (insertions, deletions or inversions) falling into or overlapping the region located between 2.1 and 2.3 Mbp on chromosome 15. For each variant, we recorded whether these events overlapped with at least one coding exon of any gene, and/or

the SNP_2233369, and we computed Pearson's correlation coefficient between the virulence status of each individual and whether it bore this variant.

To examine further the occurrence of the deletion, we computed the sequencing depth at the position of the SNP_2233369 on chromosome 15. In order to correct for differences in sequencing depth among individuals, we calculated the average depth with the surrounding region (2.2–2.3 Mbp). Variation in relative sequencing depth was partitioned using *K*-means clustering as implemented in the R package *stats* (Cran, v.3.5.2).

2.3. Phenotype assessment

Qualitative virulence phenotypes (i.e. pathotypes) of all individuals were confirmed by inoculation of a poplar cultivar carrying the *RMlp7* resistance gene (*P. x interamericana* 'Beaupré') and of a universal cultivar susceptible to all poplar rust individuals (*P. x euramericana* 'Robusta'), as a positive control, as described in Barrès et al. (2008). Infected 'Robusta' leaf discs of each individual were frozen and stored at –20°C until genomic DNA isolation.

2.4. Genomic DNA isolation and genotyping

Genomic DNA was extracted from infected poplar leaf discs using the DNeasy96 DNA Plant Kit (Qiagen) as described in Maupetit et al. (2018). Genotyping was performed using 22 microsatellite markers (Xhaard et al., 2011) for genotype purity and to avoid potential clones. Genotypes were assigned to the three genetic groups 'Fossil', 'Cultivated' and 'Wild' using the software TESS (Chen et al., 2007) as described in Persoons et al. (2017). Individuals studied in Persoons et al. (2017) were used as controls (Table S1, Supporting Information). A total of 37 individuals displaying mixed membership were removed from further analyses. For population genetic analyses, individuals were pooled according to sampling location and year, resulting in 14 population samples, with at least eight individuals per sample (mean sample size of 17 individuals).

2.5. Analysis of genotype at the candidate locus

2.5.1. Copy number variation:

To detect deletion of the candidate locus, a TaqMan Copy Number Assay was performed using the software PRIMEREXPRESS (v.3.0.1, Applied Biosystems) to compare the copy number of the gene of interest against a reference gene with known copy number. Ultra-specific qPCR primers for the candidate gene (forward: 5'-CACTAACCTAACCTAACCTAT-3'; reverse: 5'-TTAAGTGTGAGTTGCCTAAC-3'; Fig. 1) and for the α -Tubulin gene (JGI protein ID no.73137; forward: 5'-CACTAACCTAACCTAACCTAT-3'; reverse: 5'-TTAAGTGTGAGTTGCCTAAC-3) were designed to amplify products of 73 bp and 64 bp, respectively. Two TaqMan fluorogenic probes with different fluorescent dye reporters were used: the first for the candidate gene (5'-FAM-CAACCACCTCGAACCCGCTTCCA-3') and the second for the α -Tubulin gene (5'-VIC-CCCGCTCGCTTCTTACGCCCC-3'). Multiplex assays were performed in technical triplicate in 384-well plates, along with negative controls in each plate, with a final volume of 13 μ L containing the following reaction mixture: 2.7 μ L of nuclease-free water, 6.5 μ L of 2X TaqMan Master Mix (Applied Biosystems), 0.13 μ L of each primer at 30 μ M, 0.13 μ L of each probe at 10 μ M and 3 μ L of uncalibrated genomic DNA. Quantitative PCR runs were performed on a QuantStudio 6 Flex machine (Life Technologies) with the following cycle parameters: 10 min at 95°C, followed by 50 cycles of 15 s at 90°C and 1 min at 60°C. Assuming a signal intensity proportional to the quantity of gene copies, we considered the number of gene copies as the relative difference between the cycle threshold (Ct) of the candidate gene compared with the Ct of the α -Tubulin gene ($2^{-\Delta Ct}$ calculation, Livak & Schmittgen, 2001), present in four copies in the *M. larici-populina* genome (Zhao et al., 2014). Using *K*-means clustering as implemented in the R package *STATS* (Cran, v.3.5.2), individuals were assigned to three categories depending on the number of gene copies detected: two, one, or none. Attribution to one of these categories was checked using error bars representative of the standard deviation from the mean. If error bars overlapped between categories, individuals were re-tested or excluded from subsequent analyses.

2.5.2. Allelic discrimination at SNP_2233369:

To determine the genotype at SNP_2233369, TaqMan SNP Genotyping Assays were performed using primers and probes designed using PRIMEREXPRESS (v.3.0.1, Applied Biosystems). Two ultra-specific qPCR primers were designed to amplify a 130-bp product encompassing SNP_2233369 of the candidate gene (forward: 5'-ACGTGCTTTTGTGGAGCAGTT-3'; reverse: 5'-TCAGTATGCGTCCTGACTCGTAA-3'). Two fluorogenic TaqMan minor groove binder (MGB) probes were designed, with different fluorescent dye reporters. The FAM-labelled probeAvrMlp7 (5'-FAM-CTGGTGCCACCGTG-MGB-3') and the VIC-labelled probeavrMlp7 (5'-VIC-CTGGTGCCACTGTG-MGB-3') were designed to target specifically the avirulent and virulent alleles of the candidate gene, respectively (Fig. 1). Multiplex assays were performed in technical triplicate in 384-well plates, along with negative controls in each plate, with a final volume of 5 µL containing the following reaction mixture: 2.5 µL of 2X TaqMan Master Mix (Applied Biosystems), 0.25 µL of 20X Assay Working Stock (containing primers and both probes) and 2.25 µL of uncalibrated genomic DNA. Quantitative PCR runs were performed on a QuantStudio 6 Flex machine (Life Technologies) with the following cycle parameters: 30 s at 60°C, 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 90°C and 1 min at 60°C and 30 s at 60°C to finish. Fluorescence data were obtained using the QuantStudio Real-Time PCR Software (v.1.3). The average of FAM and VIC fluorescences were normalized by the ROX basal fluorescence present in the 2X TaqMan Master Mix and compared with each other. Using K-means clustering as described above, individuals were assigned to four categories: homozygous Avr/Avr, heterozygous Avr/avr, homozygous avr/avr and undetermined. Attribution to one of these categories was checked using error bars representative of the standard deviation from the mean. If error bars overlapped between categories, individuals were re-tested or excluded from subsequent analyses.

2.6. Analysis of genetic diversity at the candidate locus and neutral loci

The genetic diversity of temporal samples was analysed using the nonneutral candidate locus. Hardy-Weinberg equilibrium was tested using Fisher's exact tests as implemented in the R package GENEPOP (Rousset et al., 2020) on all individuals pooled into 14 populations according to the collection year and regardless of the initial location. To estimate the *P*-value for Fisher's exact test, a Markov chain algorithm was implemented using the following parameters: dememorization, 1000; number of batches, 200; iterations per batch, 5000. Using neutral loci (22 microsatellite loci), we also analysed basic population genetics statistics using the R package HIERFSTAT (Goudet & Jombart, 2015) and the population structure with a discriminant analysis of principal components (DAPC, Jombart et al., 2010) as implemented in the R package ADEGENET (Jombart, 2008; Jombart & Ahmed, 2011). In a second step, we grouped individuals according to their genotype at the candidate locus to examine further the link between neutral genetic variation and the locus under selection. These analyses are presented as supplementary information (Annex S1, Supporting Information).

2.7. Statistical analyses

A Fisher's exact test was used to test the null hypothesis of independence between the genotype at the candidate locus and the phenotype towards *Rmlp7*-mediated resistance. This test was performed using the `fisher.test` R function with a two-sided alternative hypothesis; a *P*-value < 0.001 was considered significant. To evaluate the evolution of allele and genotype frequencies over years, a linear regression was performed using the software R; a *P*-value < 0.05 was considered significant.

3. RESULTS

3.1 A deletion occurs at the candidate locus

With GROM, we detected 339 structural variants in the 2.1–2.3 Mbp region of chromosome 15 using data from Persoons et al. (2021). Among these 339 variants, 202 affected the coding sequence of at least one gene, including 121 deletion or inversion variants affecting SNP_2233369. No insertions were found close to this SNP. Among the 121 variants spanning SNP_2233369, there were 52 large inversions (>1 Mbp and

spanning the whole region) unlikely to have a functional effect. Among the remaining 69 deletions, only one displayed a strong positive correlation with virulence $a7$ phenotype ($r=0.25$). This deletion had a length of 30 kb ranging from position 2.230.644 to 2.261.286 (Fig. 1).

To investigate the occurrence of this deletion at the candidate gene, we examined the variation in sequencing depth at this locus on genomic sequences from 66 whole-genome sequenced individuals. Strong differences were observed (Table S2, Supporting Information). In particular, four individuals showed a sequencing depth lower than 1X both at the SNP_2233369 position and over the flanking region, suggesting the presence of a large deletion estimated between position 2.23 and 2.26 Mbp on chromosome 15 of the 98AG31 reference genome (Fig. 2A; Table S2, Supporting Information). Furthermore, these four individuals (two from 1994 and two from 1998) originated from the ‘Cultivated’ group and were phenotypically virulent toward the *RMlp7*-mediated resistance. However, the large heterogeneity of sequencing depth at the locus (from 0 to 153.4X) could be indicative of a deletion affecting only one chromosome (i.e. a deletion allele at the heterozygous state). To correct for overall differences in sequencing depth, we computed the average sequencing depth along a larger genomic region ranging from 2.2 to 2.3 Mbp for all other individuals. As illustrated in Fig. 2A, the weighted sequencing depth at the candidate gene *AvrMlp7* clustered in three patterns (for details see Table S2, Supporting Information): a reference pattern exhibiting a regular sequencing depth in comparison with flanking regions, as in the *M. larici-populina* 98AG31 reference genome (pattern A); a halved sequencing depth in comparison to flanking regions (pattern B); and a lack of reads in this region (pattern C). Altogether, these results identified one unique deletion at the candidate locus affecting either one or both chromosomes.

3.2. The candidate locus displays six possible genotypes

To determine the genotype at the candidate locus, two TaqMan discrimination assays were performed on 281 individuals, after validation on 66 whole-genome sequenced individuals (Table S2, Supporting Information). In a first step, we determined the occurrence of the deletion resulting in the null (\emptyset) allele. Following the relative signal intensity ($2^{-\Delta Ct}$ ratio), the copy number variation assay indicated that clustering in three categories ($K_{max} = 3$) was the best partition (Fig. 2B). In addition, the three categories identified by the *K*-means partition perfectly matched the grouping into the three sequencing depths described above. Therefore, pattern A corresponds to individuals with two copies of the gene, pattern B corresponds to individuals with one copy of the gene and a null allele, and pattern C corresponds to individuals with two null alleles (denoted as \emptyset/\emptyset). In a second step, allelic discrimination at the SNP_2233369 locus was performed to determine the specific alleles at the one or two copies of the gene present: only the avirulent allele, only the virulent allele, or both alleles (i.e. heterozygous individuals) (Fig. S1, Supporting Information). By combining the results of the two assays, six genotypes were identified at the *AvrMlp7* locus: the homozygous genotypes *Avr/Avr*, *avr/avr* and \emptyset/\emptyset and the heterozygous genotypes *Avr/avr*, *Avr/ \emptyset* and *avr/ \emptyset* . No significant departure from Hardy-Weinberg proportions was observed (*P*-values ranging from 0.11 to 1; Table S3, Supporting Information). To conclude, the three alleles can be found in random association at the genotype level.

3.3. Genotypes at the candidate locus are linked to virulence phenotypes

To evaluate whether the candidate avirulence gene is involved in *RMlp7*-mediated recognition, we compared the genotypic states at the candidate locus with the qualitative virulence phenotype for the

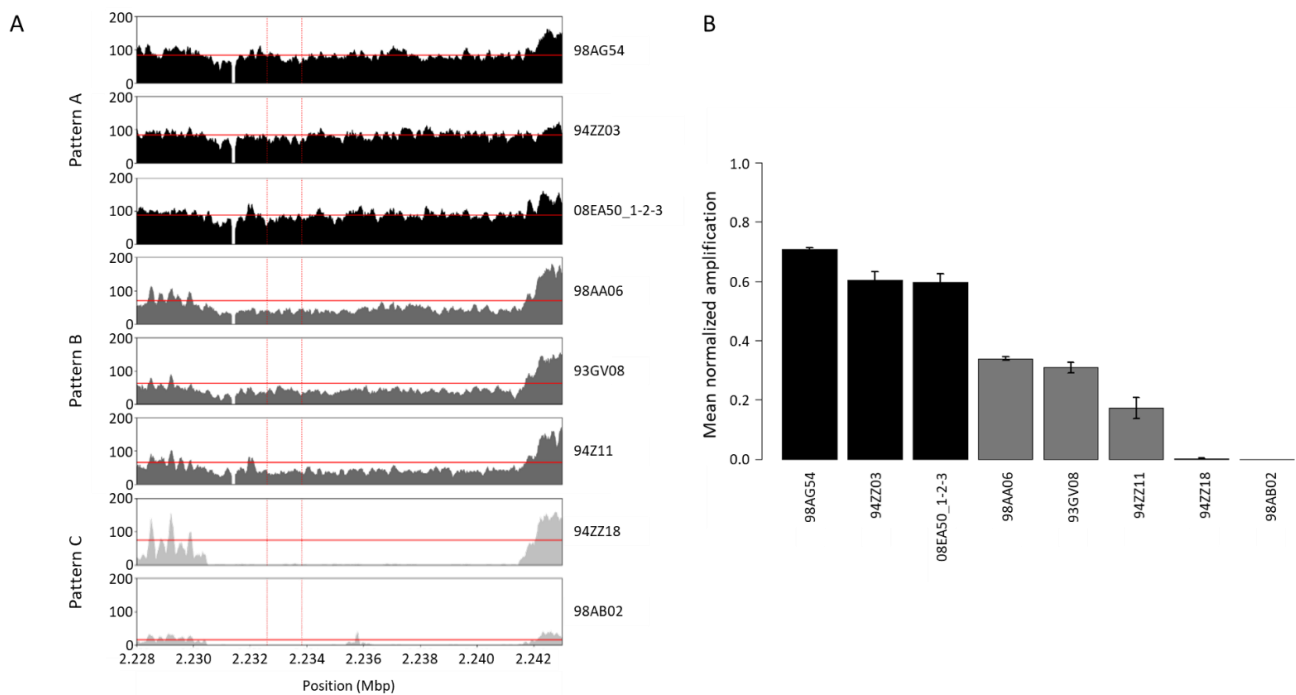


Fig. 2 Patterns of sequencing depth in the region containing the candidate locus *AvrMlp7* and amplification of the candidate gene in eight *Melampsora larici-populina* individuals.

(A) Raw sequencing depth from eight individuals after mapping of the sequencing reads on chromosome 15 of the 98AG31 reference genome. The region impacted by the deletion was shortened to better illustrate the three distinct patterns of sequencing depth among individuals: pattern A with a regular sequencing depth in comparison with flanking regions, pattern B with a decreased sequencing depth in comparison with flanking regions and pattern C with a total lack of sequencing depth in comparison with flanking regions. The vertical red dotted lines encompass the exact position of the candidate gene and the horizontal red line represents the average depth between flanking regions of the candidate locus (2.2 to 2.3 Mbp) along chromosome 15. (B) Mean normalized amplification of the candidate gene from the same eight individuals. The colors represent the individual assignment by K-means clustering ($K_{max} = 3$). Error bars indicate the standard deviation of the mean.

281 *M. larici-populina* individuals (Table 2; Table S1, Supporting Information). Overall, three genotypes (*Avr/Avr*, *Avr/avr* and *Avr/∅*) are associated with avirulent A7 individuals and the other three genotypes (*avr/avr*, *avr/∅* and *∅/∅*) are associated with virulent a7 individuals (Table 2), suggesting dominance of the avirulent allele and a gene-for-gene relationship scenario. Only five individuals (out of 281), i.e. 1.8% of analyzed samples, presented a discrepancy between the genotype and the expected phenotype according to the gene-for-gene relationship. The match between genotypes and expected virulence phenotypes was highly significant according to a Fisher's exact test; the probability of observing this result by chance was $P < 0.001$ (P -value = 0.0005). In conclusion, we observed a tight link between the genotype at the candidate avirulence locus and the virulence phenotype.

Table 2 Genotypes identified at the candidate locus *AvrMlp7* in relation to phenotypes towards the *RMlp7* resistance gene.

Phenotype†	Genotype‡						Total
	<i>Avr / Avr</i>	<i>Avr / avr</i>	<i>Avr / ∅</i>	<i>avr / avr</i>	<i>avr / ∅</i>	<i>∅ / ∅</i>	
A7	64	27	33	-	1	3	128
a7	-	1	-	44	58	50	153
Total	64	28	33	44	59	53	281

†A7, avirulent 7 phenotype towards *RMlp7*; a7, virulent 7 phenotype towards *RMlp7*.

‡ Genotype at the *AvrMlp7*

3.4. Both the virulent and the null alleles expanded rapidly at the time of resistance breakdown

To study the temporal evolution of the polymorphism at the candidate locus during the RMIp7 resistance breakdown event, we calculated allelic frequencies according to years and genetic groups (Fig. 3). In the ‘Fossil’ group, including only avirulent A7 individuals, we observed a predominance of the avirulent allele (75%) with no significant difference in frequency over time (P -value = 0.610). Notably, both the virulent and the null alleles were identified in the ‘Fossil’ group (8% and 17%, respectively), already five years before the breakdown of RMIp7-mediated resistance. In the ‘Wild’ group containing only avirulent A7 individuals, we also observed the predominance of the avirulent allele (69%). Conversely, in the ‘Cultivated’ group, emerging at the time of the resistance breakdown in 1994, the avirulent allele had almost disappeared (0.01%) in favor of the virulent (48%) and the null (51%) alleles. In addition, the frequency of the null allele increased significantly (P -value = 0.019) from 17% in 1994 to 82% in 2016, whereas the frequency of the virulent allele decreased significantly during this period (P -value = 0.012). Therefore, the allelic evolution of the candidate locus coincided with the change in neutral population structure of *M. larici-populina* (Annex S1, Supporting Information). To conclude, the RMIp7 resistance breakdown event is associated with a concomitant increase in frequency of both the virulent and the null alleles, and the null allele has taken over in recent years.

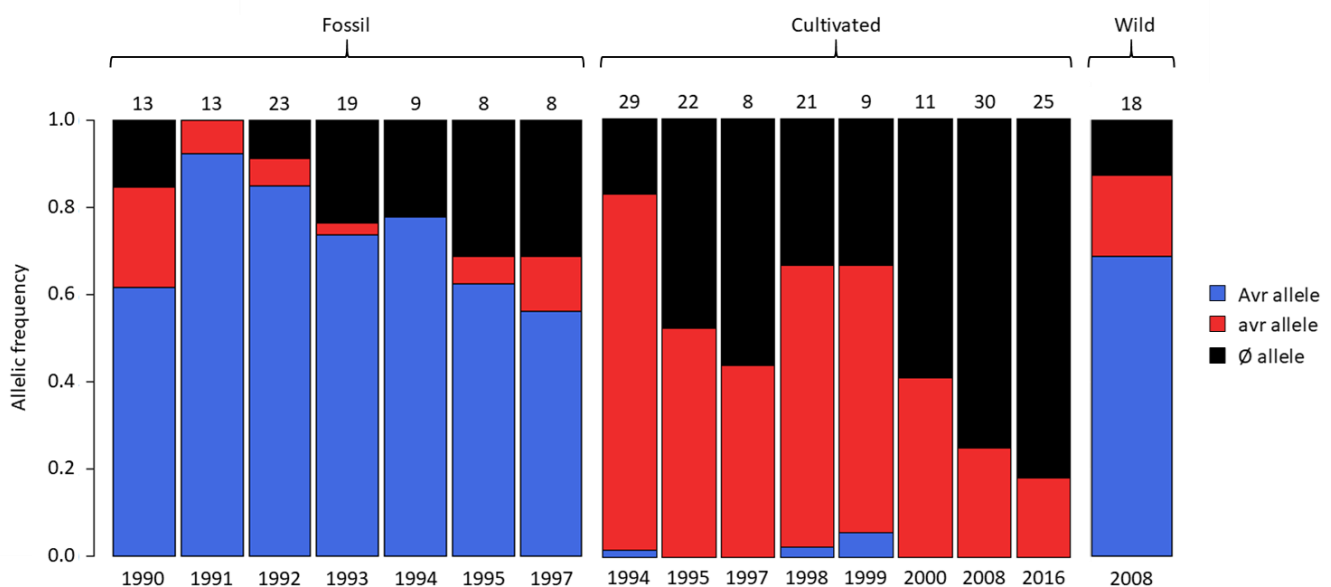


Fig. 3 Cumulative frequencies of alleles at the candidate locus *AvrMlp7* in *Melampsora larici-populina* individuals according to genetic group and sampling years.

Numbers at the top indicate the number of individuals assayed. To balance sample sizes, the years 1990 and 1997 in Fossil group gather individuals collected in 1989–1990 and 1996–1997–1998, respectively and the year 1997 in Cultivated group gather individuals collected in 1996–1997. Avr: avirulent allele; avr: virulent allele; Ø: null allele.

4. DISCUSSION

Our study has helped elucidate the complexity of a double molecular alteration in a diploid organism, the poplar rust fungus, *M. larici-populina*. We based our analyses on a comprehensive temporal sampling that was made possible thanks to a large historical collection covering 28 years of contemporaneous evolution encompassing the RMIp7 breakdown event. Three alleles were detected in a specific candidate for the avirulence gene *AvrMlp7*, the avirulent allele that predominated initially, and the virulent and null alleles that burst onto the scene at the time of resistance breakdown. The evolution of this candidate gene is related to the emergence of the virulent phenotype a7 and the change in genetic structure in poplar rust populations.

4.1. The candidate gene seems to follow a gene-for-gene relationship

Through our screening of 281 individuals of *M. larici-populina*, we found an almost perfect concordance between genotypes at the candidate locus and phenotypes towards the *RMIp7*-mediated resistance. Three genotypes (*Avr/Avr*, *Avr/avr* and *Avr/∅*) are associated with avirulence and the three others (*avr/avr*, *avr/∅* and *∅/∅*) with virulence. Assuming a gene-for-gene relationship (Flor, 1971), our results are consistent with the avirulent allele being dominant over other alterations conferring virulence, namely the virulent and the null alleles. However, we found five individuals out of the 281 studied that did not follow this phenotype-genotype match, suggesting the existence of other alterations not yet identified. Our analysis of candidate gene polymorphisms is based on the genomic variation identified from a limited number of genomes (Persoons et al. 2021). By enlarging the screening of individuals, we broadened the genomic background, hence revealing mismatches that would be indicative of other putative alterations occurring at a much-reduced frequency. A given avirulence gene can be altered in different ways (Rouxel & Balesdent, 2017). These additional genomic alterations may impact pathogen fitness more heavily, which could explain their reduced frequency, as observed for viruses (Fabre et al. 2012). Conversely, the two alterations identified here would be the least costly, and were therefore retained throughout the evolution of poplar rust populations during resistance breakdown.

Until now, only a handful of *Avr* genes have been characterized in rust fungi (Chen et al., 2017; Petre et al., 2014; Salcedo et al., 2017; Upadhyaya et al., 2021; Wu et al., 2020). The obligate biotrophy nature of rust fungi represents a challenge, which explains the limited number of functional studies (Lorrain et al., 2019). Some authors have managed to bypass these limitations with indirect characterization using progenies and genetic mapping, e.g. in the wheat stem rust *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (Zambino et al., 2000), in the pine rust *Cronartium quercuum* f. sp. *fusiforme* (Kubisiak et al., 2011) and, most recently, in the wheat yellow rust *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (Wang et al., 2018). Our study proved that population genetics can be an efficient method with which to identify and investigate a putative avirulence gene in diploid pathogens. A formal demonstration of avirulence function will require functional approaches targeting the avirulent allele.

4.2. Virulence towards *RMIp7* results from two non-exclusive molecular mechanisms

Here, we identified two non-exclusive alterations at the candidate locus *AvrMlp7* within diploid genotypes. Generally, an allele resulting from non-synonymous SNP(s) presents an altered version of the avirulence *Avr* protein, allowing escape from recognition mediated by the corresponding *R* protein (Ve et al., 2013; Wang et al., 2007). Nevertheless, some virulent pathogens are characterized mainly by knockout alterations such as the complete loss of the avirulence gene. In the wheat stem rust fungus *P. graminis* f. sp. *tritici*, the genes *AvrSr35* and *AvrSr50* contain large insertions of 57 kbp and 26 kbp, respectively, that resulted from transposon-mediated disruptions (Chen et al., 2017; Salcedo et al., 2017). Similarly, a deletion of a large genomic region containing an avirulence gene was shown to be responsible for a gain in virulence in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* (Hartmann et al., 2017) and the oilseed rape pathogen *L. maculans* (Gout et al., 2007). In our study, sequencing depth analyses highlighted that the two breakpoints of the deletion encompassing the candidate gene *AvrMlp7* exhibited the same motif, suggesting a single deletion event, which then spread widely within poplar rust populations.

In haploids, any alteration of the avirulence gene (e.g. a non-synonymous mutation (*avr*) or gene inactivation caused by a deletion (\emptyset)) determines the virulence phenotype in a straightforward relationship (Fig. 4A, B). For diploid pathogens, the relationship is more complex as alleles conferring virulence are usually recessive (Flor, 1956). In this case, the occurrence of an *Avr* allele (even in a heterozygous state) is sufficient to trigger plant resistance (Fig. 4C). It was thus already shown that a diploid pathogen can evolve through several alteration events leading to virulence towards an *R* gene. High levels of polymorphism in avirulence genes have also been reported in other rust fungi, as in the flax rust fungus *Melampsora lini*, where proteins *AvrL567* and *AvrM* exhibit multiple allelic variants or a copy number variation with different alleles, directly impacting pathogenicity (Catanzariti et al., 2006; Dodds et al., 2004). Here, we demonstrated that any association of alleles can confer the virulence phenotype (Fig. 4D).

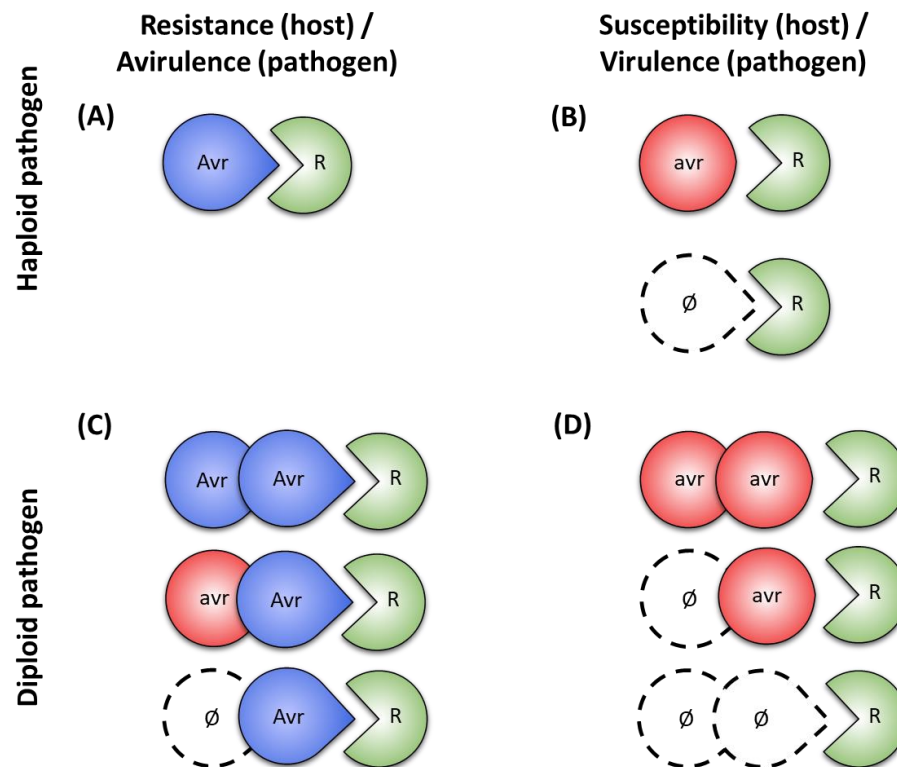


Fig. 4 Difference in molecular determinism of R-mediated resistance between haploid and diploid pathogens.

For haploid pathogens, the outcome of the interaction between the pathogen's avirulence gene and the resistance gene (*R*) is straightforward: (A) the effector protein encoded by the avirulent allele (*Avr*) is recognized, directly or indirectly, by the *R* gene product, which triggers host resistance; (B) the virulent allele, e.g. a non-synonymous mutation (*avr*) or a deletion (\emptyset) of the avirulent allele leads to host susceptibility because of a lack of recognition by the *R* gene product. For diploid pathogens the interaction is complicated by the dominance of the avirulent allele: (C) a single haploid copy of the avirulent allele is sufficient for recognition by the *R* gene product and initiation of host resistance; (D) only the association of two recessive virulent alleles can lead to host susceptibility.

4.3. A point mutation and a large deletion were combined during resistance breakdown

Our study revealed the presence of the two alterations at least five years before *RMlp7* resistance breakdown, but, once this resistance was overcome, their frequency increased rapidly. Therefore, adaptation of *M. larici-populina* to *RMlp7*-mediated resistance resulted from selection from standing genetic variation (Barrett & Schluter, 2008). However, at least five years elapsed before the establishment of a favorable combination leading to virulence towards the *RMlp7*-mediated resistance. The dikaryotic state of rust fungi impedes the evolution of virulence, because of the dominance of the avirulent allele. Alleles conferring virulence are subjected mostly to drift as long as they are in the heterozygous state. In this respect, a recent modelling study on the dynamics of resistance breakdown highlighted that the diploid state leads to much more unpredictable evolutionary trajectories, with a delayed time for fixation of the

virulence compared with haploids (Saubin et al., 2021). This phenomenon is further marked in pathogens such as *M. larici-populina* that require an alternate host to complete their life cycle. Indeed, obligate migration to resistant and susceptible hosts after sexual reproduction on the alternate host causes high rates of mortality of avirulent individuals, especially when the resistant host predominates in the landscape. As long as virulent allele(s) frequency is low, no genotypes missing the avirulent allele are produced, hence no phenotypically virulent individual exists. By contrast, once the resistance is overcome, the virulent allele(s) spread massively in the landscape (over both resistant and susceptible hosts) and the avirulent allele collapses rapidly, even in individuals living on susceptible hosts (Saubin et al., 2021). Such modeling work is in accordance with our observations. Here, the scenario is complicated by the occurrence of the virulent and null alleles, conferring virulence. The fact that they are not mutually exclusive likely fostered the pace of this breakdown event and contributed to the rapid emergence of the ‘Cultivated’ group. According to this scenario, the ‘Cultivated’ population might have been founded from a single event, as previously suggested (Persoons et al., 2017). Replacement of the ‘Fossil’ population (described in Persoons et al., 2017) coincided with the replacement of the avirulent allele by the two alleles conferring virulence.

4.4. Does the null allele confer a fitness advantage?

Whereas the two alleles conferring virulence exploded at the time of resistance breakdown, their relative frequency was not stable through time afterwards. We observed a significant increase in the frequency of one allele leading to the predominance of the null allele in contemporary populations. This variation can be neutral (resulting from genetic drift), but may also suggest a consequence on fitness for individuals carrying either allele. Genetic modifications leading to the acquisition of a new virulence may be accompanied by unfavorable effects (Leach et al., 2001). Indeed, the avirulence genes are involved primarily in various functions necessary for infection (Khan et al., 2018). Any alteration at the avirulence locus can thus translate into a reduction in fitness, the so-called fitness cost of virulence (van der Plank, 1963). No such cost has been reported so far in poplar rust; virulent individuals were found to display the same level of disease-associated traits as avirulent individuals (Maupetit et al., 2021). However, this latter study did not consider the two types of alterations conferring virulence. The deletion may provide an advantage over point mutation mechanisms because of the absence of cost associated with the synthesis of the mutated protein. Examining the fitness advantage or disadvantage of each allele in more detail will require a dedicated study, monitoring several traits associated with completion of the infection process and life cycle.

5. CONCLUSION

Efforts dedicated to developing new analysis strategies for avirulence genes have focused mostly on haploid organisms (Bakkeren & Szabo, 2020). Here, we proposed a method combining population genetics and molecular approaches to investigate the candidate avirulence gene *AvrMlp7* in *M. larici-populina*, a diploid fungus responsible for poplar rust disease. We identified two alterations at the candidate locus: a single nucleotide mutation and a complete deletion. These two alleles co-occurred within pathogen populations and associated randomly within individuals. To our knowledge, this is the first demonstration that two alterations conferring virulence can combine within a diploid individual. Their association increased the chance of observing virulent phenotypes and was probably responsible for the breakdown of *RMlp7*-mediated resistance in 1994.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jean Pinon for creating the historical poplar rust collection at INRAE Nancy in the 1980s. We warmly thank Fanny Hartmann for constructive comments on a previous version of the manuscript, and Benjamin Petre for proofreading an early version of manuscript, a thousand blessings to him. We also thank Tatiana Giraud and four anonymous reviewers for detailed comments and suggestions which helped improve the manuscript. Helen Rothnie corrected the English language. This work was supported by grants

from the French National Research Agency (ANR-18-CE32-0001, Clonix2D project; ANR-17-CE32-0010, WABSARF project; ANR-11-LABX-0002-01, Cluster of Excellence ARBRE). Clémentine Louet was supported by a PhD fellowship from the Région Lorraine and the French National Research Agency (ANR-18-CE32-0001, Clonix2D project). Méline Saubin was supported by a PhD fellowship from INRAE and the French National Research Agency (ANR-18-CE32-0001, Clonix2D project). Antoine Persoons was supported by a PostDoc fellowship from the Region Grand-Est and the French National Research Agency (ANR-11-LABX-0002-01, Lab of Excellence ARBRE).

DATA ACCESSIBILITY

Virulence phenotype towards the *RMIp7-mediated* resistance and genotype at the *AvrMlp7* locus as well as microsatellite data from the 281 individuals will be made available on Dryad repository and released at the time of publication.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.L., M.S., P.F. and F.H. conceived and designed the study. C.L. and A.A. designed and performed molecular experiments. M.S., J.P. and B.F. performed individual cultures and virulence type analyses. C.L., M.S., M.G. and F.H. performed the genotyping. S.D.M. and F.H. performed the alignment. C.L., M.S., S.D.M., A.P. and F.H. analyzed the data. C.L. and F.H. prepared the manuscript. All authors revised and approved the manuscript.

REFERENCES

- Bakkeren G, Szabo LJ (2020) Progress on molecular genetics and manipulation of rust fungi. *Phytopathology*, **110**, 532–543
- Barrès B, Halkett F, Dutech C *et al.* (2008) Genetic structure of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*: evidence for isolation by distance in Europe and recent founder effects overseas. *Infection, Genetics and Evolution*, **8**, 577–587.
- Barrett LG, Schluter D (2008). Adaptation from standing genetic variation. *Trends in Ecology and Evolution*, **23**, 38–44.
- Catanzariti AM, Dodds PN, Lawrence GJ, Ayliffe MA, Ellis, JG (2006) Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *The Plant Cell*, **18**, 243–256.
- Chen C, Durand E, Forbes F, François O (2007) Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: a new computer program and a comparison study. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 747–756.
- Chen J, Upadhyaya NM, Ortiz D *et al.* (2017) Loss of *AvrSr50* by somatic exchange in stem rust leads to virulence for *Sr50* resistance in wheat *Science*, **358**, 1607–1610.
- Daverdin G, Rouxel T, Gout L *et al.* (2012) Genome structure and reproductive behaviour influence the evolutionary potential of a fungal phytopathogen. *PLoS Pathogens*, **8**, e1003020.
- Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti AM, Ayliffe MA, Ellis JG (2004) The *Melampsora lini AvrL567* avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. *The Plant Cell*, **16**, 755–768.
- Duplessis S, Lorrain C, Petre B *et al.* (2021) Host adaptation and virulence in heteroecious rust fungi. *Annual Review of Phytopathology*, **59**, 171–1720.
- Flor HH (1956) The complementary genic systems in flax and flax rust. *Advances in Genetics*, **8**, 29–54.
- Flor HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, **9**, 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.
- Frantzeskakis L, Di Pietro A, Rep M, *et al.* (2020) Rapid evolution in plant–microbe interactions – a molecular genomics perspective. *New Phytologist*, **225**, 1134–1142.
- Gérard PR, Husson C, Pinon J, Frey P (2006) Comparison of genetic and virulence diversity of *Melampsora*

- larici-populina* populations on wild and cultivated poplar and influence of the alternate host. *Phytopathology*, **96**, 1027–1036.
- Goudet J (2015) Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes*, **5**, 184–186.
- Gout L, Kuhn ML, Vincenot L *et al.* (2007) Genome structure impacts molecular evolution at the *AvrLm1* avirulence locus of the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Environmental Microbiology*, **9**, 2978–2992.
- Hacquard S, Petre B, Frey P *et al.* (2011) The poplar-poplar rust interaction: insights from genomics and transcriptomics. *Journal of Pathogens*, **2011**.
- Hartmann FE, Sánchez-Vallet A, McDonald BA, Croll D (2017) A fungal wheat pathogen evolved host specialization by extensive chromosomal rearrangements. *The ISME Journal*, **11**, 1189–1204.
- Jombart T (2008) ADEGENET: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, **24**, 1403–1405.
- Jombart T, Ahmed I (2011) adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*, **27**, 3070–3071.
- Jombart T, Devillard S, Balloux F (2010) Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, **11**, 94.
- Khan M, Seto D, Subramaniam R, Desveaux D (2018) Oh, the places they'll go! A survey of phytopathogen effectors and their host targets. *The Plant Journal*, **93**, 651–663.
- Kourelis J, Van Der Hoorn RAL (2018) Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function. *The Plant Cell*, **30**, 285–299.
- Kubisiak TL, Anderson CL, Amerson HV *et al.* (2011) A genomic map enriched for markers linked to *Avr1* in *Cronartium quercuum* fsp *fusiforme*. *Fungal Genetics and Biology*, **48**, 266–274.
- Leach JE, Vera Cruz CM, Bai J, Leung H (2001) Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annual Review of Phytopathology*, **39**, 187–224.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, **25**, 402–408.
- Lorrain C, Gonçalves dos Santos KC, Germain H, Hecker A, Duplessis S (2019) Advances in understanding obligate biotrophy in rust fungi. *New Phytologist*, **222**, 1190–1206.
- Maupetit A, Larbat R, Pernaci M *et al.* (2018) Defense compounds rather than nutrient availability shape aggressiveness trait variation along a leaf maturity gradient in a biotrophic plant pathogen. *Frontiers in Plant Science*, **9**, 1396.
- Maupetit A, Fabre B, Pétrowski J *et al.* (2021) Evolution of morphological but not aggressiveness-related traits following a major resistance breakdown in the poplar rust fungus, *Melampsora larici-populina*. *Evolutionary Applications*, **14**, 513–523.
- McDonald BA, Linde C (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **40**, 349–379.
- Möller M, Stukenbrock EH (2017) Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, **15**, 756–771.
- Persoons A, Hayden KJ, Fabre B *et al.* (2017) The escalatory Red Queen: population extinction and replacement following arms race dynamics in poplar rust. *Molecular Ecology*, **26**, 1902–1918.
- Persoons A, Maupetit A, Louet C *et al.* (2021) Genomic signatures of a major adaptive event in the pathogenic fungus *Melampsora larici-populina*. *BioRxiv* 2021.04.09.439223.
- Petre B, Joly DL, Duplessis S (2014) Effector proteins of rust fungi. *Frontiers in Plant Science*, **5**, 416.
- Petre B, Lorrain C, Stukenbrock EH, Duplessis S (2020) Host-specialized transcriptome of plant-associated organisms. *Current Opinion in Plant Biology*, **56**, 81–88.
- Pinon J, Frey P (2005) Interactions between poplar clones and *Melampsora* populations and their implications for breeding for durable resistance. In: *Rust diseases of willow and poplar* (eds Pei MH, McCracken AR), pp. 139–154. CAB International, Wallingford, UK.
- Pinon J, Frey P, Husson C, Schipfer A (1998) Poplar rust (*Melampsora larici-populina*): the development of E4 pathotypes in France since 1994. In: *Proceedings of the First IUFRO Rusts of Forest Trees Conference*, Saariselkä, Finland (eds Jalkanen R, Crane PE, Walla JA, Aalto T), pp. 57–64. Finnish Forest Research Institute, Research Paper 712, Saarijärvi.

- Rousset F, Lopez J, Belkhir K (2020) genepop: population genetic data analysis using genepop.
- Rouxel T, Balesdent MH (2017) Life, death and rebirth of avirulence effectors in a fungal pathogen of *Brassica crops*, *Leptosphaeria maculans*. *New Phytologist*, **214**, 526–532.
- Salcedo A, Rutter W, Wang S *et al.* (2017) Variation in the *AvrSr35* gene determines *Sr35* resistance against wheat stem rust race Ug99. *Science*, **358**, 1604–1606.
- Sánchez-Vallet A, Fouché S, Fudal I *et al.* (2018) The genome biology of effector gene evolution in filamentous plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **56**, 21–210.
- Saubin M, De Mita S, Zhu X, Sudret B, Halkett F (2021) Impact of ploidy and pathogen life cycle on resistance durability. *BioRxiv* 2021.05.28.446112.
- Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ *et al.* (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology and Evolution*, **3**, 430–439.
- Scholthof KBG (2006) The disease triangle: pathogens, the environment and society. *Nature Reviews Microbiology*, **5**, 152–156.
- Smith SD, Kawash JK, Grigoriev A (2017) Lightning-fast genome variant detection with GROM. *GigaScience*, **6**, 1–7.
- Stukenbrock EH, McDonald BA (2008) The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. *Annual Review of Phytopathology*, **46**, 75–100.
- Upadhyaya NM, Mago R, Panwar V *et al.* (2021) Genomics accelerated isolation of a new stem rust avirulence gene-wheat resistance gene pair. *Nature Plants*, **7**, 1220–1228.
- van der Plank JE (1963). *Plant diseases: Epidemics and control*. Academic Press, New York, 349 p.
- Ve T, Williams SJ, Catanzariti AM *et al.* (2013) Structures of the flax-rust effector *AvrM* reveal insights into the molecular basis of plant-cell entry and effector-triggered immunity. *PNAS*, **110**, 17594–17599.
- Wang CIA, Guncar G, Forwood JK *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.
- Wang L, Zheng D, Zuo S *et al.* (2018) Inheritance and linkage of virulence genes in chinese predominant race CYR32 of the wheat stripe rust pathogen *Puccinia striiformis f sp tritici*. *Frontiers in Plant Science*, **9**, 120.
- Wu JQ, Dong C, Song L, Park RF (2020) Long-read-based de novo genome assembly and comparative genomics of the wheat leaf rust pathogen *Puccinia triticina* identifies candidates for three avirulence genes. *Frontiers in Genetics*, **11**, 521.
- Xhaard C, Fabre B, Andrieux A *et al.* (2011) The genetic structure of the plant pathogenic fungus *Melampsora larici-populina* on its wild host is extensively impacted by host domestication. *Molecular Ecology*, **20**, 2739–2755.
- Xu X (2012) Super-races are not likely to dominate a fungal population within a life time of a perennial crop plantation of cultivar mixtures: a simulation study. *BMC Ecology*, **12**, 1–10.
- Zambino PJ, Kubelik AR, Szabo LJ (2000) Gene action and linkage of avirulence genes to DNA markers in the rust fungus *Puccinia graminis*. *Phytopathology*, **90**, 819–826.
- Zhan J, Thrall PH, Papaïx J, Xie L, Burdon JJ (2015) Playing on a pathogen's weakness: using evolution to guide sustainable plant disease control strategies. *Annual Review of Phytopathology*, **53**, 19–43.
- Zhao Z, Liu H, Luo Y *et al.* (2014) Molecular evolution and functional divergence of tubulin superfamily in the fungal tree of life. *Scientific Reports*, **4**, 6746.

SUPPORTING INFORMATION

Annex S1 Analysis of the neutral genetic diversity and population structure of temporal samples collected in Amance (North-East France).

Fig. S1 Illustration of allelic discrimination of the SNP_2233369 at the *AvrMlp7* gene for a subset of *Melampsora larici-populina* whole-genome sequenced individuals.

Table S1 List and characteristics of *Melampsora larici-populina* individuals used in this study.

Table S2 Polymorphism identification at the *AvrMlp7* locus in the 66 whole-genome sequenced individuals of *Melampsora larici-populina*.

Table S3 Analysis of Hardy-Weinberg equilibrium for the non-neutral SNP_2233369 locus of *Melampsora larici-populina* temporal samples from Amance, France.

Annex S1 Analysis of the neutral genetic diversity and population structure of temporal samples collected in Amance (North-East France).

Basic population genetics statistics were computed with the R package HIERFSTAT (Goudet and Jombart 2015) and GENEPOP (Rousset 2008). Our analysis was based on 12 temporal samples from Amance (located in North-East France) because this location represents the largest sampling effort in our collection over the years (Table I).

All samples exhibited almost the same genetic diversity and did not depart significantly from genetic equilibrium (no deviation from Hardy-Weinberg proportions, $P > 0.001$). However, we can observe a slight increase in both allelic richness and expected heterozygosity in 1997 and 1998, which correspond to the time when virulent individuals arrived at Amance (Figure 3 of the main text). This coincided with a slight increase in F_{IS} values, which may be indicative of a Wahlund effect, with a mixture of both virulent and avirulent genotypes at the same time in Amance (see Figure II).

Table I Neutral genetic characteristics of *M. larici-populina* temporal samples from Amance, France. N, number of genotyped individuals; Ar, allelic richness; Ho, observed heterozygosity; He, expected heterozygosity (unbiased estimate of genetic diversity, Nei 1978); HW, deviation from Hardy–Weinberg equilibrium (combined probabilities of the exact HW test using Fisher’s method); F_{IS} , within- and among-individual apportionment of gene diversity.

Sample	Year	N	Ar	Ho	He	HW	F_{IS}
90Am†	1989–90	14	3.729	0.536	0.571	0.316	0.061
91Am	1991	12	2.971	0.386	0.442	0.121	0.126
92Am	1992	21	3.423	0.489	0.531	0.331	0.078
93Am	1993	18	2.943	0.440	0.468	0.159	0.060
94Am	1994	11	3.367	0.448	0.501	0.224	0.105
95Am†	1995–96	12	3.419	0.425	0.519	0.041	0.181
97Am	1997	13	3.764	0.476	0.562	0.288	0.153
98Am	1998	11	3.730	0.538	0.552	0.885	0.025
99Am	1999	9	3.281	0.515	0.506	0.995	−0.018
01Am	2001	8	3.536	0.552	0.536	0.932	−0.031
08Am	2008	30	3.636	0.523	0.533	0.953	0.020
16Am	2016	25	3.651	0.521	0.530	0.342	0.016

† To balance sample sizes, the samples 90Am and 95Am gather individuals collected in 1989–1990 and 1995–1996, respectively.

To study the population structure further, a discriminant analysis of principal components (DAPC) was performed using the R package ADEGENET (Jombart and Collins 2015; Jombart and Ahmed 2011; Jombart 2008). The optimal number of detected clusters was two, in agreement with the elbow in the curve of Bayesian information criterion (BIC) value using the *find.clusters* function (Figure I).

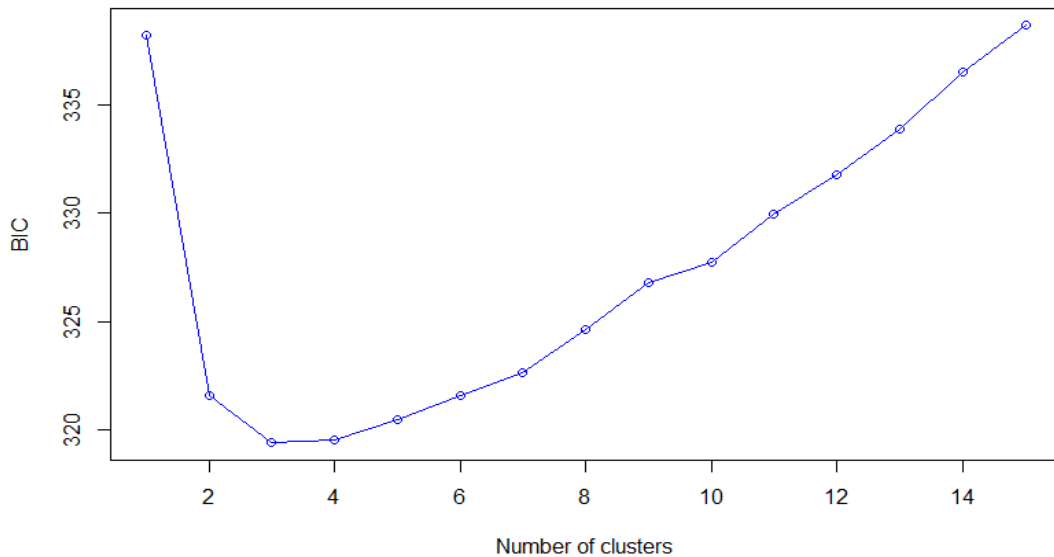


Figure I Bayesian information criterion (BIC) values associated with the tested number of clusters in the ADEGENET analysis. The elbow of BIC (here K=2) represents the optimal number of clusters that should be retained.

DAPC analysis was carried out using the detected optimal number of clusters (K=2). One discriminant eigenvalue (DA) and 45 first principal components (PCs) of the principal component analysis (PCA), explaining 90% of variance conserved, were retained. In this analysis, membership coefficients of individuals to each cluster varied between 0.96 and 1, confirming that the samples were structured with a low admixture level. Figure IIA shows that the two clusters were clearly delineated with respect to the linear discriminant 1 (LD1) axis. According to Figure IIB, cluster 1 represented an ancestral cluster existing since 1989, whereas cluster 2 emerged in 1995. Interestingly, samples from 1995 to 2001 mixed individuals from both clusters. Individual admixture was maximal in 1997 in accordance with the observed peak in diversity indices and F_{IS} values.

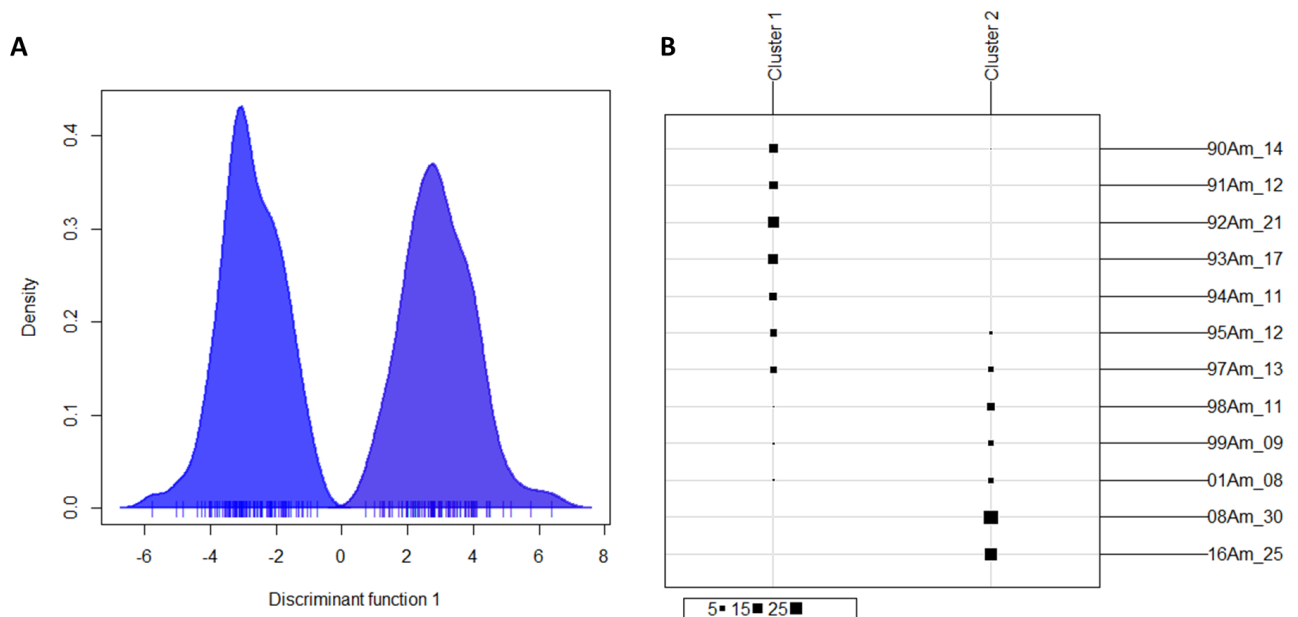


Figure II Discriminant analysis of principal components (DAPC) for *M. larici-populina* genotypes sampled in Amance, France.

(A) Individual densities along the first discriminant function. DAPC analysis was performed with the following parameters: 45 first principal components (PCs) (90% of variance conserved) of the principal component analysis (PCA) and one discriminant eigenvalue (DA). (B) Correspondence between DAPC clustering and Amance samples. The size of each square represents the number of individuals assigned to each DAPC cluster.

To interpret cluster memberships, a second analysis was performed, relaxing the hypothesis on the optimal number of clusters and considering the actual number of temporal samples (K=12). In other words, each temporal sample was considered as a distinct cluster. As for the previous analysis, the same number of first PCs of the PCA was retained. The optimal number of DAs was ten. Figure III clearly shows that the linear discriminant 1 (LD1) separates samples collected before and after 1997. This pivotal date corresponded to the arrival of the first virulent 7 (a7) individuals in Amance (Persoons et al. 2017). The population structure observed in Amance corresponds to the predominance of the ‘Fossil’ genotypes before 1997 (in blue), then replaced by the ‘Cultivated’ genotypes (in red), in accordance with the shift in population structure described in Persoons et al. (2017). The temporal samples ranked roughly along the first axis in accordance with the year of collection, with the notable exception of samples 89Am and 16Am.

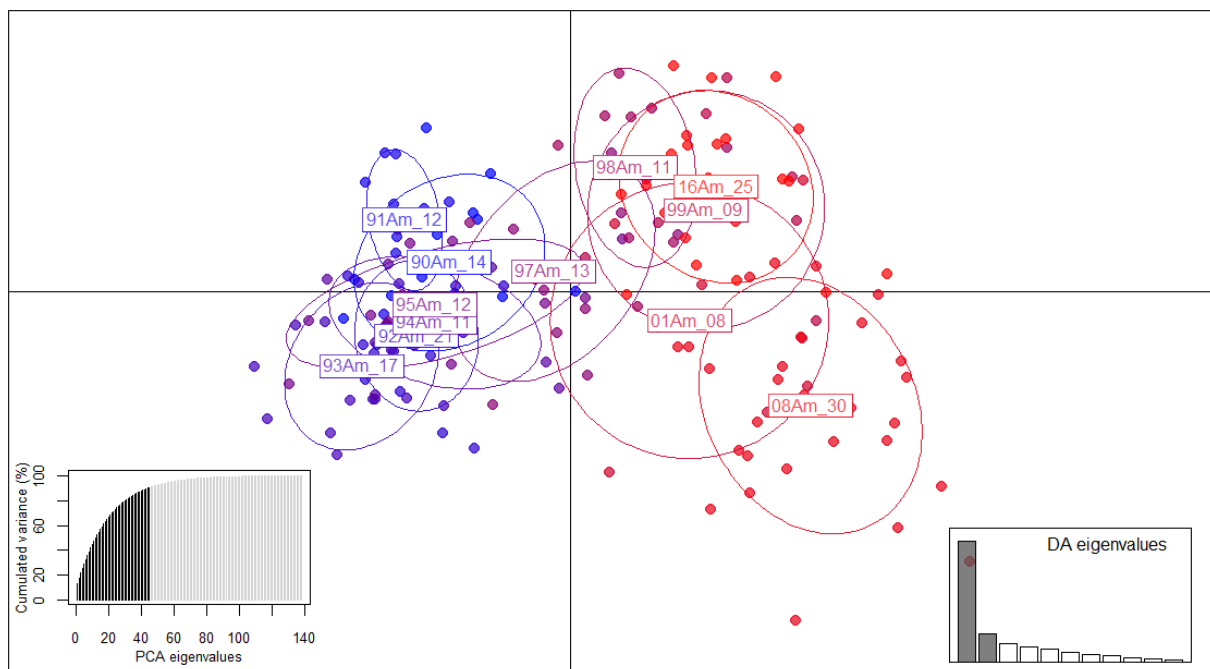


Figure III Scatterplots of the discriminant analysis of principal components (DAPC) for *M. larici-populina* genotypes collected in Amance assuming 12 clusters.

The axes represent the first two linear discriminants (LD). Dots represent isolates and ellipses the inertia of temporal samples. DAPC analysis was performed with the following parameters: 45 first principal components (PCs) (90% of variance conserved) of the principal component analysis (PCA) and ten discriminant eigenvalues (DA).

In the last step, individuals were grouped according to their genotype at the *AvrMlp7* candidate locus to examine the link between neutral genetic variation and the locus under selection. DAPC analysis was carried out using the detected optimal number of clusters (K=2) and 45 first principal components (PCs) of the principal component analysis (PCA), explaining 90% of variance conserved. In the Figure IVA, cluster 1 grouped genotypes without the avirulent allele whereas cluster 2 grouped genotypes with the avirulent allele. In the Figure IVB, a second analysis was performed assuming six clusters corresponding to each genotype at the *AvrMlp7* candidate locus. As for the previous analysis, the same number of first PCs of the PCA and two DA were retained. The linear discriminant 1 (LD1) discriminated between genotypes with or

without the avirulent allele. Notably, samples with the heterozygous genotypes Avr/avr and Avr/\emptyset were found at an intermediate position along the LD1. The linear discriminant 2 (LD2) allowed to discrimination of the Avr/avr and Avr/Avr genotypes from the one carrying the Avr allele and the null \emptyset allele.

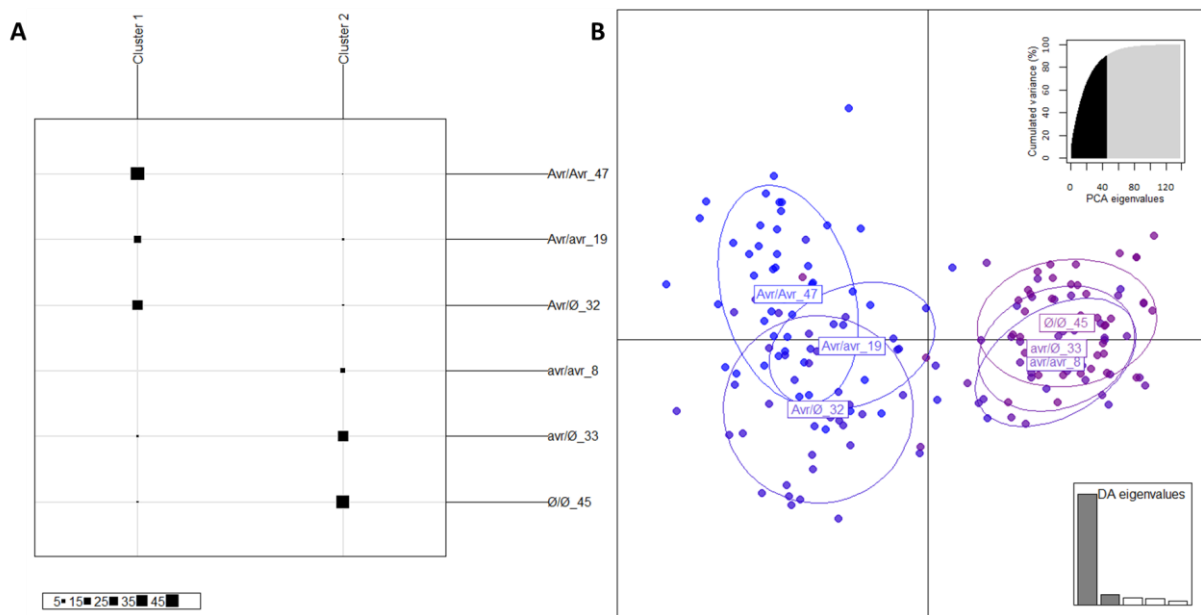


Figure IV Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) for *M. larici-populina* isolates collected at Amance, France, according to their genotypes at the *AvrMlp7* locus.

(A) Correspondence between DAPC clustering and genotype at the *AvrMlp7* locus. The size of each square represents the number of isolates assigned to each cluster. (B) Scatterplots of the DAPC assuming six clusters. The axes represent the first two Linear Discriminants (LD). Dots represent isolates and ellipses represent the inertia of genotypes. DAPC analysis was performed with the following parameters: 45 first Principal Components (PCs) (90% of variance conserved) of Principal Component Analysis (PCA) and two discriminant eigenvalues (DA).

Conclusion

Analysis of basic population genetics statistics revealed a shift in population structure during the RMIp7 resistance breakdown in 1994. This result was confirmed by DAPC analyses. Two genetic clusters represented the main relevant population subdivision. These clusters are temporally separated with a pivotal date in 1997. This partition corresponds to the separation between avirulent A7 populations present before the breakdown and virulent a7 populations appearing after the breakdown. According to Persoons et al. (2017), this shift in genetic structure represented the collapse of the ‘Fossil’ genetic group comprising only avirulent A7 individuals from 1994 to 1998 and the progressive emergence of the new genetic group called ‘Cultivated’ comprising mostly virulent a7 individuals. Notably, the DAPC analysis pointed out that the two genetic clusters (defined from neutral makers) matched the delineation between genotypes associated with the avirulent A7 and the a7 phenotypes.

REFERENCES

- Goudet J, Jombart T (2015) Hierfstat: estimation and tests of hierarchical F-statistics.
- Jombart T (2008) Adegnet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, **24**, 1403–1405.
- Jombart T, Ahmed I (2011) adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*, **27**, 3070–3071.

- Jombart T, Collins C (2015) A tutorial for Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) using adegenet 2.0.0.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**, 583–590.
- Persoons A, Hayden KJ, Fabre B *et al.* (2017) The escalatory Red Queen: population extinction and replacement following arms race dynamics in poplar rust. *Molecular Ecology*, **26**, 1902–1918.
- Rousset F (2008) GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, **8**, 103–106.

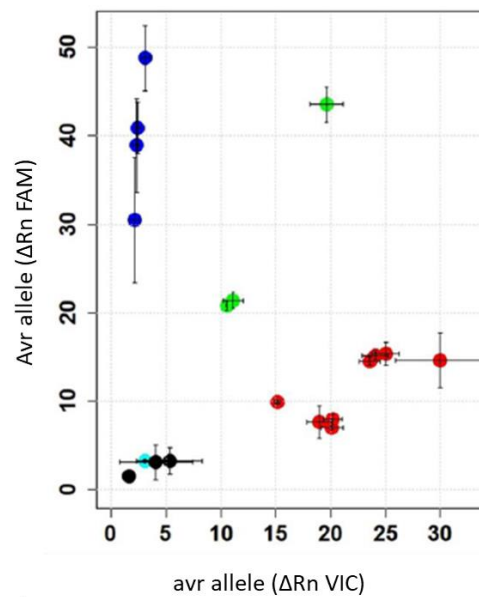


Fig. S1 Illustration of allelic discrimination of the SNP_2233369 at the *AvrMlp7* candidate gene for a subset of *Melampsora larici-populina* whole-genome sequenced individuals.

Colors indicate the allelic state for each individual generated by the mapping on the 98AG31 reference genome: blue for individuals with only the avirulent (*Avr*) allele(s), red for individuals with only the virulent (*avr*) allele(s), green for heterozygous individuals with both the avirulent and the virulent alleles, and black for individuals without any detected alleles. The negative control (H_2O) is indicated by the light blue dot. Dots represent the mean of triplicate for each individual. Bars represent the standard deviation from the mean. Fluorescence intensities were normalized by a basal fluorescence ROX (ΔRn).

Table S1 List and characteristics of *Melampsora larici-populina* individuals used in this study.

Individual	Year	Phenotype [†]	Genotype [‡]	Genetic group	Geographical origin			HW assignment [§]	Reference
					Location	Region	Country		
89AA2	1989	A7	Avr/Avr	NA	Amance	North-East	France	90Am	this study
89AA4	1989	A7	Avr/avr	Fossil	Amance	North-East	France	90Am	this study
89BB3	1989	A7	Avr/avr	Fossil	Amance	North-East	France	90Am	this study
89BB5	1989	A7	Avr/∅	Fossil	Amance	North-East	France	90Am	this study
89GA6	1989	A7	Avr/∅	Fossil	Amance	North-East	France	90Am	this study
89GG7	1989	A7	Avr/avr	Fossil	Amance	North-East	France	90Am	this study
89J3	1989	A7	Avr/∅	Fossil	Amance	North-East	France	90Am	this study
89JJ7	1989	A7	Avr/avr	Fossil	NA	NA	NA	NA	this study
89KA6	1989	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	90Am	this study
89LL1	1989	A7	Avr/∅	NA	Amance	North-East	France	90Am	this study
90H6	1990	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	90Am	this study
90L8	1990	A7	Avr/avr	Fossil	Amance	North-East	France	90Am	this study
90NA20	1990	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	90Am	this study
90PA6	1990	A7	Avr/avr	Fossil	Amance	North-East	France	90Am	this study
90T18	1990	A7	Avr/∅	Fossil	Amance	North-East	France	90Am	this study
91A1S1	1991	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	91Am	this study
91A2S5	1991	A7	Avr/avr	Fossil	Amance	North-East	France	91Am	this study
91A3S5	1991	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	91Am	this study
91AC1	1991	A7	Avr/Avr	Fossil	NA	NA	NA	NA	this study
91BA1	1991	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	91Am	this study
91BA2	1991	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	91Am	this study
91CA1	1991	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	91Am	this study
91DA1	1991	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	91Am	this study
91F1S1	1991	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	91Am	this study
91FA1	1991	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	91Am	this study
91H1S7	1991	A7	Avr/avr	Fossil	Amance	North-East	France	91Am	this study

91J2	1991	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	91Am	this study
91QA3	1991	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	91Am	this study
922MLMA13_X026	1992	A7	Avr/Avr	Fossil	Mallemort	South-East	France	NA	this study
9287-12	1992	A7	Avr/avr	Fossil	Orléans	Center	France	NA	Persoos et al., 2017
9287-37_X045	1992	A7	Avr/Avr	NA	Orléans	Center	France	NA	this study
92C6	1992	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	92Am	Persoos et al., 2017
92F5	1992	A7	Avr/avr	Fossil	Amance	North-East	France	92Am	Persoos et al., 2017
92G4	1992	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	92Am	Persoos et al., 2017
92H1	1992	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	92Am	Persoos et al., 2017
92HA4	1992	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	92Am	Persoos et al., 2017
92ID3_X027	1992	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	92Am	this study
92J5_X028	1992	A7	Avr/∅	Fossil	Amance	North-East	France	92Am	this study
92JA2	1992	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	92Am	Persoos et al., 2017
92JQ1	1992	A7	Avr/∅	Fossil	Amance	North-East	France	92Am	Persoos et al., 2017
92K4_X035	1992	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	92Am	this study
92K6	1992	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	92Am	Persoos et al., 2017
92O2	1992	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	92Am	Persoos et al., 2017
92P1	1992	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	92Am	Persoos et al., 2017
92P4	1992	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	92Am	Persoos et al., 2017
92P7_X046	1992	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	92Am	this study
92R7	1992	A7	Avr/∅	Fossil	Amance	North-East	France	92Am	Persoos et al., 2017
92S2	1992	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	92Am	Persoos et al., 2017
92S3	1992	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	92Am	Persoos et al., 2017
92T2	1992	A7	Avr/∅	Fossil	Amance	North-East	France	92Am	Persoos et al., 2017
92T8	1992	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	92Am	Persoos et al., 2017
92V2	1992	A7	Avr/avr	Fossil	Amance	North-East	France	92Am	Persoos et al., 2017
93CU1¶	1993	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	93Am	Persoos et al., 2017, 2021
93CV1_1-2-3¶	1993	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	93Am	Persoos et al., 2017, 2021
93CV1_4_X029	1993	A7	Avr/∅	Fossil	Amance	North-East	France	93Am	this study
93DL2¶	1993	A7	Avr/∅	Fossil	Amance	North-East	France	93Am	Persoos et al., 2017, 2021
93EC4	1993	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	93Am	Persoos et al., 2017, 2021

Louet et al. – Two genome alterations explain virulence

93EF8_3¶	1993	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	93Am	Persoons et al., 2017, 2021
93GR7_1_X030	1993	A7	Avr/∅	Fossil	Amance	North-East	France	93Am	this study
93GS3_1-2	1993	A7	Avr/∅	Fossil	Amance	North-East	France	93Am	Persoons et al., 2017, 2021
93GV8¶	1993	A7	Avr/∅	Fossil	Amance	North-East	France	93Am	Persoons et al., 2017, 2021
93GW3(2)¶	1993	A7	Avr/avr	Fossil	Amance	North-East	France	93Am	Persoons et al., 2017, 2021
93IB7¶	1993	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	93Am	Persoons et al., 2017, 2021
93IC8_3¶	1993	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	93Am	Persoons et al., 2017, 2021
93ID6¶	1993	A7	Avr/∅	Fossil	Amance	North-East	France	93Am	Persoons et al., 2014,2017
93IP6	1993	A7	Avr/∅	Fossil	Amance	North-East	France	93Am	Persoons et al., 2017
93JE03¶	1993	A7	Avr/∅	Fossil	Amance	North-East	France	93Am	Persoons et al., 2014,2017
93NU2_2¶	1993	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	93Am	Persoons et al., 2017, 2021
93NX6¶	1993	A7	Avr/∅	Fossil	Amance	North-East	France	93Am	Persoons et al., 2017, 2021
93OC5	1993	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	93Am	Persoons et al., 2017, 2021
93PQ1	1993	A7	Avr/Avr	Fossil	Le collet de Dèze	South-East	France	NA	Persoons et al., 2017
94AB6	1994	A7	Avr/∅	Fossil	Amance	North-East	France	94Am	this study
94BA12	1994	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	94Am	this study
94BA15	1994	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	94Am	this study
94EC2	1994	A7	Avr/avr	Wild	Amance	North-East	France	94Am	this study
94ED3	1994	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	94Am	this study
94L1	1994	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	94Am	Persoons et al., 2017
94NB4	1994	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	94Am	Persoons et al., 2017
94RA26_1	1994	A7	Avr/∅	Fossil	Amance	North-East	France	94Am	this study
94RA26_3	1994	A7	Avr/avr	Cultivated	Amance	North-East	France	94Am	this study
94UB1	1994	A7	∅/∅	Fossil	Amance	North-East	France	94Am	Persoons et al., 2017
94YC9	1994	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	94Am	Persoons et al., 2017
94ZZ01	1994	a7	avr/∅	Cultivated	Chereng	North	France	94ZZo	Persoons et al., 2017, 2021
94ZZ03¶	1994	a7	avr/avr	Cultivated	Grammont	Flanders	Belgium	94ZZb	Persoons et al., 2017, 2021
94ZZ04_1	1994	a7	avr/avr	Cultivated	Grammont	Flanders	Belgium	94ZZb	this study
94ZZ07	1994	a7	avr/∅	Cultivated	Ville-aux-bois-lès-Pontavert	North	France	94ZZo	Persoons et al., 2017, 2021
94ZZ09_1	1994	a7	avr/avr	Cultivated	Grammont	Flanders	Belgium	94ZZb	this study
94ZZ10¶	1994	a7	avr/avr	Cultivated	Onnaing	North	France	94ZZo	Persoons et al., 2017, 2021
94ZZ11¶	1994	a7	avr/∅	Cultivated	Lecelles	North	France	94ZZo	Persoons et al., 2017, 2021

94ZZ12	1994	a7	avr/avr	Cultivated	Bucy les Cerny	North	France	94ZZo	Persoos et al., 2017, 2021
94ZZ13¶	1994	a7	avr/∅	Cultivated	Hesdin	North	France	94ZZo	Persoos et al., 2017, 2021
94ZZ14¶	1994	a7	avr/avr	Cultivated	Guesnain	North	France	94ZZo	Persoos et al., 2017, 2021
94ZZ15¶	1994	a7	avr/avr	Cultivated	Saulchoy	North	France	94ZZo	Persoos et al., 2017, 2021
94ZZ16¶	1994	a7	∅/∅	Cultivated	Saulchoy	North	France	94ZZo	Persoos et al., 2017, 2021
94ZZ18¶	1994	a7	∅/∅	Cultivated	Etain	North-East	France	94ZZo	Persoos et al., 2017, 2021
94ZZ19	1994	a7	avr/∅	Cultivated	Frencilly Selency	North	France	94ZZo	Persoos et al., 2017, 2021
94ZZ20_2¶	1994	a7	avr/avr	Cultivated	Nogent-sur-Vernisson	Center	France	94ZZo	Persoos et al., 2017, 2021
94zz21¶	1994	a7	avr/avr	Cultivated	Chereng	North	France	94ZZo	Persoos et al., 2017, 2021
94ZZ32_1	1994	a7	avr/avr	Cultivated	Grammont	Flanders	Belgium	94ZZb	this study
94ZZ33¶	1994	a7	avr/avr	Cultivated	Grammont	Flanders	Belgium	94ZZb	Persoos et al., 2017, 2021
94ZZ35_2¶	1994	a7	avr/avr	Cultivated	Grammont	Flanders	Belgium	94ZZb	Persoos et al., 2017, 2021
94ZZ36_3¶	1994	a7	avr/avr	Cultivated	Grammont	Flanders	Belgium	94ZZb	Persoos et al., 2017, 2021
94ZZ37_4¶	1994	a7	avr/avr	Cultivated	Grammont	Flanders	Belgium	94ZZb	Persoos et al., 2017, 2021
94ZZ50	1994	a7	avr/avr	Cultivated	Grammont	Flanders	Belgium	94ZZb	this study
94ZZ52	1994	a7	avr/avr	Cultivated	Grammont	Flanders	Belgium	94ZZb	this study
94ZZ53	1994	a7	avr/avr	Cultivated	Grammont	Flanders	Belgium	94ZZb	this study
94ZZ55	1994	a7	avr/avr	Cultivated	Grammont	Flanders	Belgium	94ZZb	this study
94ZZ57	1994	a7	avr/avr	Cultivated	Grammont	Flanders	Belgium	94ZZb	this study
94ZZ58	1994	a7	avr/avr	Cultivated	Grammont	Flanders	Belgium	94ZZb	this study
94ZZ60	1994	a7	avr/avr	Cultivated	Grammont	Flanders	Belgium	94ZZb	this study
95AV2	1995	A7	Avr/∅	Fossil	Amance	North-East	France	95Am	Persoos et al., 2017
95AX8	1995	A7	Avr/avr	Fossil	Amance	North-East	France	95Am	Persoos et al., 2017
95AZ8_X038	1995	A7	Avr/∅	Fossil	Amance	North-East	France	95Am	this study
95BA151	1995	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	95Am	Persoos et al., 2017
95BA152_A140	1995	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	95Am	this study
95BN10	1995	A7	Avr/∅	Fossil	Amance	North-East	France	95Am	Persoos et al., 2017
95NL3972	1995	A7	Avr/∅	Fossil	Amance	North-East	France	95Am	Persoos et al., 2017
95NL4042	1995	A7	Avr/∅	Fossil	Amance	North-East	France	95Am	Persoos et al., 2017
95XA1	1995	a7	avr/∅	Cultivated	Menneville	North	France	NA	Persoos et al., 2017
95XB1	1995	a7	avr/avr	Cultivated	Condé-sur-Suipe	North	France	NA	this study

Louet et al. – Two genome alterations explain virulence

95XC5	1995	a7	avr/∅	Cultivated	Condé-sur-Suipe	North	France	NA	this study
95XD10¶	1995	a7	avr/∅	Cultivated	Rogécourt	North	France	NA	Persoos et al., 2014,2017
95XD2	1995	a7	avr/∅	Cultivated	Rogécourt	North	France	NA	this study
95XD6	1995	a7	avr/∅	Cultivated	Rogécourt	North	France	NA	this study
95XE4	1995	a7	avr/avr	Cultivated	Jonchery	North-East	France	NA	Persoos et al., 2017
95XF1	1995	a7	avr/∅	Cultivated	Jonchery	North-East	France	NA	Persoos et al., 2017
95XF2	1995	a7	avr/∅	Cultivated	Jonchery	North-East	France	NA	Persoos et al., 2017
95XF9	1995	a7	avr/avr	Cultivated	Jonchery	North-East	France	NA	Persoos et al., 2017
95XG2_X053	1995	a7	avr/∅	Cultivated	Savigny	North-East	France	NA	this study
95XH3	1995	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	95Am	Persoos et al., 2017
95XI10	1995	a7	avr/∅	Cultivated	Nogent-sur-Vernisson	Center	France	NA	Persoos et al., 2017
95XK2	1995	a7	avr/avr	Cultivated	Nogent-sur-Vernisson	Center	France	NA	this study
95XK3	1995	a7	avr/∅	Cultivated	Nogent-sur-Vernisson	Center	France	NA	this study
95XM3	1995	a7	∅/∅	Cultivated	Nogent-sur-Vernisson	Center	France	NA	this study
95XN3	1995	a7	∅/∅	Cultivated	Rosières-aux-Salines	North-East	France	NA	this study
95XN6	1995	a7	avr/∅	Cultivated	Rosières-aux-Salines	North-East	France	NA	this study
95XO1	1995	a7	∅/∅	Cultivated	Menneville	North	France	NA	this study
95XP3	1995	a7	avr/∅	Cultivated	Cadillac	South-West	France	NA	Persoos et al., 2017
95XT2	1995	a7	∅/∅	Cultivated	Guémené	North-West	France	NA	Persoos et al., 2017
95XX1	1995	a7	avr/avr	Cultivated	Mattexey	North-East	France	NA	this study
9627B023	1996	a7	avr/avr	Cultivated	Orléans	Center	France	NA	Persoos et al., 2017
96AK1	1996	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	95Am	Persoos et al., 2017
96BRIR1n°3	1996	A7	Avr/Avr	Wild	La Brillanne	South-East	France	NA	Persoos et al., 2017
96CY6_X039	1996	A7	Avr/∅	NA	Amance	North-East	France	95Am	this study
96GA1_X001	1996	A7	∅/∅	Fossil	Amance	North-East	France	95Am	this study
97CD1	1997	a7	∅/∅	Cultivated	Hangard	North	France	97Am	Persoos et al., 2017
97CF1¶	1997	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	97Am	Persoos et al., 2014,2017
97CG1	1997	a7	avr/avr	Cultivated	Nogent-sur-Vernisson	North-East	France	97Am	Persoos et al., 2017
97CI1	1997	a7	avr/avr	Cultivated	Amance	North-East	France	97Am	Persoos et al., 2017
97CO1	1997	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	97Am	Persoos et al., 2017
97CO10	1997	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	97Am	Persoos et al., 2017
97CO2	1997	A7	Avr/avr	Fossil	Amance	North-East	France	97Am	Persoos et al., 2017

97CO3	1997	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	97Am	Persoos et al., 2017
97CO5	1997	A7	Avr/avr	Wild	Amance	North-East	France	97Am	Persoos et al., 2017
97CO6	1997	A7	Avr/∅	Fossil	Amance	North-East	France	97Am	Persoos et al., 2017
97CO7	1997	A7	Avr/Avr	Fossil	Amance	North-East	France	97Am	Persoos et al., 2017
97CO8	1997	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	97Am	Persoos et al., 2017
97Z1	1997	A7	Avr/∅	Fossil	Amance	North-East	France	97Am	Persoos et al., 2017
98GF7_1_X042	1998	a7	avr/∅	Fossil	Amance	North-East	France	98Am	Persoos et al., 2017
98AA06¶	1998	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	98Am	Persoos et al., 2017, 2021
98AA08	1998	A7	Avr/∅	Wild	Amance	North-East	France	98Am	Persoos et al., 2017
98AB02¶	1998	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	98Am	Persoos et al., 2017, 2021
98AC08¶	1998	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	98Am	Persoos et al., 2017, 2021
98AD04	1998	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	98Am	Persoos et al., 2017, 2021
98AG03¶	1998	a7	avr/avr	Cultivated	Moÿ-de-l'Aisne	North	France	98Mo	Persoos et al., 2017, 2021
98AG18	1998	a7	avr/avr	Cultivated	Moÿ-de-l'Aisne	North	France	98Mo	Persoos et al., 2017, 2021
98AG31¶	1998	a7	avr/avr	Cultivated	Moÿ-de-l'Aisne	North	France	98Mo	Persoos et al., 2017, Duplessis et al. 2011
98AG40	1998	a7	avr/avr	Cultivated	Moÿ-de-l'Aisne	North	France	98Mo	Persoos et al., 2017
98AG42_2¶	1998	a7	avr/∅	Cultivated	Moÿ-de-l'Aisne	North	France	98Mo	Persoos et al., 2017, 2021
98AG49_1¶	1998	a7	avr/∅	Cultivated	Moÿ-de-l'Aisne	North	France	98Mo	Persoos et al., 2017, 2021
98AG54¶	1998	a7	avr/avr	Cultivated	Moÿ-de-l'Aisne	North	France	98Mo	Persoos et al., 2017, 2021
98AG56¶	1998	a7	avr/avr	Cultivated	Moÿ-de-l'Aisne	North	France	98Mo	Persoos et al., 2017, 2021
98AG69¶	1998	a7	∅/∅	Cultivated	Moÿ-de-l'Aisne	North	France	98Mo	Persoos et al., 2017, 2021
98AI01¶	1998	a7	avr/∅	Cultivated	Moÿ-de-l'Aisne	North	France	98Mo	Persoos et al., 2017, 2021
98AI03	1998	a7	avr/∅	Cultivated	Moÿ-de-l'Aisne	North	France	98Mo	Persoos et al., 2017
98AI58	1998	a7	avr/∅	Cultivated	Moÿ-de-l'Aisne	North	France	98Mo	Persoos et al., 2017, 2021
98AP02¶	1998	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	98Am	Persoos et al., 2017, 2021
98AP03	1998	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	98Am	Persoos et al., 2017, 2021
98AR01	1998	a7	avr/avr	Cultivated	Grammont	Flanders	Belgium	NA	Persoos et al., 2017
98GB03_1-2¶	1998	a7	avr/avr	Cultivated	Amance	North-East	France	98Am	Persoos et al., 2017, 2021
98GC04	1998	a7	Avr/avr	NA	Amance	North-East	France	98Am	Persoos et al., 2017, 2021
98GD5_A0185	1998	A7	Avr/avr	Cultivated	Amance	North-East	France	98Am	this study

Louet et al. – Two genome alterations explain virulence

99AG01_X051	1999	a7	avr/avr	Cultivated	Carlepont	North	France	NA	this study
99B109	1999	A7	Avr/avr	Cultivated	Amance	North-East	France	99Am	Persoons et al., 2017
99B120	1999	a7	avr/avr	Cultivated	Amance	North-East	France	99Am	Persoons et al., 2017
99B126	1999	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	99Am	Persoons et al., 2017
99B15	1999	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	99Am	Persoons et al., 2017
99B69	1999	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	99Am	Persoons et al., 2017
99C2	1999	a7	avr/avr	Cultivated	Amance	North-East	France	99Am	Persoons et al., 2017
99C3	1999	A7	Avr/avr	NA	Amance	North-East	France	99Am	Persoons et al., 2017
99D10_X010	1999	a7	avr/∅	Cultivated	Charrey	North-East	France	NA	this study
99D30	1999	a7	avr/avr	Cultivated	Amance	North-East	France	99Am	Persoons et al., 2017
99FB01	1999	A7	Avr/∅	NA	Amance	North-East	France	99Am	Persoons et al., 2017
01H114	2001	a7	avr/∅	Cultivated	Charrey	North-East	France	NA	Persoons et al., 2017
01L10	2001	a7	avr/avr	Cultivated	Gières	South-East	France	NA	Persoons et al., 2017
01L21_X014	2001	a7	avr/∅	Cultivated	Nogent-sur-Vernisson	Center	France	NA	this study
01L30_X015	2001	a7	avr/∅	Cultivated	Nogent-sur-Vernisson	Center	France	NA	this study
01L31_X048	2001	a7	∅/∅	Wild	Nogent-sur-Vernisson	Center	France	NA	this study
01L56_A137	2001	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	01Am	this study
01L58_X024	2001	A7	Avr/∅	Wild	Amance	North-East	France	01Am	this study
01L59	2001	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	01Am	Persoons et al., 2017
01L61	2001	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	01Am	Persoons et al., 2017
01L62	2001	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	01Am	Persoons et al., 2017
01L63_A138	2001	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	01Am	this study
01L64	2001	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	01Am	Persoons et al., 2017
01L66	2001	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	01Am	Persoons et al., 2017
08AB006_A139	2008	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	this study
08AB009_1	2008	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	this study
08AB015	2008	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	Persoons et al., 2017
08AB017	2008	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	Persoons et al., 2017
08AB020	2008	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	Persoons et al., 2017
08AB021_1	2008	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	this study
08AB023	2008	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	Persoons et al., 2017
08AB025	2008	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	Persoons et al., 2017

08AB029	2008	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	Persoons et al., 2017
08AB038	2008	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	Persoons et al., 2017
08AB041	2008	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	Persoons et al., 2017
08AB044	2008	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	Persoons et al., 2017
08AB048	2008	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	Persoons et al., 2017
08AB051_1	2008	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	this study
08AB058	2008	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	Persoons et al., 2017
08AB060	2008	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	Persoons et al., 2017
08AB065	2008	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	Persoons et al., 2017
08AB074	2008	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	Persoons et al., 2017
08AB076	2008	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	Persoons et al., 2017
08AB077_1	2008	a7	avr/avr	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	this study
08AB080	2008	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	Persoons et al., 2017
08AB083_1	2008	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	this study
08AB084_1	2008	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	this study
08AB087	2008	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	Persoons et al., 2017
08AB088	2008	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	Persoons et al., 2017
08AB090	2008	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	Persoons et al., 2017
08AB091	2008	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	Persoons et al., 2017
08AB095	2008	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	Persoons et al., 2017
08AB101	2008	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	Persoons et al., 2017
08AB200	2008	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	08Am	this study
08EA01_1¶	2008	A7	Avr/∅	Wild	Prelles	South-East	France	08Pr	Persoons et al., 2017, 2021
08EA06_1¶	2008	A7	Avr/Avr	Wild	Prelles	South-East	France	08Pr	Persoons et al., 2017, 2021
08EA09_1¶	2008	A7	Avr/avr	Wild	Prelles	South-East	France	08Pr	Persoons et al., 2017, 2021
08EA105_1¶	2008	A7	Avr/Avr	NA	Prelles	South-East	France	08Pr	Persoons et al., 2017, 2021
08EA106_3¶	2008	A7	Avr/Avr	Wild	Prelles	South-East	France	08Pr	Persoons et al., 2017, 2021
08EA11_1¶	2008	A7	Avr/avr	Wild	Prelles	South-East	France	08Pr	Persoons et al., 2017, 2021
08EA15_1¶	2008	A7	Avr/∅	Wild	Prelles	South-East	France	08Pr	Persoons et al., 2017, 2021
08EA16_1¶	2008	A7	Avr/Avr	Wild	Prelles	South-East	France	08Pr	Persoons et al., 2017, 2021
08EA18_1-2¶	2008	A7	Avr/avr	Wild	Prelles	South-East	France	08Pr	Persoons et al., 2017, 2021

Louet et al. – Two genome alterations explain virulence

08EA19_1-2¶	2008	A7	Avr/Avr	Wild	Prelles	South-East	France	08Pr	Persoons et al., 2017, 2021
08EA22_1¶	2008	A7	Avr/Avr	Wild	Prelles	South-East	France	08Pr	Persoons et al., 2017, 2021
08EA42_1-2-3¶	2008	A7	Avr/Avr	Wild	Prelles	South-East	France	08Pr	Persoons et al., 2017, 2021
08EA43_1-2¶	2008	A7	Avr/Avr	Wild	Prelles	South-East	France	08Pr	Persoons et al., 2017, 2021
08EA47¶	2008	A7	Avr/Avr	Wild	Prelles	South-East	France	08Pr	Persoons et al., 2014,2017
08EA50_1-2-3-4¶	2008	A7	Avr/Avr	NA	Prelles	South-East	France	08Pr	Persoons et al., 2017, 2021
08EA55_2¶	2008	A7	Avr/avr	Wild	Prelles	South-East	France	08Pr	Persoons et al., 2017, 2021
08EA61_1-2¶	2008	A7	Avr/avr	Wild	Prelles	South-East	France	08Pr	Persoons et al., 2017, 2021
08EA66_1	2008	A7	Avr/avr	Wild	Prelles	South-East	France	08Pr	Persoons et al., 2017, 2021
08EA77¶	2008	A7	Avr/avr	Wild	Prelles	South-East	France	08Pr	Persoons et al., 2014,2017
08EA85_1¶	2008	A7	Avr/Avr	Wild	Prelles	South-East	France	08Pr	Persoons et al., 2017, 2021
16BF001	2016	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	16Am	this study
16BF002	2016	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	16Am	this study
16BF003	2016	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	16Am	this study
16BF004	2016	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	16Am	this study
16BF005	2016	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	16Am	this study
16BF006	2016	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	16Am	this study
16BF007	2016	a7	avr/avr	Cultivated	Amance	North-East	France	16Am	this study
16BF011	2016	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	16Am	this study
16BF012	2016	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	16Am	this study
16BF013	2016	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	16Am	this study
16BF015	2016	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	16Am	this study
16BF016	2016	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	16Am	this study
16BF017	2016	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	16Am	this study
16BF018	2016	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	16Am	this study
16BF021	2016	A7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	16Am	this study
16BF022	2016	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	16Am	this study
16BF023	2016	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	16Am	this study
16BF024	2016	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	16Am	this study
16BF026	2016	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	16Am	this study
16BF027	2016	a7	avr/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	16Am	this study
16BF028	2016	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	16Am	this study

16BF030	2016	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	16Am	this study
16BF031	2016	A7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	16Am	this study
16BF034	2016	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	16Am	this study
16BF035	2016	a7	∅/∅	Cultivated	Amance	North-East	France	16Am	this study

†A7, avirulent 7 phenotype towards *RMlp7*; a7, virulent 7 phenotype towards *RMlp7*.

‡Genotype at the *AvrMlp7* candidate locus: Avr: avirulent allele; avr: virulent allele; ∅: null allele.

§Some groups have been created with individuals collected in two following years to balance sample size to test the Hardy-Weinberg equilibrium.

¶¶Whole-genome sequenced individuals available on the Joint Genome Institute website (https://mycocosm.jgi.doe.gov/Mellp2_3/Mellp2_3.home.html).

Table S2 Polymorphism identification at the *AvrMlp7* locus in the 66 whole-genome sequenced individuals of *Melampsora. larici-populina*.

Individual	Genetic group	Phenotype†	Depth at SNP_2233369	Average AvrMlp7 gene depth	Average depth at 2.2 to 2.3 Mbp	Relative depth gene to region 2.2 to 2.3 Mbp	K-means relative depth	TaqMan copy number variation	K-means TaqMan copy number variation	Sequencing at SNP_2233369‡	TaqMan allelic discrimination§	Genotype¶
08EA01_1	Wild	A7	34	37.55	70.92	0.53	B	0.28	2	T	T	Avr/∅
08EA06_1	Wild	A7	132	132.03	140.46	0.94	A	0.61	1	T	T	Avr/Avr
08EA09_1	Wild	A7	61	71.11	89.82	0.79	A	0.64	1	TC	TC	Avr/avr
08EA105_1	Wild	A7	19	19.05	24.66	0.77	A	0.64	1	NA	T	Avr/Avr
08EA106_3	Wild	A7	55	65.12	83.29	0.78	A	0.71	1	T	T	Avr/Avr
08EA11_1	Wild	A7	74	67.70	78.53	0.86	A	0.77	1	TC	TC	Avr/avr
08EA15_1	Wild	A7	39	38.65	71.45	0.54	B	0.33	2	T	T	Avr/∅
08EA16_1	Wild	A7	60	49.73	53.97	0.92	A	0.66	1	T	T	Avr/Avr
08EA18_1-2	Wild	A7	101	81.70	94.11	0.87	A	0.68	1	TC	TC	Avr/avr
08EA19_1-2	Wild	A7	115	123.34	155.42	0.79	A	0.68	1	T	T	Avr/Avr
08EA22_1	Wild	A7	67	63.77	85.75	0.74	A	0.68	1	T	T	Avr/Avr
08EA42_1-2-3	Wild	A7	72	77.78	83.58	0.93	A	0.68	1	T	T	Avr/Avr
08EA43_1-2	Wild	A7	93	92.18	104.36	0.88	A	0.67	1	T	T	Avr/Avr
08EA50_1-2-3-4	Wild	A7	78	75.41	89.06	0.85	A	0.60	1	T	T	Avr/Avr
08EA55_2	Wild	A7	71	73.60	88.84	0.83	A	0.60	1	TC	TC	Avr/avr
08EA61_1-2	Wild	A7	66	63.52	80.73	0.79	A	0.67	1	TC	TC	Avr/avr
08EA66_1	Wild	A7	43	43.65	50.42	0.87	A	0.65	1	TC	TC	Avr/avr
08EA85_1	Wild	A7	44	42.59	49.25	0.86	A	0.69	1	T	T	Avr/Avr
93CU01	Fossil	A7	150	153.37	174.08	0.88	A	0.59	1	T	T	Avr/Avr
93CV1_1-2-3	Fossil	A7	66	66.29	74.00	0.90	A	0.79	1	T	T	Avr/Avr
93DL2	Fossil	A7	31	24.65	39.02	0.63	B	0.32	2	T	T	Avr/∅
93EC4	Fossil	A7	38	44.94	57.02	0.79	A	0.66	1	T	T	Avr/Avr
93EF8_3	Fossil	A7	75	72.83	90.38	0.81	A	0.77	1	T	T	Avr/Avr
93GS3	Fossil	A7	31	32.68	67.43	0.48	B	0.35	2	T	T	Avr/∅
93GV08	Fossil	A7	41	40.60	64.39	0.63	B	0.31	2	T	T	Avr/∅
93GW3(2)	Fossil	A7	28	37.70	48.37	0.78	A	0.63	1	TC	TC	Avr/avr

93IB07	Fossil	A7	83	64.24	73.77	0.87	A	0.63	1	T	T	Avr/Avr
93IC8_3	Fossil	A7	75	76.38	83.42	0.92	A	0.69	1	T	T	Avr/Avr
93NU02_2	Fossil	A7	64	73.39	87.30	0.84	A	0.95	1	T	T	Avr/Avr
93NX6	Fossil	A7	44	38.87	68.70	0.57	B	0.37	2	T	T	Avr/∅
93OC5	Fossil	A7	34	45.17	51.83	0.87	A	0.64	1	T	T	Avr/Avr
94ZZ01	Cultivated	a7	22	28.95	57.79	0.50	B	0.30	2	C	C	avr/∅
94ZZ03	Cultivated	a7	62	68.16	85.33	0.80	A	0.60	1	C	C	avr/avr
94ZZ07	Cultivated	a7	11	11.90	30.97	0.38	B	0.29	2	NA	C	avr/∅
94ZZ10	Cultivated	a7	61	70.75	80.06	0.88	A	0.66	1	C	C	avr/avr
94ZZ11	Cultivated	a7	38	33.85	66.78	0.51	B	0.32	2	C	C	avr/∅
94ZZ12	Cultivated	a7	38	38.53	41.35	0.93	A	0.65	1	C	C	avr/avr
94ZZ13	Cultivated	a7	48	54.86	106.01	0.52	B	0.32	2	C	C	avr/∅
94ZZ14	Cultivated	a7	92	82.37	88.24	0.93	A	0.62	1	C	C	avr/avr
94ZZ15	Cultivated	a7	60	60.92	78.92	0.77	A	0.58	1	C	C	avr/avr
94ZZ16	Cultivated	a7	1	0.65	56.18	0.01	C	0.00	3	NA	∅	∅/∅
94ZZ18	Cultivated	a7	0	0.61	75.83	0.01	C	0.00	3	NA	∅	∅/∅
94ZZ19	Cultivated	a7	15	16.10	36.95	0.44	B	0.32	2	NA	C	avr/∅
94ZZ20_2	Cultivated	a7	91	81.52	96.79	0.84	A	0.67	1	C	C	avr/avr
94zz21	Cultivated	a7	16	14.93	19.05	0.78	A	0.66	1	NA	C	avr/avr
94ZZ33	Cultivated	a7	70	71.95	85.17	0.84	A	0.63	1	C	C	avr/avr
94ZZ35_2	Cultivated	a7	70	75.48	82.28	0.92	A	0.78	1	C	C	avr/avr
94ZZ36_3	Cultivated	a7	70	74.90	92.96	0.81	A	0.60	1	C	C	avr/avr
94ZZ37_4	Cultivated	a7	60	60.38	78.61	0.77	A	0.68	1	C	C	avr/avr
98AA06	Cultivated	a7	44	36.38	71.53	0.51	B	0.34	2	C	C	avr/∅
98AB02	Cultivated	a7	0	0.00	16.70	0.00	C	0.00	3	NA	∅	∅/∅
98AC08	Cultivated	a7	20	22.46	45.88	0.49	B	0.30	2	C	C	avr/∅
98AD04	Cultivated	a7	29	23.80	48.67	0.49	B	0.30	2	C	C	avr/∅
98AG03	Cultivated	a7	66	65.76	91.31	0.72	A	0.64	1	C	C	avr/avr
98AG18	Cultivated	a7	58	56.19	71.13	0.79	A	0.62	1	C	C	avr/avr
98AG42_2	Cultivated	a7	39	42.79	78.00	0.55	B	0.34	2	C	C	avr/∅
98AG49_1	Cultivated	a7	27	29.76	59.30	0.50	B	0.27	2	C	C	avr/∅

98AG54	Cultivated	a7	65	71.78	84.92	0.85	A	0.71	1	C	C	avr/avr
98AG56	Cultivated	a7	63	67.20	84.87	0.79	A	0.60	1	C	C	avr/avr
98AG69	Cultivated	a7	0	0.00	12.71	0.00	C	0.00	3	NA	∅	∅/∅
98AI01	Cultivated	a7	31	33.27	65.87	0.51	B	0.32	2	C	C	avr/∅
98AI58	Cultivated	a7	51	46.63	80.18	0.58	B	0.33	2	C	C	avr/∅
98AP02	Cultivated	a7	43	42.72	85.77	0.50	B	0.32	2	C	C	avr/∅
98AP03	Cultivated	a7	19	17.13	38.28	0.45	B	0.41	2	NA	C	avr/∅
98GB03_1-2	Cultivated	a7	46	46.80	55.05	0.85	A	0.59	1	C	C	avr/avr
98GC04	Cultivated	a7	20	18.60	23.44	0.79	A	0.62	1	TC	TC	Avr/avr

†A7, avirulent 7 phenotype towards *RMlp7*; a7, virulent 7 phenotype towards *RMlp7*.

‡Genotype at the SNP_2233369 according to sequencing data: T, avirulent allele; C, non-synonymous mutation of Avr allele; NA, not assigned data due to low sequencing depth (≤ 20 X).

§Genotype at the SNP_2233369 according to TaqMan allelic discrimination assay: T, avirulent allele; C, non-synonymous mutation of Avr allele; ∅, null allele.

¶Genotype at the *AvrMlp7* candidate locus: Avr: avirulent allele; avr: virulent allele; ∅: null allele.

Table S3 Analysis of Hardy-Weinberg equilibrium for the non-neutral SNP_2233369 locus of *Melampsora larici-populina* temporal samples from Amance, France.

Temporal sample	Year	N	HW‡	F _{IS}
90Am†	1989–90	14	0.4792	–0.3333
91Am	1990	12	1	–0.0476
92Am	1992	21	1	–0.1009
93Am	1993	18	0.4585	–0.3127
94Am	1994	11	0.3411	0.2
94ZZb/o	1994	31	0.1109	0.3541
95Am†	1995–96	12	1	–0.121
97Am	1997	13	0.1307	0.4495
98Am/Mo	1998	23	0.8489	–0.1261
99Am	1999	9	0.3461	0.3263
01Am	2001	8	1	–0.2963
08Pr	2008	20	0.6411	–0.139
08Am	2008	30	1	–0.2042
16Am	2016	25	1	0.0718

†Samples named 90Am and 95Am gathers individuals collected in 1989–1990 and 1995–1996 to balance sample size, respectively.

‡A P-value of < 0.001 was considered significant.

3. Résultats complémentaires

3.1. La délétion spécifique d'éléments transposables dans le chromosome 15 est associée à la délétion au locus candidat *AvrMlp7*

3.1.1. Contexte

Nous avons pu identifier une délétion complète du locus candidat *AvrMlp7* codé par *M. larici-populina* qui affecte une ou deux copies du gène. Cette délétion (allèle \emptyset) est donc présente à l'état homozygote ou hétérozygote. Cette altération est également corrélée avec le phénotype de virulence vis-à-vis de la résistance *RMlp7* (cf. [Article 2](#)). De nombreuses études sur les agents pathogènes, et plus particulièrement les Pucciniales, mettent en évidence l'influence des éléments transposables (*Transposable Elements* ; TE) dans l'altération des effecteurs. En effet, les TE peuvent être associés aux délétions partielles ou complètes d'un effecteur, ou encore des insertions plus ou moins importantes au sein des séquences codantes ou promotrices ([Rouxel and Balesdent 2017](#); [Fouché et al. 2018](#); [Sánchez-Vallet et al. 2018](#); [Frantzeskakis et al. 2020](#)). Récemment, des chercheurs ont mis en évidence la concordance entre le gain de virulence chez *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* et de larges insertions de TE ([Salcedo et al. 2017](#); [Chen et al. 2017](#)). Sachant que le génome de *M. larici-populina* est constitué de près de 45% de TE ([Duplessis et al. 2011a](#)), nous avons voulu évaluer la corrélation entre l'activité de transposition des TE et la délétion au locus candidat *AvrMlp7*. Pour ce faire, nous avons eu la chance d'avoir à notre disposition une annotation préliminaire des TE dans les séquences génomiques de 60 individus par rapport au génome de référence ([Tableau 1](#) ; données non publiées issues des analyses du Dr. Cécile Lorrain). Les génomes de ces individus sont tous disponibles sur le site Mycocosm du JGI (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/>).

Les résultats présentés ci-dessous ont été obtenus dans le cadre de cette thèse et sont issus d'une analyse discriminante structurant les individus, et plus particulièrement les génotypes au locus candidat *AvrMlp7*, sur la base de la présence ou de l'absence des TE sur les 18 chromosomes du génome de *M. larici-populina*. Pour ce faire, nous avons mis en place une analyse de génétique des populations à partir de laquelle nous avons analysé la corrélation entre la présence ou l'absence de TE et le génotype au locus. Pour ne pas alourdir l'analyse, seuls les résultats en rapport avec la délétion des TE sur le chromosome 15 seront présentés.

Tableau 1. Isolats utilisés dans cette étude.

Génotype*	Isolats
avr/avr (16)	94ZZ10; 94ZZ14; 94ZZ15; 94ZZ20; 94ZZ21; 94ZZ28; 94ZZ03; 94ZZ33; 94ZZ34; 94ZZ35_2; 94ZZ36_3; 94ZZ37_4; 98AG03; 98AG54; 98AG56; 98GB03_1-2
avr/∅ (9)	94ZZ11; 94ZZ13; 98AA06; 98AC08; 98AG42_2; 98AG49_1; 98AI01; 98AP02; 98GF07
∅/∅ (5)	94ZZ16; 94ZZ17; 94ZZ18; 98AB02; 98AG69
Avr/Avr (17)	08EA105_1; 08EA106_3; 08EA16_1; 08EA19_1-2; 08EA22_1; 08EA42_1-2-3; 08EA43_1-2; 08EA47; 08EA50_1-2-3-4; 08EA06_1; 08EA85_1; 08KE26; 93CU1; 93CV1_1-2-3; 93EF8_3; 93IB7; 93NU4
Avr/avr (6)	08EA09_1; 08EA11_1; 08EA55_2; 08EA77; 93GW3(2); 98GD5_A0185
Avr/∅ (7)	08EA01_1; 08EA15_1; 93DL2; 93GV8; 93JE03; 93NU2_2; 93NX6

* Génotype au locus candidat *AvrMlp7* : Avr, allèle d'avirulence ; avr, mutation non-synonyme de l'allèle Avr ; ∅, délétion de l'allèle Avr.

3.1.2. Matériels et Méthodes

Pour étudier la corrélation entre la délétion du locus candidat *AvrMlp7* portée ou non par les individus étudiés et les TE délétés sur le chromosome 15, nous avons attribué aux 60 individus le génotype au locus qui leur est associé ([Tableau 1](#) ; résultats issus de l'[article 2](#)).

Pour analyser la structure de cette population d'individus selon le contenu en TE sur le chromosome 15, nous avons réalisé une analyse discriminante des composantes principales (DAPC) *via* le package R ADEGENET ([Jombart 2008](#); [Jombart and Ahmed 2011](#); [Jombart and Collins 2015](#)) à partir des données de présence / absence de tous les TE répertoriés sur ce chromosome. Nous avons arbitrairement regroupé les individus selon six groupes en accord avec leur génotype au locus candidat pour avoir une meilleure compréhension du lien entre génotype au locus et délétion spécifique des TE. L'analyse DAPC a été réalisée en utilisant les 50 premières composantes principales (PC) de l'analyse en composantes principales (ACP), expliquant 90% de la variance conservée et les deux premiers Discriminants Linéaires (LD).

3.1.3. Résultats

Pour discriminer les six groupes de génotype au locus candidat *AvrMlp7* selon la présence ou non des TE sur le chromosome 15, nous avons premièrement réalisé un diagramme de dispersion des 60 individus basée sur l'analyse DAPC ([Figure 18A](#)). L'axe 1 (LD1) sépare très clairement les groupes de génotypes porteurs de la délétion au locus (avr/∅, Avr/∅ et ∅/∅) de ceux ne possédant pas la délétion

au locus (*Avr/avr*, *Avr/Avr*, *avr/avr*), suggérant une structuration de ces individus sur la base des TE délétés sur le chromosome 15.

Pour identifier les TE les plus structurants, nous avons généré une analyse explicitant l'influence de chaque TE sur la structuration observée ci-dessus. Deux TE sont de manière évidente ceux influençant le plus cette structuration, le TE ms23250 et le TE ms23218 ([Figure 18B](#)). Ces deux TE sont positionnés respectivement entre les positions 2,206,870-2,207,764 et 2,225,370-2,226,372 sur le chromosome 15 du génome de référence de *M. larici-populina*. Ces deux TE sont donc positionnés juste en amont de la borne 5' de la délétion mise en évidence au locus candidat (de la position 2,230,644 jusqu'à la position 2,261,286 ; cf. [Article 2](#)). Le TE ms23218 qui est le plus près de la borne 5' de la délétion est celui qui explique le plus la structuration entre génotypes porteurs ou non de la délétion.

Pour identifier l'implication de chacun de ces deux TE sur la structuration observée ci-dessus, nous avons identifié si ces TE étaient délétés ou non chez les 60 individus afin de générer une fréquence de présence/absence selon les six génotypes au locus ([Figure 18C](#)). La délétion du TE ms23218 est « présente » globalement chez quasi tous les individus porteurs des génotypes possédant la délétion au locus (génotypes *avr/∅*, *Avr/∅* et *∅/∅*). A l'inverse, il est globalement présent chez tous les individus sans la délétion au locus candidat (génotypes *Avr/avr*, *Avr/Avr*, *avr/avr*). Pour le TE ms23250, la distinction est moins évidente. En effet, ce TE est délété chez 80 à 100% chez les individus porteurs des génotypes *avr/∅* et *∅/∅* mais seulement à 30% pour les individus porteurs du génotype *Avr/∅*. Ainsi, le TE ms23218 est le TE le plus associé à la délétion au locus candidat *AvrMlp7*.

Enfin, pour identifier s'il existait d'autres TE influençant la structuration de ces individus, nous avons retiré les données associées aux TE ms23218 et ms23250 pour supprimer un éventuel 'masquage' sur les autres TE. D'après le nouveau diagramme de dispersion des individus, les groupes de génotypes ne sont plus séparés selon la délétion au locus ([Figure 19](#)), suggérant que les TE ms23218 et ms23250 sont les plus discriminants dans cette analyse.

En conclusion, la distinction, entre les génotypes porteurs de la délétion et ceux ne possédant pas de délétion au locus candidat *AvrMlp7*, est très fortement corrélée à la délétion de deux TE sur le chromosome 15. Aucun autre TE n'a pu expliquer d'avantage cette séparation. Le TE ms23250 et plus particulièrement le TE ms23218 sont de manière générale délétés chez tous les individus porteurs de la délétion au locus d'intérêt. Ainsi, ces résultats pourraient indiquer une implication de l'activité de TE et surtout de ces deux TE, présents en amont de la délétion, dans l'altération de la structure du génome au locus d'avirulence candidat *AvrMlp7* conduisant à la virulence de *M. larici-populina*.

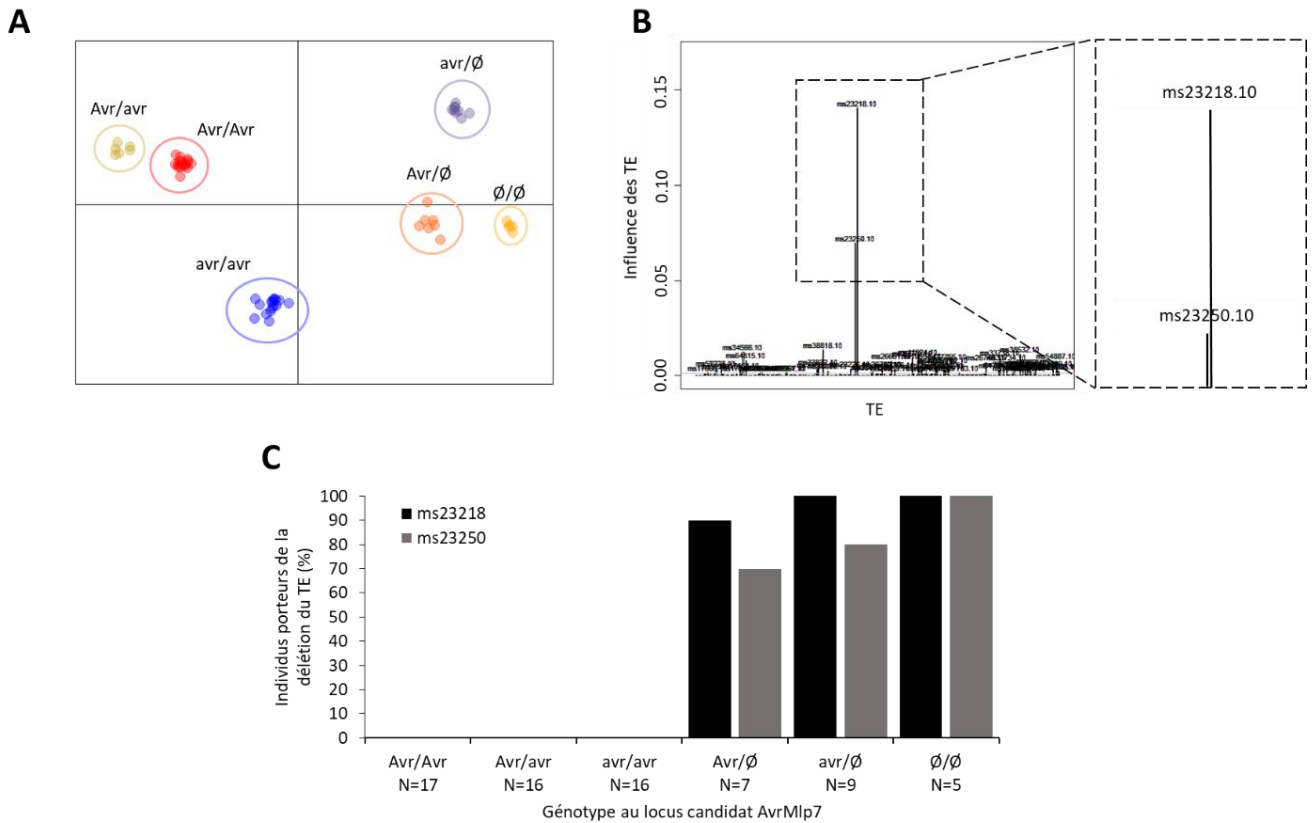


Figure 18. Sans les éléments transposables ms23218 et ms23250 sur le chromosome 15 le clivage n'est plus distinguable entre les isolats porteurs ou non de la délétion au locus candidat *AvrMlp7*.

(A) Diagrammes de dispersion de l'analyse discriminante des composantes principales (DAPC) pour les six génotypes au locus candidat *AvrMlp7* de *Melampsora larici-populina*. Cette étude prend en compte 60 individus dont le génotype au locus a été caractérisé et les éléments transposables (TE) annotés sur le chromosome 15. Les axes représentent les deux premières combinaisons linéaires discriminantes (LD). Les points représentent les individus. L'analyse DAPC a été réalisée avec les paramètres suivants : 50 premières composantes principales (PC) (90 % de la variance conservée) de l'analyse en composantes principales (ACP) et deux valeurs propres discriminantes (DA). L'axe 1 (LD1) sépare les individus avec ou sans la délétion au locus candidat. (B) Graphique montrant l'influence des TE sur la séparation des groupes mis en évidence en (A). Les pics individuels montrent l'ampleur de l'influence de chaque TE sur la séparation des groupes. Les TE sont ordonnés d'après leur position sur le génome de référence. Les TE ms23218 et ms23250 sont les deux seuls TE qui contribuent le plus au premier axe de l'analyse DAPC, donc à la distinction des génomes porteurs ou non de la délétion au locus candidat *AvrMlp7*. (C) Graphique montrant la fréquence de délétion des TE ms23218 et ms23250 dans les groupes d'individus selon leur génotype au locus candidat *AvrMlp7*. Le TE ms23218 est globalement absent à 100% dans tous les génotypes porteurs de la délétion au locus candidat. Génotype au locus candidat *AvrMlp7* : Avr, allèle d'avirulence ; avr, mutation non-synonyme de l'allèle Avr ; ∅, délétion de l'allèle Avr.

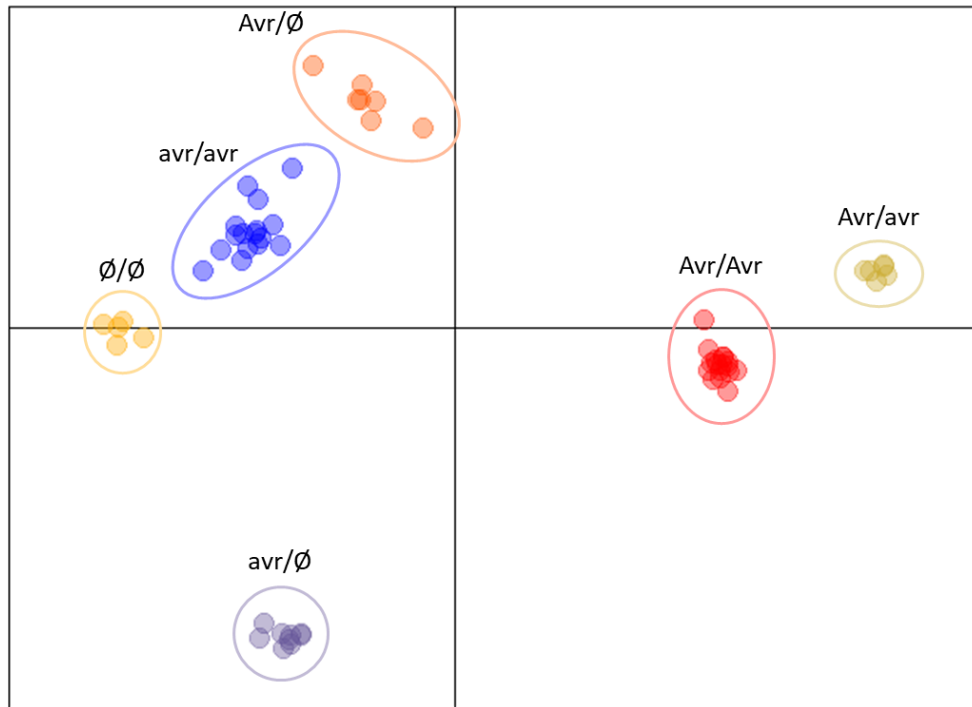


Figure 19. Deux éléments transposables sur le chromosome 15 semblent expliquer le clivage entre les individus porteurs ou non de la délétion au locus candidat *AvrMlp7*.

Diagrammes de dispersion de l'analyse discriminante des composantes principales (DAPC) pour les six génotypes au locus candidat *AvrMlp7* de *Melampsora larici-populina*. Cette étude prend en compte 60 isolats dont le génotype au locus a été caractérisé et les éléments transposables (TE) annotés sur le chromosome 15. Les TE ms23218 et ms23250 ont été supprimés des données utilisées pour cette étude. Les axes représentent les deux premiers Discriminants Linéaires (LD). Les points représentent les isolats. L'analyse DAPC a été réalisée avec les paramètres suivants : 50 premières composantes principales (PC) (90 % de la variance conservée) de l'analyse en composantes principales (ACP) et deux valeurs propres discriminantes (DA). Sans les TE ms23218 et ms23250, l'analyse ne sépare plus les isolats avec ou sans la délétion au locus candidat. Génotype au locus candidat *AvrMlp7* : *Avr*, allèle d'avirulence ; *avr*, mutation non-synonyme de l'allèle *Avr* ; \emptyset , délétion de l'allèle *Avr*.

3.2. Une mutation aléatoire aux UV a permis de recréer un génotype et un phénotype virulent à partir d'un individu avirulent

3.2.1. Contexte

L'identification des mutations qui modifient ou abrogent les fonctions des gènes est une étape clé pour élucider davantage les bases moléculaires des interactions compatibles et incompatibles entre hôtes et pathogènes (cf. [Chapitre I partie 1.2](#)). Toutefois, les Pucciniales sont des pathogènes biotrophes obligatoires difficilement manipulables en laboratoire, limitant les possibilités de réaliser des mutations dirigées. Ainsi, des approches alternatives doivent être envisagées pour ces organismes afin d'explorer les fonctions des gènes. Celles-ci peuvent comprendre l'analyse de la variation génétique

naturelle ou la mutation induite. Étant donné que les gènes *Avr* sont généralement dominants et que les gènes *R* correspondants leurs sont spécifiques, un crible sélectif peut être réalisé par une étape d'inoculation sur l'hôte résistant. Générer des événements d'intégration aléatoires dans le génome des agents pathogènes et utiliser une sélection ultérieure sur divers cultivars contenant des gènes *R* est une approche qui a déjà fait ces preuves pour identifier les gènes *Avr* correspondant. Flor a été le pionnier pour ce type d'approche avec l'utilisation du rayonnement ultraviolet (UV) sur l'agent de la rouille du lin *Melampsora lini* pour produire des mutants virulents à partir d'isolats avirulents (Flor 1956). Par la suite, ces approches de mutagenèse aléatoire ont été couplées au développement du séquençage des génomes pour caractériser les gènes candidats *Avr* associés au changement phénotypique. Plusieurs gènes candidats ont ainsi pu être identifiés chez d'autres Pucciniales notamment chez *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (Li et al. 2020, 2019b) ainsi que les gènes d'avirulence *AvrSr35* et *AvrSr50* codés par *P. graminis* f. sp. *tritici* (Salcedo et al. 2017; Chen et al. 2017; Kangara et al. 2020). Ces chercheurs ont généralement procédé à un traitement chimique (EMS – éthylméthane sulfonate) sur les urédiniospores de ces agents pathogènes. Cependant, les Pucciniales étant dicaryotiques (n+n) et contenant deux haplotypes pendant la majeure partie de leur cycle de vie, l'analyse des mutations pour identifier la fonction du gène (dominant) ne peut fonctionner que pour les gènes à l'état hétérozygote. Or, nous avons pu montrer que le gène candidat *AvrMlp7* de *M. larici-populina* est présent localement à l'état haploïde dans les isolats de génotype *Avr/∅* (cf. Article 2). Ainsi, de telles méthodes pourraient être envisagées pour explorer les déterminismes conduisant à la virulence aussi bien au niveau du gène candidat *AvrMlp7* (modification de la région promotrice, induction de mutations, ...) qu'au niveau de son environnement génomique.

Obtenus au cours de cette thèse, les résultats présentés ci-dessous sont issus de la mutation aléatoire par traitement UV des urédiniospores de *M. larici-populina*. Nous avons mis en place un protocole de transformation inédit au laboratoire puis un criblage des isolats transformés a été opéré sur le cultivar de peuplier 'Beaupré' porteur de la résistance *RMlp7*. Enfin, les analyses moléculaires développées au cours de l'article 2 ont été appliquées ce qui nous a permis d'identifier la perte du gène candidat *AvrMlp7* chez des isolats devenus virulents.

3.2.2. Matériels et Méthodes

Pour cette étude, un individu avirulent A7 de *M. larici-populina* a été choisi car génotypiquement haploïde au locus candidat *AvrMlp7* (*Avr/∅*) (98AB07 ; cf. Article 2). Les urédiniospores de cet individu ont été produites comme décrit précédemment (Rinaldi et al. 2007) et conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

Pour effectuer un traitement aux UV de manière homogène sur toutes les spores, nous avons pulvérisé ces dernières sur des boîtes de Petri contenant de la gélose à 20 g.L⁻¹ à l'aide d'un pistolet à air comprimé à 20 cm de distance (**Figure 20A**). Ce système permet de répartir les spores en une seule couche sur la surface de la boîte de Petri. Ces boîtes ont été placées à 2 cm de distance d'un transilluminateur et l'impact des irradiations aux UV-T (longueur d'onde à 312 nm) sur le taux de survie des spores a été évalué selon la durée d'exposition (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60 et 120 sec) (**Figure 20B**). Le taux de survie a été comptabilisé en triplicats 24 h post-traitement en comptant le nombre de spores germant sur gélose.

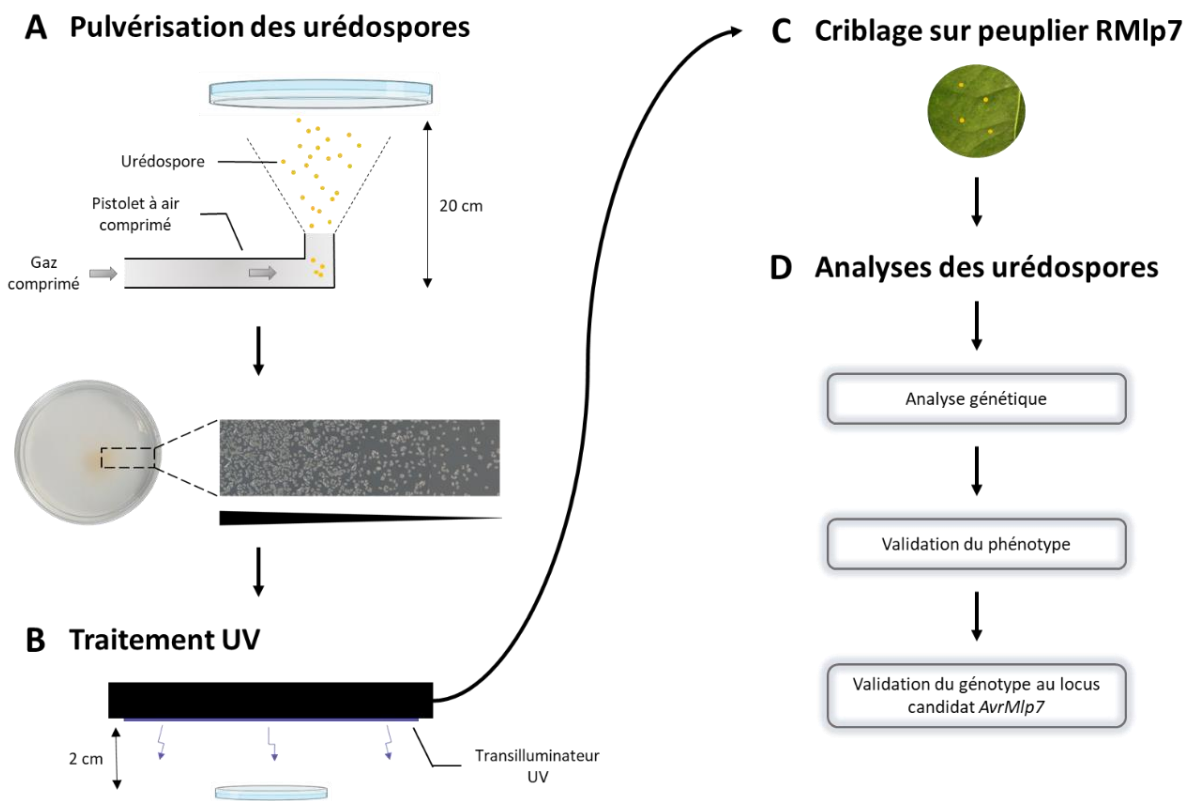


Figure 20. Résumé des étapes de production et de criblage des mutants UV de *Melampsora larici-populina* ayant acquis la virulence envers la résistance RMIp7.

(A) Les urédiniospores de *M. larici-populina* (isolat 98AB07) ont été pulvérisées par un pistolet à air comprimé sur des boîtes de Petri à 20 cm de distance. Avec ce dispositif, les urédiniospores sont réparties selon un gradient de concentration au point d'impact mais en une seule couche. (B) Les urédiniospores sur les boîtes de Petri ont été irradiées aux UV (UV-T ; longueur d'onde de 312 nm) par un transilluminateur à 2 cm de distance. (C) Un criblage des urédiniospores traitées a été effectué sur des feuilles du cultivar 'Beaupré', porteur de la résistance RMIp7. (D) Les urédies capables de se développer sur 'Beaupré' ont été analysées pour : (i) comparer le génotype par rapport à l'isolat de référence (98AB07) et éviter les contaminations ; (ii) valider le phénotype de virulence ; et (iii) valider le génotype au locus candidat AvrMlp7.

Pour effectuer un criblage des urédiniospores exposées aux UV, celles-ci ont été récoltées sur les boîtes de Petri immédiatement après exposition aux UV, puis inoculées sur des feuilles du cultivar 'Beaupré' (*Populus trichocarpa* x *P. deltoides*) porteur de la résistance *RMlp7* ([Figure 20C](#)). La culture du cultivar 'Beaupré', l'inoculation avec les urédiniospores et l'incubation dans une chambre de culture ont été effectués comme décrit précédemment ([Rinaldi et al. 2007](#)).

Nous avons procédé à un isolement de chaque urédie capable de se développer sur le cultivar résistant malgré le fond génétique avirulent de l'isolat initial, ceci afin de générer une collection d'isolats mutants. Un génotypage à l'aide de 22 loci microsatellites a été réalisé afin de s'assurer du fond génétique des isolats mutants et ainsi écarter les contaminations *via* d'autres isolats virulents a7. Le phénotype virulents a7 a été validé une seconde fois en réinoculant les isolats mutants sur des disques de feuille du cultivar 'Beaupré' comme décrit précédemment ([Maupetit et al. 2018](#)). Enfin, les méthodes de discrimination TaqMan ont été utilisées afin d'évaluer l'impact de la mutagenèse sur le polymorphisme déjà identifié au gène candidat *AvrMlp7* ([Figure 20D](#)). Le génotypage par microsatellites et la discrimination TaqMan ont été réalisés comme décrit dans l'[article 2](#).

3.2.3. Résultats

Avant de générer une collection d'isolats mutants, nous avons préalablement évalué les effets des traitements aux UV sur le taux de survie des urédiniospores. Pour ce faire, nous avons comptabilisé le nombre de spores germées, sur boîte de Petri, 24 h après des durées d'exposition aux UV de 0 à 120 sec. Les résultats indiquent très clairement que plus le temps d'irradiation augmente et plus le taux de survie des spores diminue ([Figure 21](#)). Ainsi, une exposition excessive aux UV a un effet létal sur les spores de *M. larici-populina*.

Dans le but d'induire suffisamment de mutations aléatoires par traitement UV tout en limitant les effets délétères, nous avons arbitrairement choisi de réaliser les expérimentations avec 30 sec d'exposition, induisant 40 % de mortalité ([Figure 21](#)). A l'issue de ce traitement, les urédiniospores traitées et initialement avirulentes A7 ont produit 24 urédies sur le cultivar 'Beaupré' porteur de la résistance *RMlp7*. Tous les isolats mutants sont génotypiquement concordants avec l'isolat 98AB07 d'origine. Il est intéressant de noter qu'aucune modification visible de leur pigmentation ou de la forme des spores et des urédies n'a été observée. Cependant, les isolats mutants préentaient un temps de latence deux à trois fois plus élevé (20-30 jours post-inoculation contre 7-10 jours habituellement) et produisaient moins de spores que l'individu non muté, probablement en raison de mutations de fond affectant leur performance. Leur capacité à infecter le cultivar *RMlp7* a été validé pour tous les

isolats mutants. Ce résultat valide le fait que le traitement UV a permis d'obtenir des isolats mutants phénotypiquement virulents a7 à partir d'un isolat initialement avirulent A7.

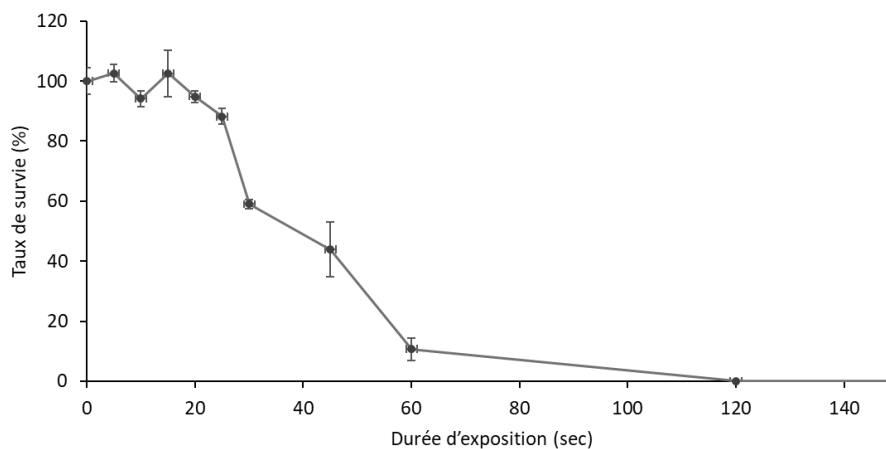


Figure 21. L'irradiation excessive aux UV sur des urédiniospores de *Melampsora larici-populina* a un effet létal.

L'impact des irradiations UV sur le taux de survie des urédiniospores de *M. larici-populina* a été évalué en fonction de la durée d'exposition. Le taux de survie a été caractérisé en dénombrant le nombre de spores germées sur gélose, 24 h après traitement. Les points et les barres d'erreur correspondent aux valeurs moyennes à chaque temps et à l'erreur standard à la moyenne, respectivement.

Pour évaluer la concordance entre le phénotype a7 et le génotype au locus candidat *AvrMlp7*, nous avons examiné le polymorphisme au locus pour les 24 isolats mutants, en utilisant les approches TaqMan décrites précédemment (cf. [Article 2](#)). Pour 11 isolats, nous n'avons pas identifié de copie du gène candidat, indiquant que ces derniers sont génotypiquement homozygotes \emptyset/\emptyset au locus candidat *AvrMlp7*. Une délétion de l'allèle Avr au locus a donc vraisemblablement été induite par le traitement aux UV. Pour les 13 autres isolats, aucun polymorphisme au locus n'a été identifié, suggérant que s'il y a une mutation au locus candidat *AvrMlp7*, elle touche un autre site que le SNP préalablement identifié par Persoons et al. (2021).

En conclusion, nous avons mis en place une expérimentation inédite au laboratoire qui, par traitement aux UV, a conduit à la génération d'un phénotype virulent a7 à partir d'un individu initialement avirulent A7, vraisemblablement par des altérations au niveau du locus candidat *AvrMlp7*. Un ensemble de 24 isolats mutants phénotypiquement virulents ont pu être sélectionnés. Onze semblent avoir gagné la virulence en perdant l'unique copie du gène candidat *AvrMlp7* présent dans le génome de l'isolat 98AB07. Néanmoins, une analyse plus fine sera nécessaire pour les 13 autres isolats mutants afin d'identifier les mutations responsables du gain de virulence dans leur génome. Enfin, cette approche pourra être réutilisée pour mettre en évidence d'autres gènes candidats d'avirulence chez *M. larici-populina*, grâce à un criblage sur une gamme différentielle de peupliers.

4. Discussion

Pendant des décennies, l'étude des effecteurs des Pucciniales a été freinée par le manque d'outils moléculaires applicables à ces pathosystèmes, entraînant un défaut en analyses fonctionnelles pour cet ordre (Lorrain et al. 2019; Petre et al. 2014; Bakkeren and Szabo 2020). Toutefois, des études contournent ces limites en combinant des approches de génétiques des populations et des approches moléculaires (Kubisiak et al. 2011; Wang et al. 2018; Zambino et al. 2000 ; [Article 2](#)). Si ces études ne permettent pas de déterminer les fonctions biologiques des effecteurs candidats, elles représentent une opportunité de prioriser les efforts sur des candidats statistiquement clivant entre des populations avirulentes et virulentes. Ces approches sont peu onéreuses et rapides en termes d'obtention de résultats. Elles permettent ainsi de cribler un grand nombre d'isolats. Ce chapitre en est une belle illustration. Dans cette étude, nous avons notamment mis en évidence deux mécanismes d'altération (une mutation non-synonyme et une large délétion) au locus candidat *AvrMlp7*, qui sont statistiquement corrélées à la virulence des isolats vis-à-vis de la résistance *RMlp7*. Enfin, en se concentrant sur des échantillons temporels, ces approches nous ont permis de montrer la corrélation entre les trajectoires évolutives des altérations au locus candidat et le remplacement d'une population avirulente en une population virulente. La multiplicité des mécanismes évolutifs pouvant conduire à l'émergence d'individus virulents est bien documentée (Frantzeskakis et al. 2020; Stukenbrock and Bataillon 2012; Rouxel and Balesdent 2017; Fouché et al. 2018). Toutefois, la démonstration que nous avons faite de la combinaison de plusieurs mécanismes évolutifs au sein d'un individu chez un agent pathogène diploïde est à notre connaissance originale.

Les résultats complémentaires obtenus *via* l'annotation des TE réalisées sur les génomes de plusieurs individus de *M. larici-populina* ont également ouvert la voie vers la compréhension du mécanisme causant la large délétion au locus. En effet, ces résultats indiquent une corrélation entre la délétion du gène candidat *AvrMlp7* chez les individus virulents a7 concernés et la délétion de deux TE à proximité du locus sur le chromosome 15 au sein des génomes examinés. L'importante proportion en TE relevée dans les génomes des Pucciniales indiquent de nombreux phénomènes de transposition dans ces génomes (Aime et al. 2017). D'après les annotations préliminaires, les deux TE identifiés dans cette étude possèderaient des mécanismes différents de transposition. Le TE ms23218 serait un RLX c'est-à-dire une rétrotransposon (R) de type LTR (L) mais dont la superfamille est inconnue (X). Celui-ci appartiendrait donc à la classe I des rétrotransposons qui possèdent un mécanisme de transposition de type « copier-coller ». Dans le cas du TE ms23250, ce dernier serait un DTX c'est-à-dire un « DNA transposons » (DT) dont la superfamille est inconnue (X). Ce TE appartiendrait donc à la classe II des transposons à ADN qui possèdent cette fois-ci un mécanisme de transposition de type « couper-

coller ». Les résultats présentés ici suggèrent un lien possible entre la transposition de TE et la délétion d'un gène codant un effecteur candidat. Plusieurs travaux portant sur différents organismes phytopathogènes filamenteux, dont l'oomycète *Phytophthora infestans*, ont montré que les niveaux de diversité génétique associés aux TE représentaient un avantage adaptatif (Dong et al. 2015). Chez les champignons pathogènes, l'invasion des génomes par les TE aurait contribué à leurs succès évolutifs (Raffaele and Kamoun 2012). Ainsi, outre un rôle possible dans l'adaptation à leurs hôtes ou à de nouveaux hôtes, les TE permettraient également une « réponse immédiate » de l'agent pathogène face à la forte pression de sélection induite par les protéines de résistance de l'hôte (Grandaubert et al. 2014). En effet, la plupart des contournements de résistance observés sont dues à des modifications plus ou moins drastiques soit du gène d'avirulence, soit de la protéine résultante (pour exemples, Balesdent et al. 2013; Chen et al. 2017; Daverdin et al. 2012; Gout et al. 2007; Hartmann et al. 2017; Rep et al. 2004; Salcedo et al. 2017; Schürch et al. 2004; Zhou et al. 2007). La plupart de ces événements sont directement liés à l'environnement riche en TE des gènes d'avirulence avec des conséquences d'instabilité génique ou d'augmentation du potentiel mutationnel. Il convient de noter que les espèces sexuées (comme dans le cas de *M. larici-populina*) peuvent également présenter des taux d'évolution accélérés pour des effecteurs situés dans un environnement génomique riche en TE (de Jonge et al. 2013). Ainsi, l'hypothèse que des événements de transposition à proximité du locus d'intérêt *AvrMlp7* puissent être responsables de l'émergence d'une nouvelle population virulente chez *M. larici-populina* suite à la forte pression de sélection exercée par les plantations intensives de cultivars porteurs de la résistance *RMlp7* ferait sens. Toutefois, il reste à compléter nos analyses afin de vérifier une telle association, par exemple en déterminant la capacité d'activité des TE présents à ce locus chez les individus avirulents, en précisant la corrélation entre la délétion au locus et la perte de ces TE chez un plus grand nombre d'individus et enfin en établissant une annotation plus fine et experte de ces TE dans les génomes des individus étudiés.

Pour finir, au cours de ce chapitre, nous avons décrit une procédure de mutagenèse aléatoire par UV pour développer une population mutante de spores et sélectionner les isolats mutants par un crible sur le cultivar 'Beaupré' porteur de la résistance *RMlp7*. Cette approche a permis de générer 24 mutants dont 11 portaient une délétion totale du locus candidat *AvrMlp7*. De ce fait, ce résultat consolide grandement l'importance de ce locus dans le contournement de la résistance *RMlp7*. De manière tout aussi intéressante, nous avons généré 13 autres mutants virulents mais porteurs du génotype initial *Avr/∅*. Ces mutants ne suivraient donc pas les attentes de la relation gène-pour-gène (Flor 1971). Cette approche de mutagenèse aléatoire suivie d'une sélection ultérieure sur des cultivars portant des gènes *R* constitue une approche intéressante pour des organismes non manipulables en laboratoire. Cette approche à moindre coût pourrait ainsi accélérer la caractérisation des gènes *Avr*

chez *M. larici-populina* tout en recensant l'ensemble des altérations potentiellement responsables du contournement des résistances. Le travers de telles approches est la génération de mutations en large nombre et non contrôlées, mais le séquençage massif des génomes désormais facilité avec l'évolution des approches de séquençage devrait permettre de telles applications.

Pour conclure, l'association des résultats générés dans l'[article 2](#) et des résultats complémentaires de ce chapitre suggèrent deux principaux événements d'altération du locus candidat *AvrMlp7* : une mutation non synonyme dans la séquence codante et une large délétion probablement résultante d'un événement unique de délétion. Ces derniers se sont diffusés très largement dans le paysage, sans doute grâce au cycle de vie particulier et au statut dicaryotique de *M. larici-populina* ([Saubin et al. 2021](#)) mais également grâce (ou plutôt à cause) de l'omniprésence des cultivars résistants dans le paysage populicole ([Pinon and Frey 2005](#)). Ces altérations ont ainsi contribué au contournement de la résistance *RMlp7* et au remplacement de populations observés à la suite de ce contournement majeur ([Persoons et al. 2017](#)). La large prédominance de ces événements mutationnels dans les populations de l'agent pathogène a probablement « masqué » d'autres événements mutationnels soit à très faible fréquence soit conduisant à une valeur adaptative plus faible (comme il a été le cas pour les mutants générés par UV) qui ont été purgés par sélection naturelle. Cette hypothèse est soutenue par la poignée d'isolats ne suivant pas la relation gène-pour-gène ([Flor 1971](#)), d'après l'utilisation d'outils moléculaires conçus exclusivement pour l'étude de ces deux altérations génomiques (cf. [Article 2](#)). Enfin, il faut souligner que l'ensemble de ces analyses permet de conforter le premier gène d'avirulence candidat chez l'agent pathogène de la rouille du peuplier, gène candidat que nous étudierons d'un point de vue fonctionnel dans le chapitre suivant (cf. [Chapitre III](#)).

Chapitre III – Analyses fonctionnelles du gène d'avirulence candidat *AvrMlp7*

1. Contexte

Le gène mis en évidence par Persoons et al. (2021) présente une évolution en accord avec l'évolution phénotypique et démographique de *M. larici-populina*, au cours du contournement de la résistance R*Mlp7* (cf. [Chapitre II](#)). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que ce gène codant un effecteur candidat serait bien le gène d'avirulence *AvrMlp7*. Néanmoins, il reste nécessaire d'assurer la démonstration formelle de son implication dans l'avirulence à travers des analyses fonctionnelles. Nous avons donc entrepris des investigations visant à caractériser aussi bien l'activité de virulence de l'effecteur en contexte d'interaction avec un hôte sensible que son caractère d'avirulence en contexte d'interaction avec un hôte résistant.

Afin de déterminer le mode d'action de cet effecteur, nous avons premièrement déterminé sa localisation subcellulaire dans le système hétérologue *Nicotiana benthamiana*. Les Pucciniales sont des champignons biotrophes obligatoires inféodés à leur hôte pour réaliser leur cycle de vie (Aime et al. 2017), ce qui rend difficile la manipulation génétique de ces derniers en laboratoire. Dans ces circonstances, les systèmes d'expression hétérologue sont devenus importants pour la caractérisation des effecteurs de ces agents pathogènes (Lorrain et al. 2018b; Bakkeren and Szabo 2020). Pour cette étude, cette approche nous a permis de mettre en évidence le compartiment dans lequel il s'accumule et d'identifier un motif d'adressage putatif mimant les peptides de transit des plantes.

Afin de générer du matériel biologique pour toutes les autres approches d'investigation envisagées, aussi bien pour déterminer la fonction de virulence que le caractère d'avirulence, nous avons initié la production et la purification de la protéine recombinante dans le système hétérologue *Escherichia coli*.

Afin de déterminer si cet effecteur possède des propriétés d'avirulence, nous nous sommes engagés dans la réalisation de protocoles expérimentaux pour transformer de manière transitoire l'hôte peuplier par bombardements biolistiques mais également pour infiltrer les protéines recombinantes directement dans les tissus de ce dernier.

Tous les résultats et approches susmentionnés sont présentés dans ce chapitre. Ces résultats ayant atteint divers degrés d'avancement et n'étant pas complètement finalisés, ils sont organisés selon plusieurs sous-parties puis discutés de manière générale à la fin de ce chapitre.

2. Travaux portant sur la caractérisation de l'activité de virulence

Afin de déterminer la localisation subcellulaire et potentiellement les cibles de la protéine candidate AvrMlp7, un processus d'analyse a été mis en place et utilisé dans cette étude ([Figure 22](#)). D'après Persoons *et al.*, (2021), cet effecteur ne possède aucun peptide signal en position N-terminale prédit mais une sécrétion est tout de même prédite *via* des voies de sécrétions alternatives. Dans ce contexte, la séquence de la protéine a été clonée soit entièrement (1-219 acides aminés) soit sous forme d'une version clivée où les 20 premiers acides aminés étaient tronqués (zone présentant potentiellement un signal de sécrétion ; 20-219). Afin d'évaluer l'impact de la mutation non-synonyme S⁸¹G dans la séquence protéique de cet effecteur, nous avons également cloné une forme native et une forme mutée de la protéine (appelée ci-après AvrMlp7 et avrMlp7, respectivement ; mutagénèse dirigée au SNP_2233369 ; pour plus de détails cf. [Chapitre III partie 6.2](#)). Par la suite, une protéine fluorescente de type mCherry a été fusionnée en position C-terminale à chacune de ces séquences ([Figure 22A](#)), par un clonage de type Golden Gate ([Engler et al. 2014](#)). Ces protéines ont été coexprimées de manière transitoire par agro-infiltration dans des feuilles de *N. benthamiana*, avec des témoins de localisations subcellulaires : la fusion CTP1-GFP s'accumulant dans les chloroplastes et les mitochondries ([Petre et al. 2016a](#)) et la GFP libre s'accumulant dans le noyau et le cytosol de la cellule ([Figure 22B](#)). Pour finir, les cellules vivantes ont été visualisées par microscopie confocale ([Figure 22C](#) ; pour plus de détails cf. [Chapitre III partie 6.3](#)). Toutes les constructions ont produit des signaux fluorescents informatifs distribués exclusivement dans les chloroplastes des cellules ([Figure 23](#)). En effet, les quatre formes de l'effecteur ont produit un signal fluorescent net qui ne chevauchait pas le signal fluorescent de la GFP libre ([Figure 23A](#) ; [Figure 23B](#)) et qui chevauchait le signal fluorescent de la fusion CTP1-GFP uniquement au niveau des chloroplastes ([Figure 23C](#) ; [Figure 23D](#)). Ces résultats suggèrent donc que ces effecteurs s'accumulent dans les chloroplastes des cellules de tabac.

Pour évaluer la présence d'un peptide de transit en partie N-terminale du candidat AvrMlp7, nous avons réalisé des expériences similaires d'imagerie de cellules vivantes *via* les effecteurs marqués en position N-terminale avec la protéine fluorescente mCherry ([Figure 22](#) ; [Figure 24](#)). De manière intéressante, comme observé avec la GFP libre, une accumulation des protéines marquées a été identifiée dans le cytosol et le noyau des cellules de tabac. Ces signaux fluorescents étaient informatifs et chevauchaient significativement le signal fluorescent de la GFP (colocalisation entre 0.83 et 0.98 pour les deux signaux selon le coefficient de corrélation *R* de Pearson). Ces résultats suggèrent donc que la fusion en position N-terminale de la protéine fluorescente mCherry perturbe la signalisation vers les chloroplastes.

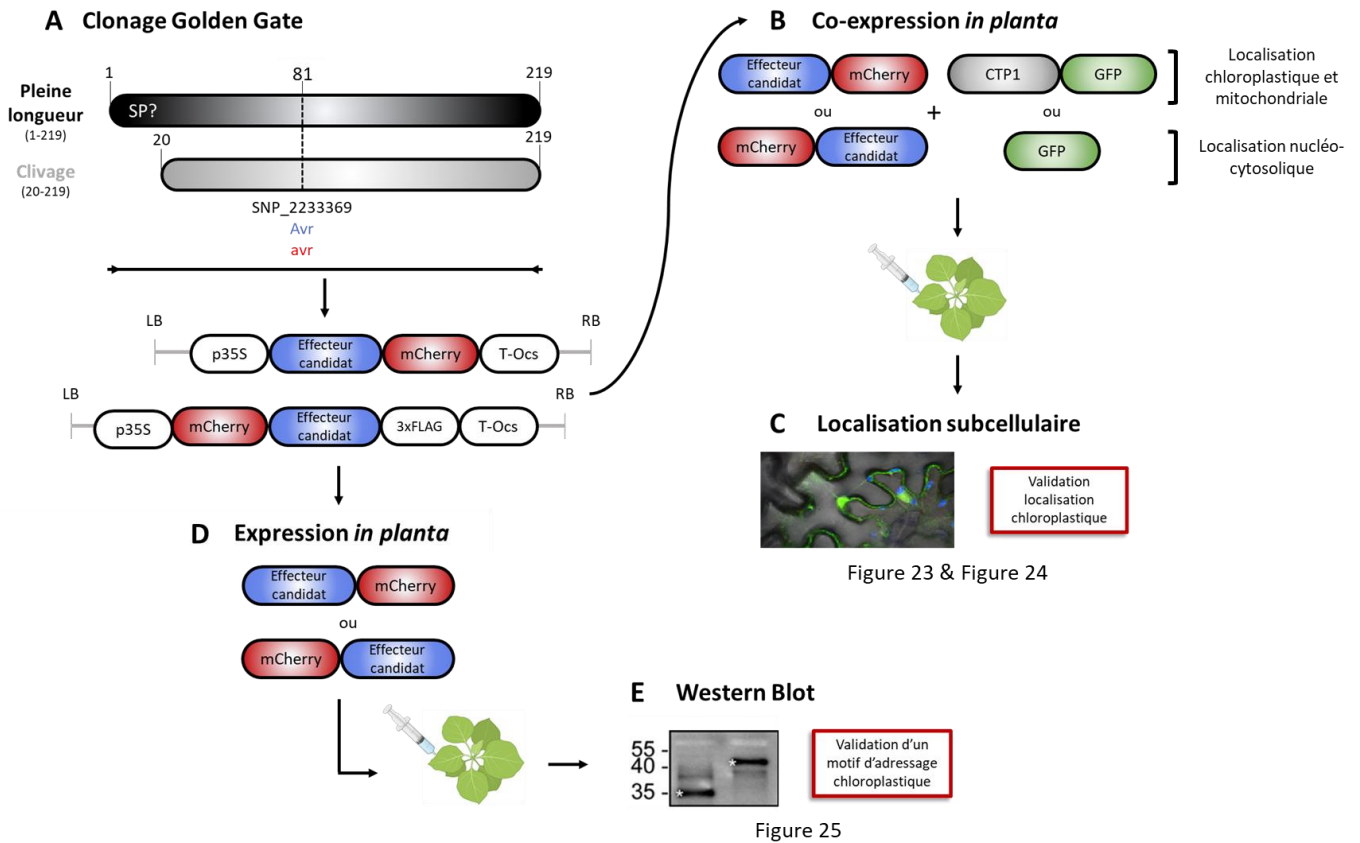


Figure 22. Vue d'ensemble du processus expérimental pour déterminer la localisation subcellulaire de la protéine candidate *AvrMlp7*.

(A) Les séquences codantes de la protéine effectrice candidate (bleu) ont été clonées dans un vecteur binaire Golden Gate en aval d'un promoteur 35S (p35S) et en amont d'un terminateur Ocs (T-Ocs) et/ou d'un module 3xFLAG. La protéine fluorescente rouge (mCherry ; rouge) a également été fusionnée à la séquence codante de la protéine effectrice candidate en position N-terminale ou en position C-terminale. Ces constructions ont été réalisées avec la séquence pleine longueur ou avec une version privée des nucléotides codants les 20 premiers acides aminés, sous la forme native (Avr) et mutée (avr) (potentiellement formes avirulente et virulente, respectivement). (B) Des cellules d'*Agrobacterium tumefaciens* ont été transformées avec les vecteurs binaires. Des transformations ont également été effectuées pour des témoins de localisations subcellulaires : la protéine CTP1 (en gris) fusionnée à une protéine de fluorescence verte (GFP ; vert) et la GFP libre. Les protéines d'intérêts ont été coexprimées, avec l'un des deux témoins, dans les cellules de feuilles de *Nicotiana benthamiana* par agro-infiltration. (C) La localisation subcellulaire des fusions dans les cellules de tabac a été déterminée par imagerie des cellules vivantes avec un microscope confocal à balayage laser et comparée à la localisation du témoin, pour évaluer leur patron de co-accumulation. L'illustration est une image superposée d'une GFP libre (verte) diffusant dans le cytosol et dans le noyau. bleu : chlorophylle (chloroplastes). (D) Les protéines d'intérêt ont été exprimées seules dans les feuilles de *N. benthamiana* par agro-infiltration. (E) La présence d'un motif d'adressage dans un compartiment a été vérifiée par Western Blot. Modifié d'après Petre et al. (2015), l'illustration représente un Western Blot d'une protéine chloroplastique clivée spécifiquement lorsqu'elle s'accumule dans le chloroplaste.

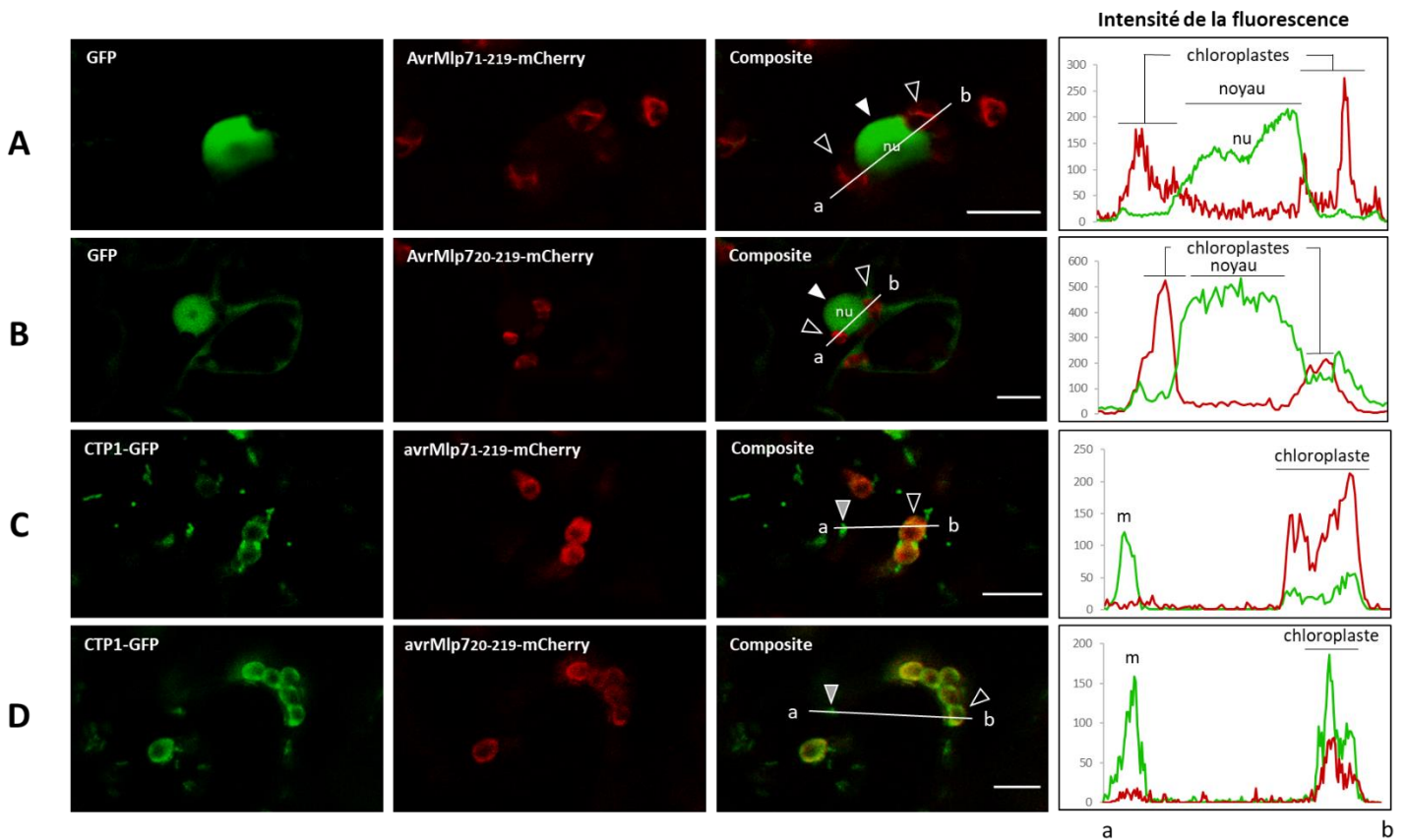
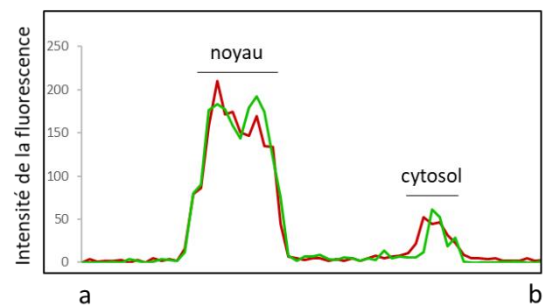
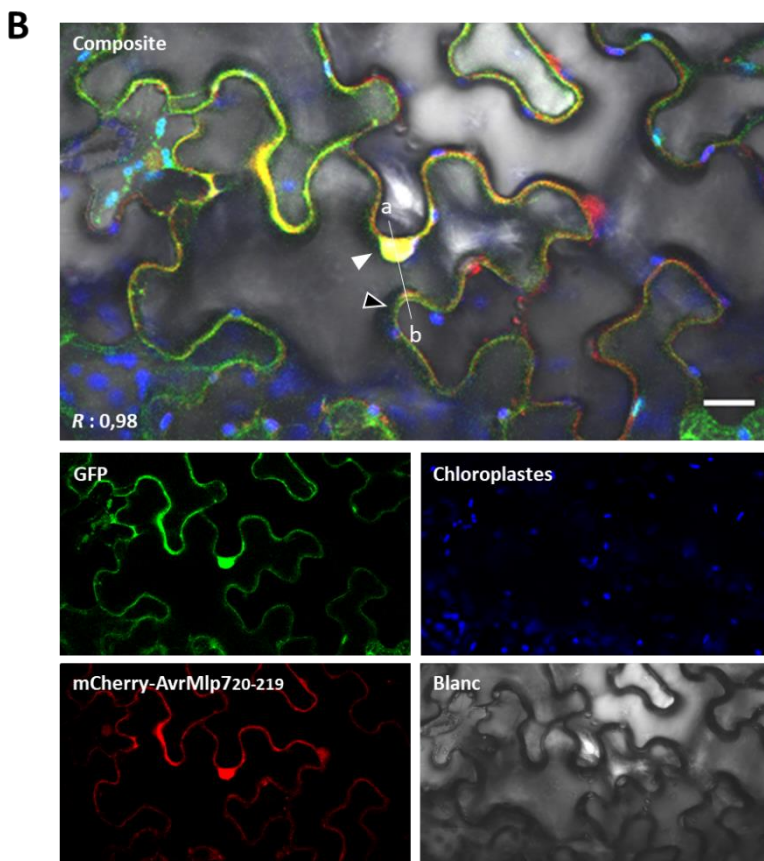
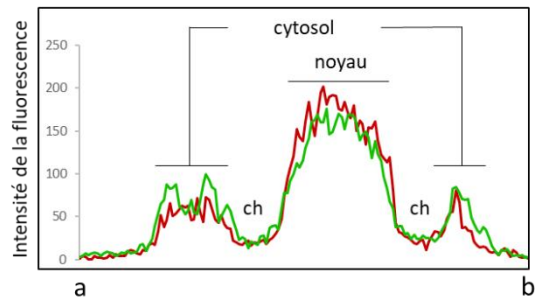
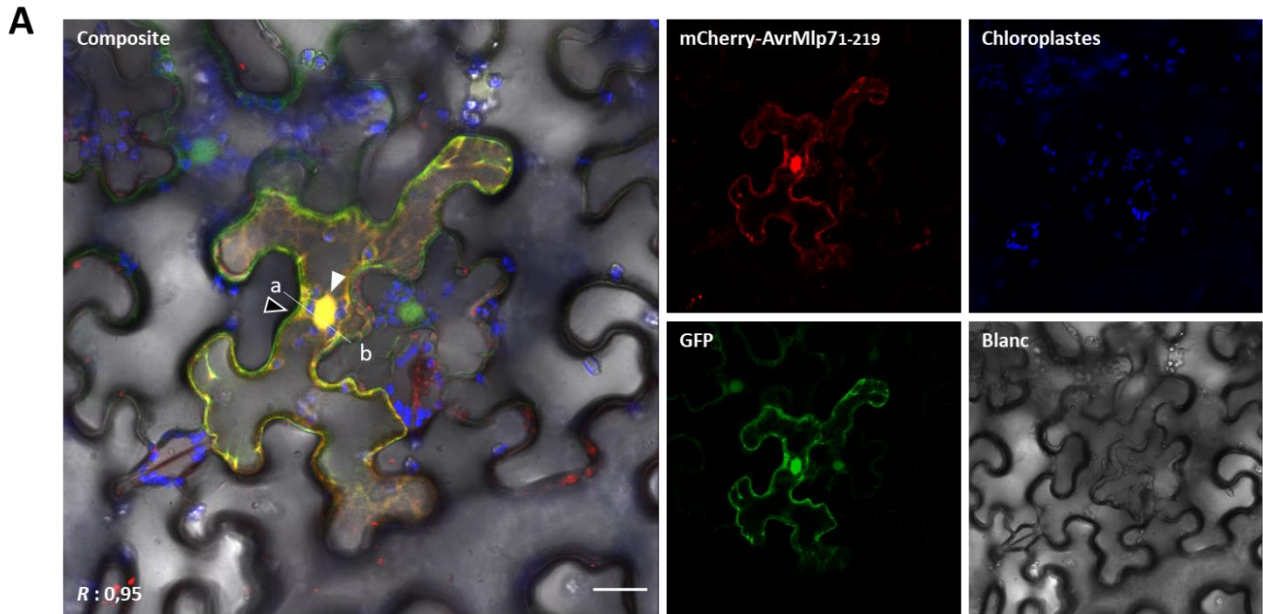


Figure 23. Les protéines AvrMlp7 fusionnées à des protéines fluorescentes en position C-terminale s'accumulent au niveau des chloroplastes, sous la forme native et mutée.

Les fusions AvrMlp71-219-mCherry et AvrMlp720-219-mCherry ont été coexprimées avec la GFP libre et les fusions avrMlp71-219-mCherry et avrMlp720-219-mCherry ont été coexprimées avec la fusion CTP1-GFP, par agro-infiltration dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana*. L'imagerie des cellules vivantes a été réalisée avec un microscope confocal à balayage laser trois jours après l'infiltration. A-D, images de microscopie confocale de cellules épidermiques de feuilles de *N. benthamiana* coexprimant les fusions avec la GFP libre (A et B) ou avec la fusion CTP1-GFP (C et D). La GFP libre s'accumule dans le noyau (flèches blanches) et le cytosol et la fusion CTP1-GFP s'accumule dans les chloroplastes (flèches noires) et les mitochondries (flèches grises). Les quatre effecteurs montrent une accumulation dans les chloroplastes. Les images sont des z-stack de 15 à 27 μm . Les images composites combinent la GFP libre (A-B) ou la fusion CTP1-GFP (C-D) avec les effecteurs fusionnés à la mCherry. Les courbes d'intensité de fluorescence relative des signaux GFP (A-B) ou CTP1-GFP (C-D) (vert) et des protéines fusionnées à la mCherry (rouge) sont représentées par superposition à droite des images composites, le long du segment ab. La GFP et la chlorophylle ont été excitées à 488 nm ; la mCherry a été excitée à 561 nm. Les signaux fluorescents de la GFP (vert), de la mCherry (rouge) et de la chlorophylle (bleu) ont été recueillis à 505-530, 580-625 et 680-700 nm, respectivement. Barre d'échelle : 10 μm . nu : nucléole, m : mitochondrie.



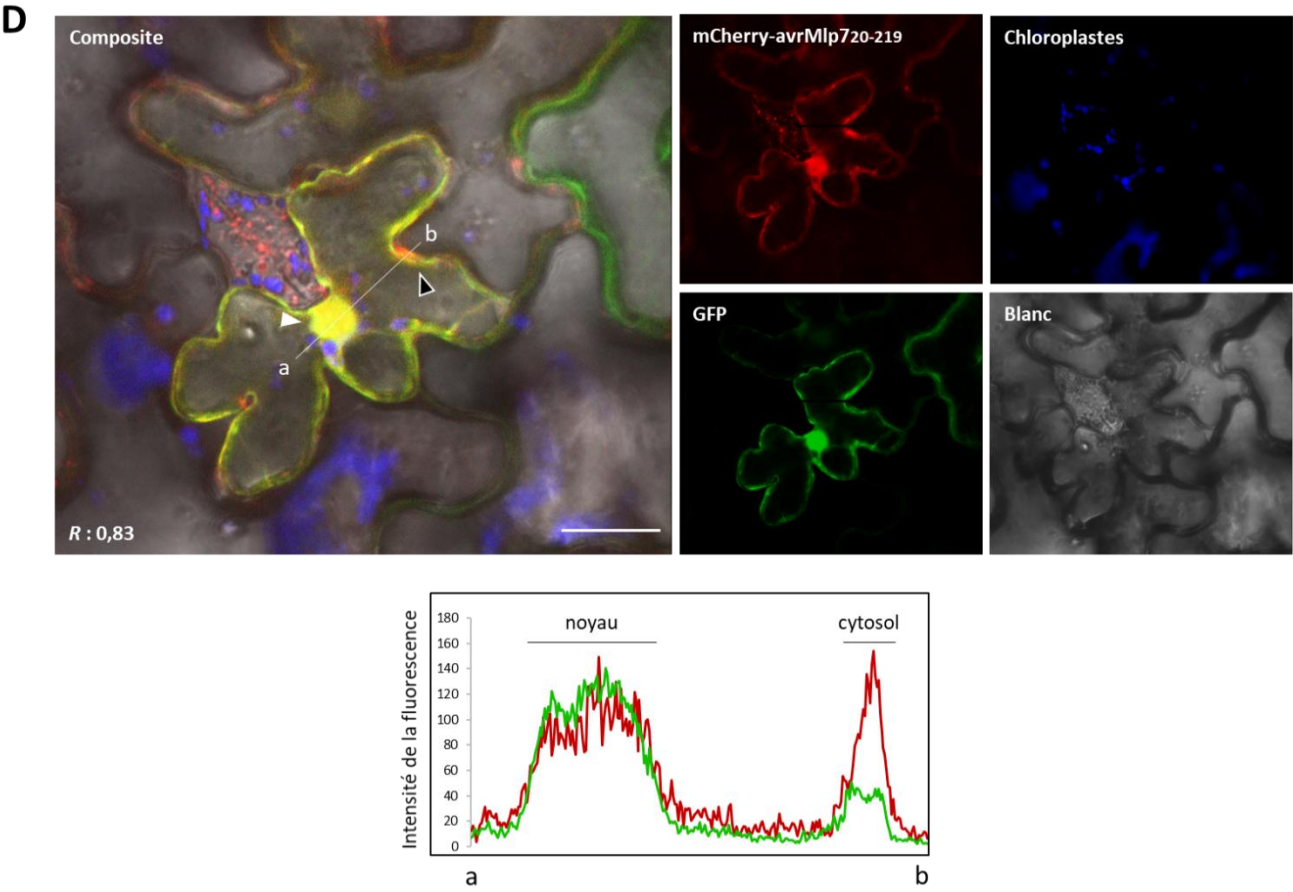
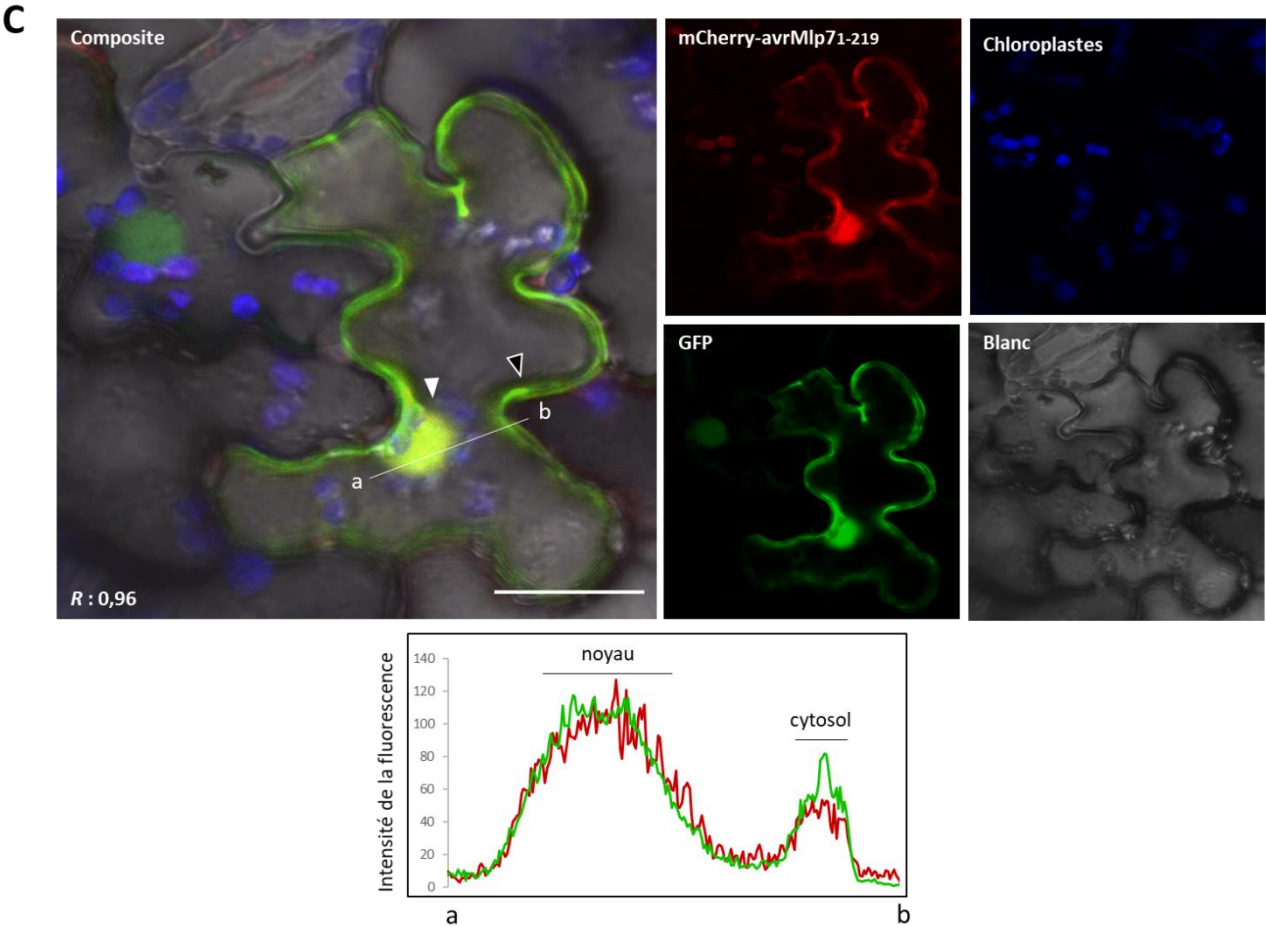


Figure 24. Les protéines AvrMlp7 fusionnées à des protéines fluorescentes en position N-terminale s'accumulent au niveau des noyaux et du cytosol, sous la forme native et mutée.

Les fusions mCherry-AvrMlp7₁₋₂₁₉ (A), mCherry-AvrMlp7₂₀₋₂₁₉ (B), mCherry-avrMlp7₁₋₂₁₉ (C), mCherry-avrMlp7₂₀₋₂₁₉ (D) ont été coexprimées avec la GFP libre, par agro-infiltration dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana*. L'imagerie des cellules vivantes a été réalisée avec un microscope confocal à balayage laser trois jours après l'infiltration. La GFP libre s'accumule dans le noyau (flèches blanches) et le cytosol (flèches noires). Les quatre effecteurs montrent une accumulation identique à la GFP libre. Les images sont des z-stack de 13 à 29 µm. Les images composites combinent la GFP libre avec les effecteurs fusionnés à la mCherry, la chlorophylle (bleu) et les images en champ clair. Les courbes d'intensité de fluorescence relative des signaux GFP (vert) et des protéines fusionnées à la mCherry (rouge) sont représentées par superposition à droite des images composites, le long du segment ab. Les scores de colocalisation (*R* : valeur *R* de Pearson) sont indiqués dans les images composites. La GFP et la chlorophylle ont été excitées à 488 nm ; la mCherry a été excitée à 561 nm. Les signaux fluorescents de la GFP (vert), de la mCherry (rouge) et de la chlorophylle (bleu) ont été recueillis à 505-530, 580-625 et 680-700 nm, respectivement. Barre d'échelle : 20 µm.

Lors de la translocation dans les chloroplastes et les mitochondries, les peptidases de modification post-traductionnelle clivent les peptides de transit (Teixeira and Glaser 2013). Cette transformation a notamment été mise en évidence chez certains effecteurs chloroplastiques de *M. larici-populina* (Petre et al. 2016a, 2015). Pour déterminer si les constructions détaillées ci-dessus subissent une transformation *in planta*, un Western Blot anti-mCherry a été réalisé avec des protéines totales isolées de feuilles de *N. benthamiana* exprimant les fusions AvrMlp7₂₀₋₂₁₉-mCherry, avrMlp7₂₀₋₂₁₉-mCherry et mCherry-AvrMlp7₁₋₂₁₉ (les autres constructions n'ont pas été traitées à ce jour) (Figure 22D-E ; Figure 25. Les protéines candidates AvrMlp7 sont spécifiquement clivées dans les chloroplastes. ; pour plus de détails cf. Chapitre III partie 6.4). Pour les constructions AvrMlp7₂₀₋₂₁₉-mCherry et avrMlp7₂₀₋₂₁₉-mCherry, les signaux des bandes étaient plus bas que la taille théorique attendue, ce qui suggère que ces protéines subissent un clivage dans la plante. En effet, les deux constructions présentent un patron identique avec deux bandes en dessous de 35 kDa et une bande au-dessus de 15 kDa. Ces signaux sont nettement inférieurs à la taille attendue (c'est-à-dire non clivée) de 48 kDa. A l'inverse, la construction mCherry-AvrMlp7₁₋₂₁₉ a présenté un seul signal qui coïncide avec le poids moléculaire prédit de 54 kDa, suggérant que cette construction ne subit pas de clivage *in planta*.

En conclusion, la protéine candidate AvrMlp7 s'accumule dans les chloroplastes des cellules. Cette accumulation est réalisée de manière dépendante d'un signal en position N-terminale et le clivage est spécifiquement corrélé à l'accumulation dans les chloroplastes. Cette accumulation a été observée pour les constructions avec ou sans le clivage des 20 premiers acides aminés. De plus, cette accumulation était plus importante pour la forme clivée de la protéine (résultats non présentés dans ce chapitre). Ces résultats suggèrent donc que le motif d'adressage vers les chloroplastes se situe en aval des 20 premiers acides aminés. De plus, la mutation non-synonyme S⁸¹G dans la séquence

protéique de l'effecteur ne modifie pas les localisations identifiées ci-dessus, suggérant que les formes native et mutée de la protéine s'accumulent dans les mêmes compartiments cellulaires. Dans l'ensemble, ces résultats révèlent que la protéine candidate AvrMlp7 cible probablement les chloroplastes de l'hôte peuplier, ce qui représente une information cruciale pour générer des hypothèses plus précises quant à sa fonction de virulence.

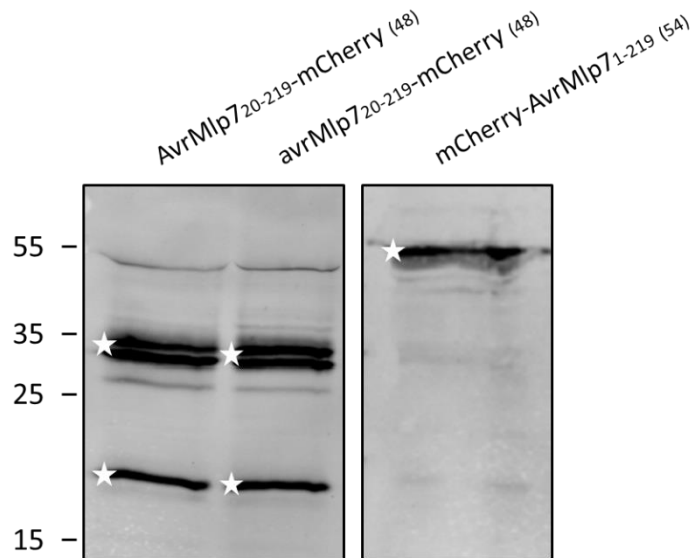


Figure 25. Les protéines candidates AvrMlp7 sont spécifiquement clivées dans les chloroplastes.

Les protéines fusionnées à la mCherry, en position C-terminale (partie de gauche) et en N-terminale (partie de droite), ont été exprimées de manière transitoire dans des cellules de feuilles de *Nicotiana benthamiana* par agro-infiltration. L'extraction des protéines totales a été réalisée trois jours après l'infiltration en broyant les feuilles dans de l'azote liquide puis en réduisant et dénaturant immédiatement les protéines contenues dans la poudre de feuilles par un tampon Laemmli 15 min à 95°C. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE à 15% et transférées sur une membrane de nitrocellulose pour réaliser des analyses par Western Blot. La détection immunitaire a été réalisée avec des anticorps anti-mCherry. Pour chaque protéine de fusion, la taille théorique non-clivée est indiquée entre parenthèses en kiloDaltons (kDa). Les tailles des protéines sont indiquées sur le côté gauche de l'image en kDa. Les astérisques indiquent les bandes de protéines discutées dans le texte.

3. Démarche engagée visant à obtenir une protéine AvrMlp7 recombinante

Afin de caractériser fonctionnellement la protéine candidate AvrMlp7, la production de la protéine recombinante a été initiée *via* différentes méthodes de clonage, d'expression dans des souches productrices d'*E. coli* et de purification ([Figure 26](#)). De manière générale, les clonages ont été réalisés avec succès. Toutefois, l'expression et la purification des protéines recombinantes n'ont pas rencontré le même succès, limitant de fait les analyses fonctionnelles qui auraient pu en découler.

Premièrement, nous avons cloné toutes les séquences codantes préalablement citées (cf. [Chapitre III partie 2](#)) dans le plasmide pET26b. Ce plasmide est un vecteur d'expression incorporant une étiquette poly-histidine C-terminale qui facilite la purification de la protéine par chromatographie d'affinité au nickel (chromatographie de type IMAC). Les protéines recombinantes étiquetées ont été ensuite surexprimées dans les souches d'*E. coli* BL21 (DE3), C41, C43, Origami et SoluBL21, sous un protocole d'expression classique ou d'expression à basse température avec de l'éthanol (pour plus de détails cf. [Chapitre III partie 6.5](#)). Brièvement, l'induction d'un stress au froid et d'un stress alcoolique permet l'induction de protéines chaperonnes qui améliorent le repliement structural des protéines et donc *in fine* leur expression ainsi que leur solubilité. Cette approche représente l'unique manière avec laquelle nous avons pu produire ces protéines dans les souches de production *E. coli* C41, C43, Origami et SoluBL21. Cependant, aucune de ces protéines recombinantes n'était soluble.

Afin d'améliorer la solubilité des protéines recombinantes de nouveaux clonages ont été effectués notamment dans le plasmide pGEX_6P_1 qui possède une GST (Glutathione S-Transferase) en position N-terminale, améliorant la solubilité des protéines. En effet, une protéine sous forme d'étiquette, correctement repliée, peut améliorer la solubilité d'une petite protéine à laquelle elle est fusionnée. Les protéines recombinantes ont été exprimées avec ce nouveau système de manière soluble uniquement dans la souche de production *E. coli* GroEL-GroES (pSBET) à basse température avec de l'éthanol. Cette souche coexprime les molécules chaperonnes GroEL et GroES et le plasmide pSBET (fournissant des codons rares de type arginine en faible abondance dans *E. coli*), permettant ainsi d'améliorer l'expression et le repliement correct des protéines recombinantes. Enfin, des essais de purification des protéines recombinantes ont été réalisés dans des conditions natives à l'aide d'une chromatographie d'affinité pour l'étiquette GST. Au cours de ces essais, de nombreuses modifications ont été apportées au protocole de purification notamment des variations dans le tampon d'extraction ([Figure 26](#)) car des processus d'hydrolyse des protéines dans le système hétérologue ont été constatés. Néanmoins, aucune de ces alternatives n'a permis de purifier les protéines.

En conclusion, la purification de la protéine candidate AvrMlp7 n'a pas été accomplie. Toutefois, les démarches d'ingénierie protéique engagées ont permis de préciser des conditions permettant la production de la protéine recombinante. Ces résultats contribueront dans la poursuite des activités autour de cet effecteur et amélioreront nos protocoles de production au laboratoire (cf. [Chapitre III partie 5](#) ; [Chapitre V partie 6](#)).

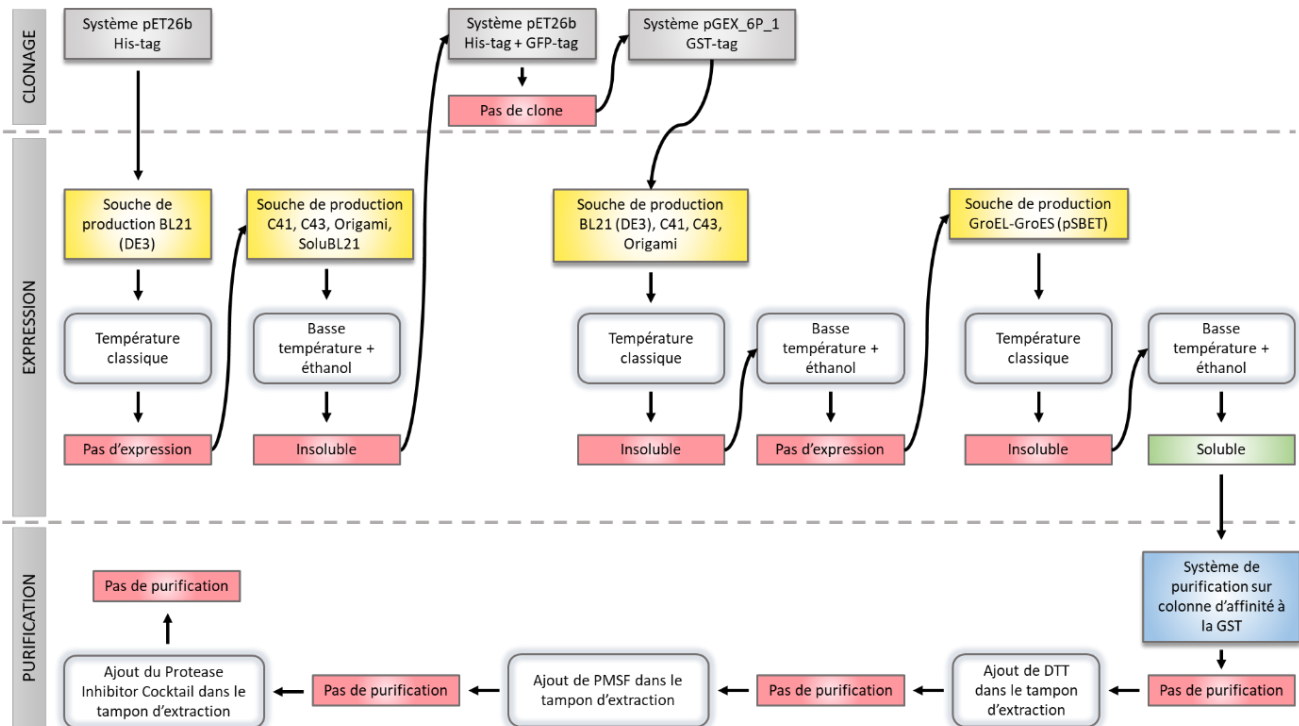


Figure 26. Vue d'ensemble du processus expérimental utilisé pour tenter de produire et de purifier la protéine candidate AvrMlp7 en utilisant *Escherichia coli*.

L'ensemble des étapes réalisées au cours de la thèse pour produire et purifier la protéine AvrMlp7 sont représentées sous forme d'un diagramme fonctionnel des expérimentations effectuées en laboratoire. Les effecteurs candidats ont été clonés dans les systèmes pET26b et pGEX_6P_1 possédant des étiquettes poly-histidines et GST, respectivement (cases grises). Les effecteurs candidats ont été exprimés dans des souches de production d'*E. coli* BL21 (DE3), C41, C43, Origami, SoluBL21 et GroEL-GroES (pSBET) (cases jaunes). L'expression des protéines a été réalisée selon le protocole de production classique à 37°C et selon un protocole alternatif à 20°C avec de l'éthanol à 0,5%. Des essais de purification des productions de protéines recombinantes solubles ont été réalisés par purification sur colonne d'affinité aux protéines fusionnées à une étiquette GST (case bleue), avec des modifications successives du protocole. Les modifications du protocole sont indiquées par les cases blanches. Les étapes n'ayant pas abouti sont représentées par les cases rouge et en vert à l'inverse.

4. Travaux réalisés pour l'analyse du caractère d'avirulence

4.1. Contribution à la conception d'un protocole de transformation transitoire du peuplier

Une des approches pour déterminer le caractère d'avirulence du gène candidat *AvrMlp7* est d'exprimer ce dernier chez l'hôte peuplier et d'évaluer les réponses de défense associées telle qu'une mort cellulaire dans les zones où il est exprimé. Pour ce faire, il peut être envisagé de comparer les réactions de défenses dans le cultivar de peuplier 'Beaupré' qui exprime la résistance *RMlp7* et dans le cultivar 'Unal' (plein-frère de 'Beaupré'), qui exprime la résistance *RMlp4*, mais pas la résistance *RMlp7*. Ces réactions doivent également être comparées selon l'expression de la forme native et de la forme mutée de l'effecteur (cf. [Chapitre III partie 2](#)).

Jusqu'à présent, aucun protocole de transformation efficace n'a été mis en place pour transformer de manière stable ou transitoire les cultivars de peuplier interaméricains tel que le cultivar 'Beaupré' (Noël et al. 2002). Dans ce contexte, nous avons initié la conception d'un protocole de transformation transitoire par biolistique (bombardement de particules) de feuilles de peuplier. La technologie de transformation par biolistique est une technique utilisée dans la manipulation génétique des plantes, transformant les cellules végétales avec de l'ADN plasmidique. Comme la production de la protéine recombinante s'avère être un obstacle (cf. [Chapitre III partie 3](#)) et que nous ne disposons pas du gène *RMlp7* permettant d'engager l'interaction *RMlp7*-*AvrMlp7* chez le tabac, cette option semble être la plus pertinente pour le moment. Pour ce faire, des tirs préliminaires ont été effectués sur des feuilles de tabac et sur des feuilles de peuplier pour les deux cultivars mentionnés ci-dessus. Afin de mettre au point un protocole de transformation efficace et reproductible, nous avons mené les premiers tirs uniquement avec des plasmides codant la GFP libre, avec une localisation nucléo-cytosolique dans les cellules des plantes ([Figure 27A](#) ; [Figure 27B](#)). Comme la GFP libre cible des compartiments cellulaires plus larges que l'effecteur étudié (uniquement les chloroplastes ; cf. [Chapitre III partie 3](#)), il nous a semblé pertinent de l'utiliser dans un premier temps pour évaluer la capacité de transformation de nos protocoles.

Dans cette expérimentation, des particules de tungstène ont été recouvertes avec de l'ADN plasmidique et bombardées sur les tissus cibles avec une force/pression élevée par un dispositif biolistique. Les essais avec les particules d'or n'ont donné aucun résultat exploitable et ne seront pas présentés. Enfin, des imageries de cellules vivantes par microscopie confocale ont été réalisées trois jours après les tirs ([Figure 27C](#) ; pour plus de détails cf. [Chapitre III partie 6.6](#)). Au cours de ces essais, nous avons ajusté le protocole à partir de différentes variables telles que la pression d'hélium, la

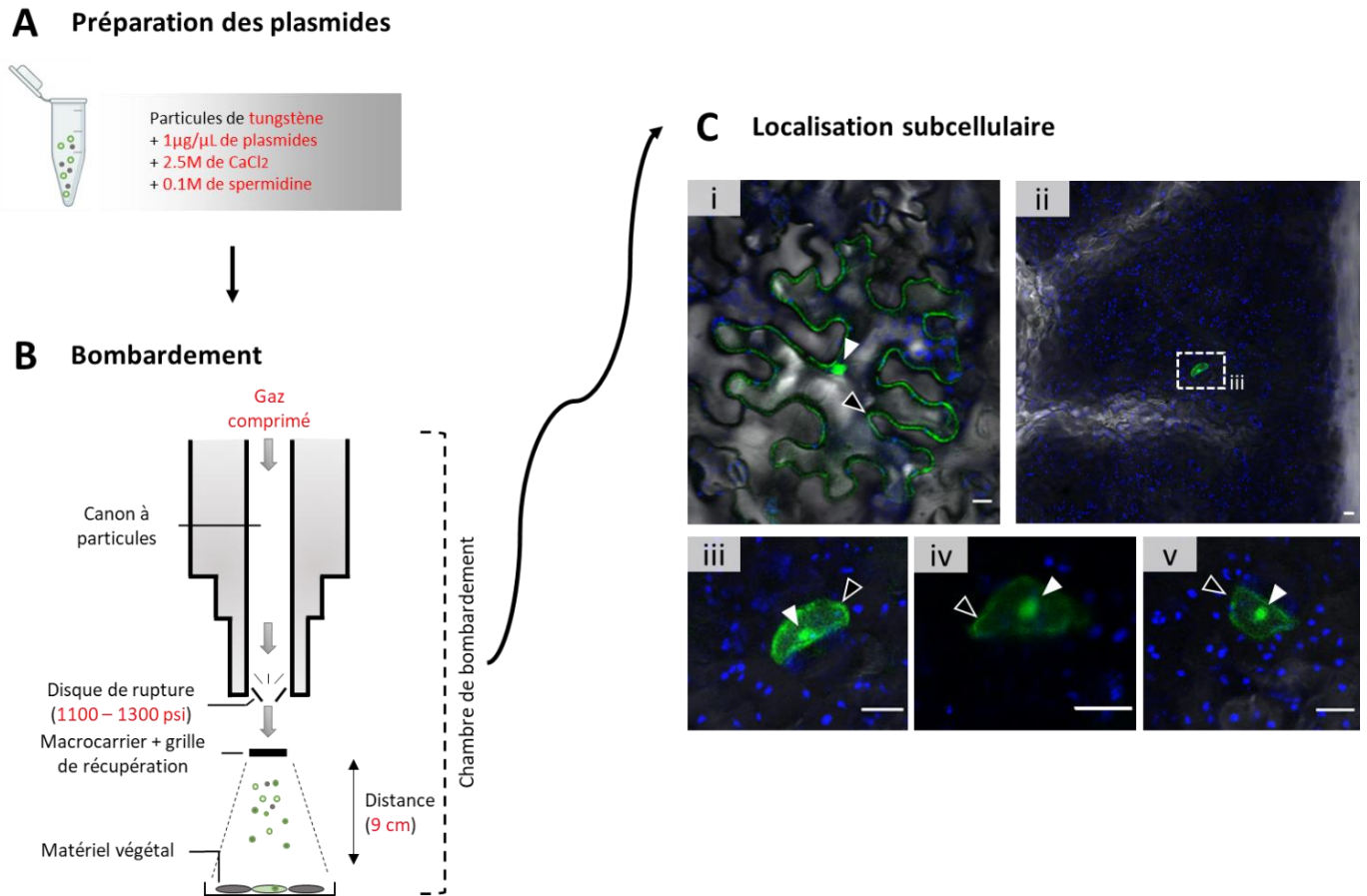


Figure 27. Vue d'ensemble du protocole de transformation par biolistique des feuilles de tabac, de peupliers cultivés et des cellules transformées associées.

(A et B) Représentation de l'approche de bombardement par biolistique. Le processus de transformation par biolistique consiste à projeter sur des tissus des microparticules de tungstène (un micromètre de diamètre) avec les plasmides d'intérêt (A), à l'aide d'un canon à particules. La force de propulsion est obtenue par mise sous pression d'un gaz dans la chambre de bombardement (le plus souvent de l'hélium). Les microparticules recouvertes d'ADN plasmidique et déposées sur un macroprojectile (macroporteur) sont ainsi propulsées lorsque le disque de rupture sous pression se brise. Une grille de récupération est utilisée pour arrêter les macro-projectiles tout en laissant passer les microparticules qui rentrent à très grande vitesse dans les cellules ciblées. Certaines de ces microparticules pénètrent dans les cellules et transforment ces dernières (B). En rouge sont indiqués les paramètres modifiables pour optimiser le protocole.

(C) Plusieurs exemples de cellules transformées *via* le bombardement de la GFP libre sont représentés dans cette figure pour le tabac (i) et le cultivar de peuplier 'Unal' (ii à v). Le bombardement a été effectué selon les paramètres indiqués en rouge (A et B). L'imagerie des cellules vivantes a été réalisée avec un microscope confocal à balayage laser trois jours après bombardement. La GFP libre s'accumule dans le noyau (flèches blanches) et le cytosol (flèches noires). Ces images représentent des images composites combinant la GFP libre (en vert) avec la chlorophylle (en bleu) et les images en champ clair. La GFP et la chlorophylle ont été excitées à 488 nm. Les signaux fluorescents de la GFP et de la chlorophylle ont été recueillis à 505-530 et 680-700 nm, respectivement. Barre d'échelle : 10 µm

concentration en ADN plasmidiques ou encore la distance de la cible (indiquées en rouge dans la [Figure 27](#)). Des signaux fluorescents informatifs ont été identifiés dans les cellules de tabac et dans des cellules du cultivar 'Unal' mais aucun signal n'a été observé chez le cultivar 'Beaupré'. Toutefois, le faible nombre de cellules porteuses d'un signal fluorescent suggère la nécessité d'optimiser le protocole avant de procéder à des essais avec des constructions pour le gène candidat *AvrMlp7*.

Pour déterminer la relation R-Avr, la réduction de l'expression de gènes fluorescents dans des lignées isogéniques de plantes, tels que la protéine de fluorescence verte (GFP) ou la β -glucuronidase (GUS), a été fréquemment utilisée pour quantifier la réponse de résistance comme une indication de la mort cellulaire ([Jia et al. 2000](#); [Qutob et al. 2002](#); [Allen et al. 2004](#); [Armstrong et al. 2005](#); [Rehmany et al. 2005](#); [Ridout et al. 2006](#); [Dou et al. 2008](#); [Kale et al. 2010](#); [Segovia et al. 2016](#)). En cas de contexte d'interaction, nous nous attendons à n'observer aucune fluorescence sur le cultivar résistant (ici, 'Beaupré') et une présence importante de signaux fluorescent sur le cultivar sensible (ici, 'Unal') pour les fusions exprimant le gène d'avirulence. A l'inverse, pour les fusions exprimant le gène de virulence, nous nous attendons à n'observer aucun signal de fluorescence quel que soit le cultivar. Dans le cas concret de nos expérimentations, une fois optimisées, si l'effecteur est bien le gène d'avirulence *AvrMlp7*, la co-expression transitoire de ce dernier avec le gène fluorescent mCherry dans les tissus du cultivar résistant devrait induire la mort cellulaire suite à la reconnaissance par le produit du gène *RMlp7* et mise en place d'une réponse immunitaire. Dans ce système, la mort cellulaire inhiberait alors l'expression de la mCherry.

En conclusion, ces résultats documentent la possibilité prometteuse de transformation cellulaire de feuilles de peuplier cultivé par une approche de biolistique. Toutefois, une optimisation du protocole est primordiale avant de pouvoir l'appliquer dans des expériences de criblage nécessitant la transformation répétable d'un grand nombre de cellules. Si ce projet aboutit, un frein non négligeable sera levé pour les analyses fonctionnelles d'effecteurs exprimés par *M. larici-populina* dans ce pathosystème.

4.2. Contribution à la mise en place d'un protocole d'induction de résistance chez le peuplier

En suivant la relation gène-pour-gène (Flor 1971), l'induction du système de défense de l'hôte est une conséquence générale médiée par l'expression des protéines d'avirulence des agents pathogènes. Cependant, peu d'exemples ont été documentés chez les Pucciniales dans leur hôte naturel ([Bakkeren and Szabo 2020](#)). Certaines études caractérisent la mise en place du système immunitaire des

Pucciniales en utilisant le système de sécrétion de type III des bactéries du genre *Pseudomonas* pour délivrer les effecteurs directement dans l'hôte naturel (Liu et al. 2016; Qi et al. 2016, 2018; Ramachandran et al. 2017). D'une autre manière, pour tester le caractère d'avirulence des gènes *AvrSr50* et *AvrSr35* codés par *P. graminis* f. sp. *tritici*, Chen et al. (2017) et Salcedo et al. (2017) ont respectivement eu recours au virus de l'orge BSMV (*Barley Stripe Mosaic Virus*) et à la fraction protéique soluble d'*E. coli* pour infiltrer les effecteurs dans les feuilles de blé. Ces infiltrations ont déclenché une mort cellulaire dans les lignées exprimant la protéine de résistance correspondante. Utiliser la fraction soluble d'*E. coli* est une approche très intéressante dans le cas où la purification de l'effecteur est un obstacle. Ainsi, afin d'évaluer la capacité de la protéine candidate AvrMlp7 à déclencher une mort cellulaire chez le peuplier, nous avons initié un protocole d'infiltration des feuilles de peuplier en utilisant la fraction soluble d'*E. coli* GroEL-GroES (pSBET) (cf. [Chapitre III partie 3](#)). Ce protocole repose sur l'infiltration différentielle des feuilles du cultivar sensible de peuplier 'Robusta' (*P. deltoides* × *P. nigra*) et du cultivar 'Beaupré' (porteur de la résistance *RMlp7*) (pour plus de détails cf. [Chapitre III partie 6.7](#)). Dans le cas où la protéine candidate possède un caractère d'avirulence, nous nous attendons à observer une mort cellulaire spécifiquement sur l'hôte résistant. A l'inverse, l'infiltration de la forme mutée de la protéine et donc potentiellement virulente ne devrait pas induire de mort cellulaire quel que soit le cultivar ([Figure 28](#)). Malheureusement, cette approche prometteuse ne s'est pas avérée concluante pour le moment (un seul essai). Nous pensons que la production de la protéine recombinante n'était pas suffisante, au vu des nombreux problèmes rencontrés pour la produire (cf. [Chapitre III partie 3](#)). En raison du potentiel non négligeable de cette approche pour déterminer le caractère d'avirulence chez *M. larici-populina*, il sera nécessaire d'engager de nouveaux efforts pour l'optimiser.

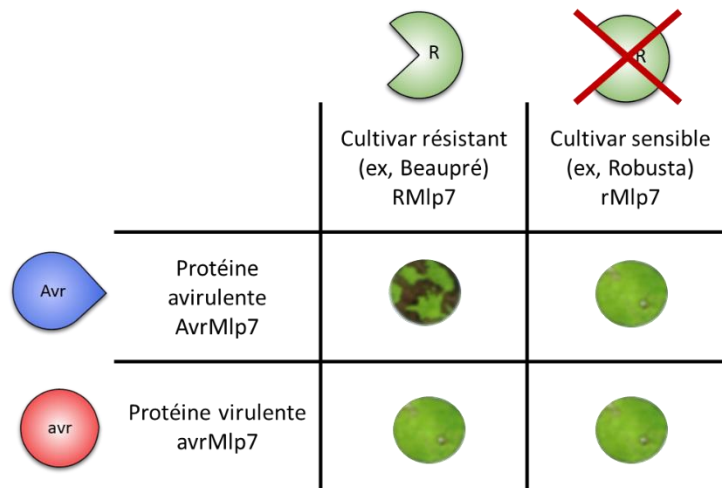


Figure 28. Hypothèses d'interactions moléculaires entre le peuplier et *Melampsora larici-populina* dans le contexte de la résistante RMIp7 et de l'avirulence AvrMlp7.

Représentation schématique d'une approche d'infiltration sur un cultivar porteur de la résistance RMIp7 (exemple, le cultivar 'Beaupré') et un cultivar sensible rMIp7 (exemple, le cultivar 'Robusta') de la fraction protéique soluble d'*Escherichia coli* GroEL-GroES (pSBET) exprimant la protéine d'avirulence candidate AvrMlp7 et sa forme mutée potentiellement virulente avrMlp7. Dans le cas où la protéine candidate est la protéine d'avirulence AvrMlp7, une reconnaissance spécifique par la protéine de résistance RMIp7 devrait entraîner une mort cellulaire. A l'inverse, la forme mutée ne devrait pas être reconnue par RMIp7, n'induisant pas de mort cellulaire. Cette hypothèse implique que la protéine infiltrée pénètre bien dans les cellules de peuplier.

5. Discussion

Grâce au système hétérologue *N. benthamiana*, nous avons mis en évidence une accumulation chloroplastique de la protéine candidate native AvrMlp7 et de sa forme mutée potentiellement virulente avrMlp7 (Figure 23). Cette localisation est dépendante de l'extrémité N-terminale de la protéine (Figure 24), suggérant qu'elle imite les peptides de transit chloroplastique de l'hôte pour exploiter la machinerie de la cellule végétale. Ce type de domaine a déjà été mis en évidence chez les protéines CTP1, CTP2 et CTP3 (Petre et al. 2016a), exprimées par *M. larici-populina*. De plus, l'existence d'un peptide de transit suggère la présence en amont d'un motif de sécrétion (encore non caractérisé), comme il est généralement démontré chez les effecteurs d'oomycètes et de champignons phytopathogènes (Petre and Kamoun 2014). La capacité du candidat AvrMlp7 à s'accumuler dans les chloroplastes suggère également qu'il a une fonction à l'intérieur de ce compartiment cellulaire. Les chloroplastes sont centraux dans l'apport en énergie pour la synthèse des sucres et pour l'immunité de la plante en générant des signaux de défenses (Kretschmer et al. 2020; de Torres Zabala et al. 2015). Par exemple, il a été démontré chez *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* que l'effecteur Pst_12806 perturbe le taux de transport des électrons, la photosynthèse et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dérivés du chloroplaste (Xu et al. 2019). Malheureusement, nous ne sommes pas en mesure actuellement de prédire une fonction putative à cet effecteur sur la base, par exemple, d'une similarité de séquence ou structurale avec des protéines chloroplastiques préalablement caractérisées. Les effecteurs sont souvent enrichis en résidus cystéines dans leur composition et ces derniers sont souvent impliqués dans la formation de ponts disulfures intramoléculaires ou extra-moléculaires qui contribueraient à la stabilité des protéines (Saunders et al. 2012). Par exemple, les quatre liaisons disulfures de l'effecteur Avr2, codé par *Cladosporium fulvum*, sont indispensables pour sa fonction inhibitrice contre la cystéine protéase apoplastique Rcr3 de la tomate (Rooney 2005). Il serait donc intéressant d'étudier l'implication des sept résidus cystéines chez l'effecteur candidat AvrMlp7, par exemple, sur la capacité de translocation de ce dernier dans les chloroplastes.

La compréhension de la fonction des protéines est dépendante des techniques biochimiques, structurales et biophysiques qui sondent les mécanismes moléculaires à l'origine de leur fonction (Wirthmueller et al. 2013). Cependant, ces approches reposent sur la production et la purification de protéines pures et fonctionnelles. Elles reposent également sur l'utilisation de systèmes d'expression de protéines recombinantes hétérologues tel que *E. coli*. L'expression recombinante chez ces procaryotes présente de nombreux avantages comme des réductions de coûts, de temps et une augmentation de rendement (Terpe 2006). Néanmoins, la production en grande quantité de protéines riches en cystéines reste un processus limitant. En effet, la formation des liaisons disulfures,

permettant de stabiliser la structures des protéines (Stergiopoulos and De Wit 2009; Saunders et al. 2012), n'est pas favorisée par le potentiel redox cytoplasmique d'*E. coli*. De plus, elles sont souvent mal repliées une fois exprimées dans le cytosol d'*E. coli* (Lobstein et al. 2012), ce qui conduit à l'insolubilité des protéines. Ainsi, le processus de production d'une protéine recombinante riche en cystéines présente plusieurs étapes successives, toutes autant limitantes les unes que les autres (Zhang et al. 2017). Ceci conduit à des goulots d'étranglement dans l'étude des effecteurs des Pucciniales, dont *M. larici-populina* (de Guillen et al. 2019). À la vue de ces circonstances et des problèmes rencontrés lors de la production de la protéine candidate *AvrMlp7*, plusieurs recommandations peuvent être formulées afin de lever ces barrières techniques. Premièrement, il y a une nécessité absolue à améliorer la solubilité des protéines recombinantes exprimées. Tout récemment, des chercheurs ont développé des vecteurs pOPIN compatibles avec la méthode de clonage Golden Gate (Engler et al. 2014), appelés pOPIN-GG (Bentham et al. 2021). Ce vecteur modifié offre la possibilité d'incorporer de nouvelles étiquettes de purification et de solubilité dans le répertoire déjà disponible, sans aucun coût pour l'efficacité d'expression du système. Ces nouveaux vecteurs représentent une opportunité pour améliorer la solubilité et donc la production des protéines recombinantes riches en cystéines. Deuxièmement, certaines alternatives sont employées pour produire les protéines recombinantes à partir des cellules d'eucaryotes. Par exemple, les protéines d'avirulence *AvrLm4-7* de *Leptosphaeria maculans* et *Avr2* comme *Avr4* de *C. fulvum* ont été produites à partir de cellules de levure (Blondeau et al. 2015; Rooney 2005). D'autres auteurs proposent également d'utiliser le système d'agro-infiltration dans *N. benthamiana* pour purifier la protéine d'intérêt qui est biologiquement active dans les tissus de la plante (Dagvadorj and Solomon 2021).

Dans l'ensemble, les analyses fonctionnelles et les limites, que nous avons évoquées au cours de ce chapitre, reflètent les obstacles rencontrés par la communauté de recherche qui cherche à décrypter les mécanismes moléculaires chez les Pucciniales. Ces points seront donc discutés dans la suite de ce manuscrit.

6. Matériels et méthodes

6.1. Matériel biologique

Les urédiniospores de *Melampsora larici-populina* (isolat 98AG31, isolat de référence pour le génome ; Duplessis et al. 2011a) ont été produites comme décrit précédemment (Rinaldi et al. 2007) et conservées à -80°C jusqu'à utilisation. La culture des hybrides de peuplier 'Beaupré' (*Populus trichocarpa* x *P. deltoides*), 'Unal' (*P. trichocarpa* x *P. deltoides*), 'Robusta' (*P. deltoides* x *P. nigra*) et l'inoculation de ces derniers avec les urédiniospores de *M. larici-populina* ont été effectuées comme décrit précédemment (Rinaldi et al. 2007). Les souches d'*E. coli* pour le clonage (souche thermo-compétente DH5α) et pour la production de protéines (souches électro-compétentes BL21 (DE3), C41, C43, SoluBL21, Origami et GroEL-GroES (pSBET)) ainsi que *Agrobacterium tumefaciens* (souche électro-compétente GV3101 (pMP90)) ont été conservées à -80°C et cultivées en milieu LB à 37°C et 28°C, respectivement. Les plants de *Nicotiana benthamiana* ont été cultivés dans des armoires de culture à 22°C, dans des conditions de jour/nuit de 16/8h.

6.2. Construction des plasmides

Les clonages moléculaires et les manipulations d'ADN recombinants ont été réalisés selon les instructions des fabricants des kits et produits utilisés. L'ensemble des amorces, des séquences et des constructions citées ci-dessous sont indiqués dans le [Tableau 2](#) et [Tableau 3](#).

Pour générer la séquence codante complète AvrMlp7₁₋₂₁₉ et clivée pour les 20 premiers acides aminés AvrMlp7₂₀₋₂₁₉ de la protéine candidate AvrMlp7 de *M. larici-populina* (ID du JGI : 1427900), une amplification par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) avec la polymérase Iproof (Biorad) a été réalisée à partir d'ADNc de feuilles de peuplier 'Robusta' infectées par *M. larici-populina* (isolat 98AG31). Ces derniers ont été produits comme décrit précédemment (Duplessis et al. 2011a; Hacquard et al. 2011b). Les amorces utilisées pour les amplifications ont permis d'intégrer des sites de restriction enzymatique : *BbsI* pour les clonages de type Golden Gate, *NdeI/XhoI* pour les clonages PCR dans le vecteur pET26b et *BamHI/NcoI* pour les clonages PCR dans le vecteur pGEX_6P_1, en 5' et 3' respectivement.

Pour générer des protéines fusionnées à la protéine fluorescente mCherry, les amplifications compatibles *BbsI* AATG/ggTTCG ont été clonées dans un vecteur Golden Gate de niveau 0 pAGM1287 par digestion/ligation comme décrit précédemment (Petre et al. 2015, 2017). Les séquences ont été

vérifiées systématiquement par séquençage Sanger (GENEWIZ, Leipzig, Allemagne). Les fragments d'ADN ont ensuite été combinés dans un vecteur binaire Golden Gate de niveau 1 pICH86988 afin de créer une unité d'expression « promoteur p35S : séquence codante de l'effecteur : séquence codante de la protéine fluorescente mCherry : terminateur T-OCS » (*AvrMlp7*₁₋₂₁₉-mCherry et *AvrMlp7*₂₀₋₂₁₉-mCherry) et pICH47742 afin de créer une unité d'expression « promoteur p35S : séquence codante de la protéine fluorescente mCherry : séquence codante de l'effecteur : terminateur T-OCS » (mCherry-*AvrMlp7*₁₋₂₁₉ et mCherry-*AvrMlp7*₂₀₋₂₁₉).

Pour générer les vecteurs d'expression afin de produire la protéine recombinante, les fragments d'ADN compatibles avec les sites de restriction *NdeI/XhoI* et *BamHI/NcoI* ont été clonés par digestion puis ligation avec la T4 DNA ligase (Thermofisher) en amont de l'étiquette poly-histidine dans le vecteur pET26b et en aval de l'étiquette GST dans le vecteur pGEX_6P_1, respectivement.

Pour générer spécifiquement des protéines mutantes au niveau du SNP_2233369 c'est-à-dire une substitution de l'acide aminé en position 80 (mutation d'une glycine en une serine), une mutagenèse dirigée a été réalisée en utilisant deux amorces mutagènes complémentaires, comme décrit précédemment (Nøhr and Kristiansen 2003). Cette approche a été effectuée sur les séquences clonées dans les vecteurs pAGM1287, pET26b et pGEX_6P_1. Suite à cette mutation, les clonages Golden Gate ont été réalisés comme décrit ci-dessus jusqu'au niveau 1 pour produire les constructions *avrMlp7*₁₋₂₁₉-mCherry, *avrMlp7*₂₀₋₂₁₉-mCherry, mCherry-*avrMlp7*₁₋₂₁₉ et mCherry-*avrMlp7*₂₀₋₂₁₉.

6.3. Microscopie confocale à balayage laser

Pour déterminer la localisation subcellulaire *in planta* de la protéine candidate *AvrMlp7* fusionnée à l'étiquette fluorescente mCherry, nous avons utilisé la microscopie confocale à balayage laser pour observer les protéines de fusion par fluorescence dans les feuilles de *N. benthamiana* après avoir exprimé transitoirement les protéines par agro-infiltration, comme décrit précédemment (Petre et al., 2017). Nous avons infiltré chaque colonie de bactéries transformées sur des plants âgés de quatre à six semaines et répété l'expérience d'une à trois fois à des jours différents avec différents lots de plants. Les observations indépendantes ont fourni des résultats similaires pour chaque construction. Nous avons collecté les feuilles trois jours après l'agro-infiltration et nous avons immédiatement réalisé l'imagerie de cellules vivantes avec un microscope confocal à balayage laser Zeiss LSM 780 (Zeiss International), en utilisant les objectifs à 20 et 40x. Nous avons utilisé les paramètres suivants pour l'excitation/la collecte de la fluorescence : GFP (488/505-525 nm), chlorophylle (488/680-700 nm) et mCherry (561/580-625 nm). L'analyse des images a été réalisée avec Fiji (<http://fiji.sc/Fiji>).

Pour quantifier l'intensité de fluorescence des signaux sur des lignes tracées manuellement, l'outil « Measure » de Fiji a été utilisé.

6.4. Extraction des protéines, immunoprécipitation et Western Blot

L'extraction des protéines totales à partir des feuilles de tabac précédemment agro-infiltrées, le gel SDS-PAGE et le Western Blot ont été réalisés comme décrit précédemment (Petre et al. 2017) avec des anticorps anti-mCherry 'RFP antibody [6G6]' (Chromotek).

6.5. Expression hétérologue et purification

Pour tester la solubilité des protéines recombinantes, nous avons utilisé les séquences clonées dans les vecteurs pET26b et pGEX_6P_1. Nous avons ensuite transformé les souches de production *E. coli* BL21 (DE3), C41, C43, SoluBL21, Origami et GroEL-GroES (pSBET) avec ces derniers. Pour l'expression dans les conditions de culture classique, la quantité de cultures bactériennes a été séquentiellement augmentée jusqu'à l'obtention de 5 mL de culture dans du milieu LB à 37°C, supplémenté avec les antibiotiques adéquats à 50 µg.mL⁻¹ (kanamycine pour pET26b, ampicilline pour pGEX_6P_1 et streptomycine pour pSBET). L'expression des protéines a été induite en phase exponentielle en ajoutant 100 µM d'isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) pendant 4 h à 37°C. Pour l'expression dans des conditions à basse température, les cultures bactériennes de 5 mL en phase exponentielle ont été placées pendant 4 h à 4°C après ajout de 0,5 % d'éthanol à 100 %. L'expression des protéines a ensuite été induite en ajoutant 100 µM d'IPTG puis les cultures ont été placées à 20°C pendant 18h. Enfin, les cultures ont été centrifugées pendant 5 min à 13400 rpm. Les culots cellulaires ont été re-suspendus dans 500 µL dans un tampon TE-NaCl (50 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 1 mM EDTA ; 100 mM NaCl) et conservées à -20°C. Les cellules ont été lysées par sonication et les fractions solubles et insolubles ont été séparées par centrifugation pendant 5 min à 13400 rpm. La solubilité des protéines recombinantes exprimées a été visualisée *via* un gel SDS-PAGE 15%, après avoir incubé les fractions dans du Laemmli (avec βMSH) pendant 10 min à 95°C pour linéariser et dénaturer les protéines.

Pour purifier les protéines recombinantes solubles exprimées à partir du vecteur pGEX_6P_1 et la souche *E. coli* GroEL-GroES (pSBET), l'amplification des cultures bactériennes et l'expression des protéines recombinantes ont été réalisées *via* une amplification successive jusqu'à 2,4 L dans du milieu LB avec les antibiotiques adéquats et selon les conditions à basse température décrites ci-dessus. Les cultures ont été centrifugées pendant 15 min à 5000 rpm à 4°C, re-suspendues dans 20 mL du tampon

Tableau 2. Amorces utilisées dans cette étude.

Identifiant de l'insert	Objectif	Enzyme de restriction ciblée	Amorce forward*	Amorce reverse*
AvrMlp7 ₁₋₂₁₉ / avrMlp7 ₁₋₂₁₉	Clonage dans le plasmide pAGM1287	<i>BbsI</i>	CACCGAAGACACAATGAGCCGGTGGAGCG	CTACGAAGACGGCGAACCGTCAACTCTGTGAGCC
AvrMlp7 ₂₀₋₂₁₉ / avrMlp7 ₂₀₋₂₁₉	Clonage dans le plasmide pAGM1287	<i>BbsI</i>	CACCGAAGACACAATGTCAAGCAATGGGAAGG	CTACGAAGACGGCGAACCGTCAACTCTGTGAGCC
AvrMlp7 ₁₋₂₁₉ / avrMlp7 ₁₋₂₁₉	Clonage dans le plasmide pET26b	<i>NdeI/XhoI</i>	ggCACCCATATGAGCCGGTGGAGCG	ggCACCCCTCGAGGTCAACTCTGTGAGCC
AvrMlp7 ₂₀₋₂₁₉ / avrMlp7 ₂₀₋₂₁₉	Clonage dans le plasmide pET26b	<i>NdeI/XhoI</i>	ggCACCCATATGTCAAGCAATGGGAAGG	ggCACCCCTCGAGGTCAACTCTGTGAGCC
AvrMlp7 ₁₋₂₁₉ / avrMlp7 ₁₋₂₁₉	Clonage dans le plasmide pGEX_6P_1	<i>BamHI/NcoI</i>	ggCACCGGATCCATGAGCCGGTGGAGCG	ggCACCCCATGGTTAGTCAACTCTGTGAGCC
AvrMlp7 ₂₀₋₂₁₉ / avrMlp7 ₂₀₋₂₁₉	Clonage dans le plasmide pGEX_6P_1	<i>BamHI/NcoI</i>	ggCACCGGATCCTCAAGCAATGGGAAGG	ggCACCCCATGGTTAGTCAACTCTGTGAGCC
avrMlp7 ₁₋₂₁₉ / avrMlp7 ₂₀₋₂₁₉	Mutagenèse dirigée G81S	-	CGCACGCAGACACACAGTGGCACCAGCCG	CGGCTGGTGCCACTGTGTGTCTGCGTGCG

* Les sites de restriction enzymatique sont soulignés.

Tableau 3. Séquences codantes des protéines fusionnées utilisées dans cette étude.

Nom de la construction	Stratégie de clonage	Plasmide	Modules utilisés : nom (référence)*	Séquence protéique de la protéine fusionnée (la séquence du linker est soulignée et la mutation protéique induite par la mutagenèse dirigée est représentée en rouge)
AvrMlp71-219-mCherry / avrMlp71-219-mCherry	Golden Gate	pICH86988	mCherry (pICSL50004)	MSRWSDGAISSRHAAGFDSSNGKVVLLGGFQALHQVPPSAEHASSRNPHACDRRDVGGAVNLPRGCSLNV RTVSITRTQTH[S/G]GTSRSQSLLEHVPIKFTRRRHRRPHASSPGTVSVQAPCAALEALQQVIHTLDDPFQKT TKERRPTTATLSLIKILSLPSPSPFIYKGGRAVFFFPSPCLSGCVCVCGGNEFRAQAHFGSHSCTLPHRAKPIPWKL AHRVDMVSKGEEDNMAIIEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDI LSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFP DGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDI TSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYK
AvrMlp720-219-mCherry / avrMlp720-219-mCherry	Golden Gate	pICH86988	mCherry (pICSL50004)	MSSNGKVVLLGGFQALHQVPPSAEHASSRNPHACDRRDVGGAVNLPRGCSLNVRTVSITRTQTH[S/G]GTS RSQSLLEHVPIKFTRRRHRRPHASSPGTVSVQAPCAALEALQQVIHTLDDPFQKTTKERRPTTATLSLIKILSLPS PSPFIYKGGRAVFFFPSPCLSGCVCVCGGNEFRAQAHFGSHSCTLPHRAKPIPWKL AHRVDMVSKGEEDNMAI IEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADI PDYLLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASSE RMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGR HSTGGMDELYK
mCherry-AvrMlp71-219 / mCherry-avrMlp71-219	Golden Gate	pICH47742	p35S (pICSL13002); mCherry (pICSL30003); 3xFLAG (pICSL50007); T-Ocs (pICH41432)	MVSKGEEDNMAIIEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQF MYGSKAYVKHPADIPDYLLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPV MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHN EDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYKNAAIRMSRWSDGAISSRHAAGFDSSNGKVVLLGGFQALHQVPPSA EHASSRNPHACDRRDVGGAVNLPRGCSLNVRTVSITRTQTH[S/G]GTSRSQSLLEHVPIKFTRRRHRRPHAS SPGTVSVQAPCAALEALQQVIHTLDDPFQKTTKERRPTTATLSLIKILSLPSPSPFIYKGGRAVFFFPSPCLSGCV CGGNEFRAQAHFGSHSCTLPHRAKPIPWKL AHRVD
mCherry-AvrMlp720-219 / mCherry-avrMlp720-219	Golden Gate	pICH47742	p35S (pICSL13002); mCherry (pICSL30003); 3xFLAG	MVSKGEEDNMAIIEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQF MYGSKAYVKHPADIPDYLLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPV MQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHN EDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYKNAAIRMSSNGKVVLLGGFQALHQVPPSAEHASSRNPHACDRRDV GAVNLPRGCSLNVRTVSITRTQTH[S/G]GTSRSQSLLEHVPIKFTRRRHRRPHASSPGTVSVQAPCAALEALQ

			(pICSL50007); T-Ocs (pICH41432)	QVIHTLDDPFQKTTKERRPTTATLSLIKILSLPSPSPFIYKGGRAVFFPFSPCLSGCVCGGNEFRAQAHFGSHSCTLP HRAKPIPWKLAHRVD
AvrMlp71-219 / avrMlp71-219	PCR	pET26b	-	MSRWSDGAISSRHAAGFDSSNGKVVVGGFQALHQVPPSAEHASSRNPHACDRRDVGGAVNLPRGCSLNV RTVSITRTQTH[S/G]GTSRSQSLLEHVPIKFTRRRHRPHASSPGTVSVQAPCAALEALQQVIHTLDDPFQKT TKERRPTTATLSLIKILSLPSPSPFIYKGGRAVFFPFSPCLSGCVCGGNEFRAQAHFGSHSCTLP HRAKPIPWKLAHRVDLEHHHHHH
AvrMlp720-219 / avrMlp720-219	PCR	pET26b	-	MSSNGKVVVGGFQALHQVPPSAEHASSRNPHACDRRDVGGAVNLPRGCSLNVRTVSITRTQTH[S/G]GTS RSQSLLEHVPIKFTRRRHRPHASSPGTVSVQAPCAALEALQQVIHTLDDPFQKTTKERRPTTATLSLIKILSLP SPPFIYKGGRAVFFPFSPCLSGCVCGGNEFRAQAHFGSHSCTLP HRAKPIPWKLAHRVDLEHHHHHH
GST-AvrMlp71-219 / GST-avrMlp71-219	PCR	pGEX_6P_1	-	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEELHYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSM AIIRY IADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYS KDFETLKVD FLSKLP EMLMKFEDRLCHKTYLNGD HVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIE AIPQIDKYLKSSKYIAWPLQG WQATFGGGDHP PKSDLEVLFGPLGSSMSRWSDGAISSRHAAGFDSSNGKVVVGGFQALHQVPPSAEHASSRNPHACDRRDV GGAVNLPRGCSLNVRTVSITRTQTH[S/G]GTSRSQSLLEHVPIKFTRRRHRPHASSPGTVSVQAPCAALEAL QQVIHTLDDPFQKTTKERRPTTATLSLIKILSLPSPSPFIYKGGRAVFFPFSPCLSGCVCGGNEFRAQAHFGSHS CTLP HRAKPIPWKLAHRVD
GST-AvrMlp720-219 / GST-avrMlp720-219	PCR	pGEX_6P_1	-	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEELHYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSM AIIRY IADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYS KDFETLKVD FLSKLP EMLMKFEDRLCHKTYLNGD HVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIE AIPQIDKYLKSSKYIAWPLQG WQATFGGGDHP PKSDLEVLFGPLGSSMSRWSDGAISSRHAAGFDSSNGKVVVGGFQALHQVPPSAEHASSRNPHACDRRDVGGAVNLPRGCSLNV RTVSITRTQTH[S/G]GTSRSQSLLEHVPIKFTRRRHRPHASSPGTVSVQAPCAALEALQQVIHTLDDPFQKTTKERR PTTATLSLIKILSLPSPSPFIYKGGRAVFFPFSPCLSGCVCGGNEFRAQAHFGSHSCTLP HRAKPIPWKLAHRVD

* Nom des modules d'après Engler et al. 2014.

TE-NaCl et conservées à -20°C. Les cellules ont été lysées par sonication et les fractions solubles et insolubles ont été séparées par centrifugation pendant 30 min à 18 000 rpm à 4°C. Les fractions solubles contenant les protéines recombinantes possédant une étiquette GST ont été transférées dans une colonne d'affinité Glutathione Sepharose® 4B (Sigma). Nous avons ensuite procédé à des étapes successives de 'lavage' avec le tampon TE-NaCl, de sorte à éliminer des protéines non retenues ou fixées de façon aspécifique sur la colonne. Les protéines ont été éluées en utilisant 20 mL d'un second tampon TE-NaCl (50 mM Tris-HCl pH 7,0 ; 150 mM NaCl ; 1 mM EDTA), supplémenté avec 400 µL de GSH à 500 mM. Après purification, nous avons dosé la concentration protéique par spectrophotométrie, en utilisant le coefficient d'extinction molaire des protéines de fusion à 280 nm. La concentration a été ajustée à 10 µg puis une fraction a été placée dans du Laemmli (avec βMSH) pendant 10 min à 95°C. Enfin, un gel SDS-PAGE 15% a été réalisé pour visualiser la qualité des purifications. Plusieurs ajustements successifs ont été effectués pour optimiser la purification : ajout de 0,1 M de DTT dans le tampon TE-NaCl (50 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 1 mM EDTA ; 100 mM NaCl) pour réduire les protéines ; ajout de 0,2 % de polyéthylèneimine (PEI) 25 % pour précipiter l'ADN dans le tampon cité ci-dessus avant sonication ; et ajout dans tous les tampons de 1 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) et de cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Sigma), selon les recommandations du fabricant, pour inhiber les protéases.

6.6. Biolistique

Pour effectuer la transformation par bombardement de particules, les tirs ont été effectués avec le système standard *Particle Delivery System* PDS-1000/He (BioRad). Différents paramètres tels que la concentration plasmidique, le type de microparticules, la distance à la cible et la pression d'hélium ont été modifiés afin d'optimiser l'insertion d'ADN dans les cellules des tissus visés. Les paramètres décrits ci-dessous sont ceux utilisés pour obtenir les résultats en [Figure 27](#). Les microparticules de tungstène (1 µm) conservées dans du glycérol 50% ont été recouvertes avec 1 µg/µL d'ADN plasmidique, auquel ont été ajoutés 2,5 M de CaCl₂ et 0,1 M de spermidine. Les préparations ont été vortexées vigoureusement, placées dans la glace 15 min puis culottées 15 sec à 2000 rpm. Deux étapes successives de lavage ont été réalisées comme suit : ajout de 500 µL d'éthanol 100% pré-refroidi et centrifugation 15 sec à 2000 rpm. Enfin, les préparations ont été re-suspendues dans 10 µL d'éthanol. Un microlitre de chaque préparation microparticules/ADN a été chargé sur les macrocarriers (BioRad), préalablement stérilisés. Les tissus foliaires de tabac et des cultivars 'Beaupré' et 'Unal' de peuplier ont été placés dans une boîte de Petri à 9 cm de distance. Les bombardements ont été effectués avec un vide dans la chambre de bombardement à 26 Hg et avec une destruction du disque de rupture (BioRad)

entre 1 100 and 1 300 PSI. Entre chaque bombardement, le matériel a été successivement stérilisé dans de l'éthanol 100%. Les transformations cellulaires ont été visualisées trois jours après bombardement *via* l'imagerie de cellules vivantes avec un microscope confocal à balayage laser Zeiss LSM 780 (Zeiss International), en utilisant les objectifs à 20 et 40×. Nous avons utilisé les paramètres suivants pour l'excitation et la collecte de la fluorescence de la GFP : 488 nm et 505-525 nm, respectivement. L'analyse des images a été réalisée avec Fiji (<http://fiji.sc/Fiji>).

6.7. Infiltration des tissus foliaires de peuplier

Pour effectuer les infiltrations dans les feuilles de peuplier, la fraction soluble contenant la protéine candidate *AvrMlp7* a été récoltée à l'issue de l'expression protéique, à partir du vecteur pGEX_6P_1 et la souche *E. coli* GroEL-GroES (pSBET), à basse température et selon les conditions décrites ci-dessus. Des disques foliaires du cultivar de peuplier 'Beaupré' porteur de la résistance *RMlp7* et du cultivar 'Unal' sensible ont été récoltés comme décrit précédemment (Maupetit et al. 2018). Les témoins suivants ont été effectués : infiltration avec du TE pH 8,0 ou de l'eau ultrapure et non-infiltration. Les différentes infiltrations ont été réalisées avec une seringue de 5 mL et reproduites trois fois sur des feuilles indépendantes. Les disques infiltrés ont été placés dans une chambre de culture et maintenus à 22°C avec une photopériode de 16 h. A l'issue de cette expérimentation, nous avons contrôlé l'apparition de symptômes de mort cellulaire chaque jour, sur une période d'une semaine.

Chapitre IV – Analyse comparative de facteurs de transcription orchestrant le cycle de vie des Pucciniales

1. Contexte

Depuis le premier séquençage d'un génome de pathogène fongique en 2003 (*Neurospora crassa* ; Galagan et al. 2003), l'amélioration des techniques de séquençage, la diminution de leurs coûts et l'ouverture d'appels à projets internationaux (tel que le projet « 1000 génomes fongiques » par le JGI ; <https://jgi.doe.gov/>) ont permis un essor très rapide de la génomique fongique. Ces efforts collectifs ont permis de générer plus de 2000 génomes disponibles sur le site MycoCosm du JGI (septembre 2021), dont les génomes de 22 espèces de Pucciniales (13 publiés). En parallèle, des outils d'annotation ont été développés pour la communauté sur le MycoCosm, permettant d'explorer spécifiquement des classes de gènes données telles que les cazymes, les transporteurs ou plus récemment les facteurs de transcription (TF). Fort de ces nouvelles ressources d'annotation semi-expertisée, nous avons décidé d'étudier l'ensemble des TF chez les espèces de l'ordre des Pucciniales et de les comparer à d'autres génomes fongiques. En effet, les TF sont des éléments clés des cellules eucaryotes orchestrant la régulation de différentes voies d'expression en réponse à un ensemble de stimuli (Weirauch and Hughes 2011; Charoensawan et al. 2010). La disponibilité de cette ressource nous semblait une bonne opportunité pour décortiquer les processus fins de régulation des gènes chez les Pucciniales qui présentent des cycles de vie particulièrement complexes (Duplessis et al. 2021).

Afin d'avoir une vision globale du répertoire de TF (TFome) chez les Pucciniales en comparaison avec les autres champignons, nous avons extrait l'ensemble des TF annotés disponibles pour les génomes publiés disponibles pour les phyla des Ascomycota et Basidiomycota. L'analyse comparative de ces répertoires nous a permis de mettre en évidence une contraction globale du TFome spécifiquement chez les Pucciniales ainsi que des histoires évolutives contrastées pour certaines familles de TF. Afin d'étudier l'expression des TF au cours du cycle de vie des Pucciniales, nous avons utilisé les données de transcriptomique générées tout au long du cycle de *M. larici-populina* au sein du laboratoire (Duplessis et al. 2011b; Hacquard et al. 2013; Lorrain et al. 2018a). Avant de pouvoir exploiter ces données, un effort de comparaison à la dernière version en date du génome de *M. larici-populina* puis de normalisation entre les données d'expression générées par oligoarrays (des urédiniospores jusqu'aux téliés ; Duplessis et al. 2011b; Hacquard et al. 2013) ou par RNAseq (des basides jusqu'aux écidies ; Lorrain et al. 2018a) a été réalisé. Cette analyse, pour laquelle j'ai contribué en tant que co-auteur, est présentée dans les résultats complémentaires de ce chapitre. Elle s'intitule « **A comprehensive collection of transcriptome data to support life cycle transcriptomics analysis of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*** » et elle est disponible sous la forme d'un bref rapport de données de recherche sur le site BioRxiv (<https://www.BioRxiv.org/content/10.1101/2021.07.25.453710v1>).

A partir de ces données transcriptomiques, nous avons mis en évidence des TF, voire des familles de TF, spécifiquement associés à des stades du cycle de vie de l'agent pathogène. La famille des protéines cold-shock a notamment présenté plusieurs intérêts. Cette famille est en expansion chez les Pucciniales, conservée phylogénétiquement chez ces derniers et elle présente les niveaux d'expression les plus importants parmi les TF de *M. larici-populina*. L'expression des trois membres de cette famille est spécifiquement associée à la levée de dormance des télies et à la formation des basides. Pour finir, nous avons validé, par expression hétérologue en levure, la capacité des protéines cold-shock de *M. larici-populina* à améliorer la croissance cellulaire après exposition à des stress au froid.

Tous ces résultats sont présentés dans ce chapitre sous la forme d'un article de recherche intitulé « **Expert annotation and life-cycle transcriptomics of transcription factors in rust fungi (Pucciniales) highlight the role of cold shock proteins in dormancy exit** », pour lequel je suis première auteure. La version de l'article affichée ici est disponible sur le site BioRxiv (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.10.19.465044v1>) et celui-ci a été soumis à la revue *Fungal Genetics and Biology* où il est actuellement considéré par des pairs.

La totalité de ce projet a été réalisé pendant les restrictions liées au COVID-19 entourant le second confinement avec notamment le co-encadrement des stages de M1 de Mmes Carla Blot et Pamela Guerillot (Master Microbiologie de l'Université de Lorraine ; co-encadrant, Sébastien Duplessis).

2. Article n°3 – Expert annotation and life-cycle transcriptomics of transcription factors in rust fungi (Pucciniales) highlight the role of cold shock proteins in dormancy exit

Clémentine Louet, Carla Blot, Ekaterina Shelest, Pamela Guerillot, Jérémy Pétrowski, Pascal Frey, Sébastien Duplessis

Article de recherche soumis dans la revue *Fungal Genetics and Biology* et en libre accès depuis le 19 octobre 2021 sur le serveur BioRxiv (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.10.19.465044v1>) pour la version affichée ici.

Fungal Genetics and Biology
Expert annotation and life-cycle transcriptomics of transcription factors in rust fungi (Pucciniales) highlight the role of cold shock proteins in dormancy exit
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	FGB-D-21-00122
Article Type:	Full Length Article
Keywords:	Melampsora larici-populina; life cycle; basidia; telia; cold stress
Corresponding Author:	Sebastien Duplessis INRAE Champenoux, FRANCE
First Author:	Clémentine Louet
Order of Authors:	Clémentine Louet Carla Blot Ekaterina Shelest Pamela Guerillot Jérémy Pétrowski Pascal Frey Sebastien Duplessis
Abstract:	Fungi of the order Pucciniales are obligate plant biotrophs causing rust diseases. They exhibit a complex life cycle with the production of up to five spore types, infection of two unrelated hosts and an overwintering stage. Transcription factors (TFs) are key regulators of gene expression in eukaryote cells. In order to better understand genetic programs expressed during major transitions of the rust life cycle, we surveyed the complement of TFs in fungal genomes with an emphasis on Pucciniales. We found that despite their large gene numbers, rust genomes have a reduced repertoire of TFs compared to other fungi. The proportions of C2H2 and Zinc cluster -two of the most represented TF families in fungi- indicate differences in their evolutionary relationships in Pucciniales and other fungal taxa. The cold shock protein (CSP) family showed a striking expansion in Pucciniomycotina with specific duplications in the order Pucciniales. The survey of expression profiles collected by transcriptomics along the life cycle of the poplar rust fungus revealed TF genes related to major biological transitions, e.g. response to environmental cues and host infection. Particularly, poplar rust CSPs were strongly expressed in basidia produced after the overwintering stage suggesting a possible role in dormancy exit. Expression during transition from dormant telia to basidia confirmed the specific expression of the three poplar rust CSP genes. Their heterologous expression in yeast improved cell growth after cold stress exposure, strengthening their implication in dormancy exit. This study addresses for the first time TF involved in developmental transition in the rust life cycle opening perspectives to further explore molecular regulation in the biology of the Pucciniales.

Expert annotation and life-cycle transcriptomics of transcription factors in rust fungi (Pucciniales) highlight the role of cold shock proteins in dormancy exit

Clémentine Louet¹, Carla Blot¹, Ekaterina Shelest², Pamela Guerillot¹, Jérémy Pétrowski¹, Pascal Frey¹, Sébastien Duplessis^{1*}

1. Université de Lorraine, INRAE, IAM, F-54000 Nancy, France

2. School of biological Sciences, University of Portsmouth, King Henry 1 Street, PO1 D2Y, Portsmouth, United Kingdom

* corresponding author: Sebastien Duplessis (Sebastien.duplessis@inrae.fr)

Abstract

Fungi of the order Pucciniales are obligate plant biotrophs causing rust diseases. They exhibit a complex life cycle with the production of up to five spore types, infection of two unrelated hosts and an overwintering stage. Transcription factors (TFs) are key regulators of gene expression in eukaryote cells. In order to better understand genetic programs expressed during major transitions of the rust life cycle, we surveyed the complement of TFs in fungal genomes with an emphasis on Pucciniales. We found that despite their large gene numbers, rust genomes have a reduced repertoire of TFs compared to other fungi. The proportions of C2H2 and Zinc cluster -two of the most represented TF families in fungi- indicate differences in their evolutionary relationships in Pucciniales and other fungal taxa. The cold shock protein (CSP) family showed a striking expansion in Pucciniomycotina with specific duplications in the order Pucciniales. The survey of expression profiles collected by transcriptomics along the life cycle of the poplar rust fungus revealed TF genes related to major biological transitions, e.g. response to environmental cues and host infection. Particularly, poplar rust CSPs were strongly expressed in basidia produced after the overwintering stage suggesting a possible role in dormancy exit. Expression during transition from dormant telia to basidia confirmed the specific expression of the three poplar rust CSP genes. Their heterologous expression in yeast improved cell growth after cold stress exposure, strengthening their implication in dormancy exit. This study addresses for the first time TF involved in developmental transition in the rust life cycle opening perspectives to further explore molecular regulation in the biology of the Pucciniales.

Key-words: *Melampsora larici-populina*, life cycle, basidia, telia, cold stress.

1. Introduction

Transcription factors (TFs) are essential for the regulation of expression pathways in eukaryotes by binding genomic DNA in a sequence-specific manner (Charoensawan et al., 2010; Weirauch and Hughes, 2011). TFs are classified according to their DNA-Binding Domains (DBDs) in TF families based on the DBD similarity (Hughes, 2011; Pabo and Sauer, 1992). In fungi, an expansion of TF repertoires was observed in correlation with the genome size, likely explained

by a handful of dynamic TF families (i.e. Zn cluster, C2H2 Zn finger and HD-like; Shelest 2008, 2017). Moreover, the comparison across more than 200 fungal genomes determined the presence of approximately 80 DBD families in fungi, including four fungal-specific families (Shelest, 2017). Several DBD families were associated to regulatory functions of fungal pathogenesis in plant-pathogen interactions, such as sporulation or virulence effector expression (John et al., 2021). Other TFs can be

associated to abiotic stress responses; those responsible for temperature stresses are characterized by heat shock (HSDs) or cold shock domains (CSDs). In the latter case, the TFs act as molecular chaperones that destabilize unfavorable secondary structures of mRNAs to facilitate translation after cold shocks (Zhang et al., 2018). CSD proteins (CSPs) are mainly associated with cold adaptation and they function as RNA chaperone with a role in RNA secondary structure stability during cold stress (Chaikam and Karlson, 2010). The structures of CSPs provided evidence for a global conservation of the CSD between prokaryotes and eukaryotes (Chaikam and Karlson, 2010; Heinemann and Roske, 2021) with two consensus RNA-binding motifs (RNP1 and RNP2) mediating RNA binding activity and enhancing the RNA affinity (Landsman, 1992; Nakaminami et al., 2006).

Fungi of the order Pucciniales are major plant pathogens infecting a large diversity of host plants, among which are major crops such as soybean, maize or wheat (Lorrain et al., 2019). The rust diseases caused by these obligate biotrophic pathogens lead to severe loss in agriculture (Figueroa et al., 2018; Godoy et al., 2016). They present singular features such as the capacity to infect one or two alternating hosts (the rust are then termed autoecious or heteroecious respectively) and to form up to five spore types through their complex life cycle (Aime and McTaggart, 2021). Through the year, under temperate conditions, rust fungi can also enter in an overwintering stage during which spores become dormant (Duplessis et al., 2021). In its most complex form, the life cycle of heteroecious rust fungi undergoes a variety of developmental processes that include infection of two taxonomically distant host plants with the formation of specialized infection structures (e.g. germinating tubes, appressoria, infection hyphae, haustoria, spore-forming structures and spores). Moreover, the fungus needs to adapt to the infected tissue and bypass the hosts' immune systems. These processes require physiological adjustments to nutrient acquisition in the host plants. Sexual and asexual stages also operate on the different hosts and these stages are marked by highly coordinated events. Finally, transitions to dormancy entry and exit are controlled by environmental signals (Duplessis et al., 2021; Mendgen, 1984). Integration of these various signals

and developmental processes likely requires a diversity of finely-tuned TF to orchestrate the different genetic programs at play (Duplessis et al., 2021).

In the past ten years, an increasing number of rust genomes have been sequenced (Aime et al., 2017; Lorrain et al., 2019). Most genomes are collected in the JGI Mycocosm database, which allows to draw comparative studies (Grigoriev et al., 2014). Several tools are available to specifically explore the genomes annotations. So far, no global survey of TF genes was conducted in the order Pucciniales, despite reports of gene family expansions presenting typical DBDs (Aime et al., 2017; Cuomo et al., 2017; Duplessis et al., 2011a). Among rust fungi, *Melampsora larici-populina* (poplar rust fungus) is a pioneer model for rust genomics with transcriptomic resources that encompass the whole life-cycle - i.e. infection of the two host plants and the five spore types - making it possible to study specific gene categories based on life-cycle transcriptomics (Duplessis et al., 2021).

In this study, we analyzed the repertoire of transcription factors in Pucciniales compared to other basidiomycetes and to ascomycetes. We showed that despite a striking global contraction of the TF genes complement in Pucciniales, a few families showed significant expansion in comparison to other taxonomical groups, the most remarkable being the CSD family. Life-cycle transcriptomics in the poplar rust fungus showed that CSPs were specifically highly expressed in basidia produced right after the winter dormancy. After confirming these expression profiles in a dormancy interruption experimental setup, we showed that *M. larici-populina* CSP (*MlpCSP*) genes expressed in yeast could improve tolerance to cold stress.

2. Material and Methods

2.1. Genomic resources and annotation

For genomic analysis, published fungal genomes available in the DoE Joint Genome Institute Mycocosm were used as of the 2021/04/09 (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/>). The TF annotation tables containing PFAM domains were downloaded using the “annotations” track from the JGI Mycocosm for selected taxonomical ranks, i.e. the phyla Ascomycota and Basidiomycota; subphyla

Ustilaginomycotina and Pucciniomycotina; and the order Pucciniales. The tables were then filtered from non-TF-like DBDs and non-DBDs. In all comparison analyses, the order Pucciniales and subphyla Ustilaginomycotina and Pucciniomycotina were removed from their respective higher taxonomical ranks, which are thereafter referred to as Other_Pucciniomycotina (i.e. Pucciniomycotina without Pucciniales) and Other_Basidiomycota (i.e. without Ustilaginomycotina and Pucciniomycotina). For each fungal species, the total number of predicted genes and TF-associated domains were collected. CSP sequences were collected as fasta for phylogeny, PCR amplification and cloning ([Supplementary Text S1](#)).

2.2. Transcriptomic resources

Transcriptomic profiling of *M. larici-populina* was established across its life cycle based on previously published studies transposed to the version 2 of the genome ([Guerillot et al., 2021](#)). Briefly, gene expression values were determined for dormant and germinated urediniospores, time course infection of poplar leaves and telia by oligoarrays ([Duplessis et al., 2011b](#); [Hacquard et al., 2013](#)) and for basidia, as well as for spermogonia and aecia on larch needles by RNAseq ([Lorrain et al., 2018a](#)). Expression values for oligoarrays and RNAseq were normalized separately. For the present study, we extracted expression profiles of *M. larici-populina* TF genes from an open transcriptomic dataset ([Supplementary Table S1](#)). The Morpheus tool from the broad institute website (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>) was used to display normalized transcript expression levels using the *k*-means partitioning method.

2.3. Fungal material

Telia from *M. larici-populina* isolate 93GS3 were produced on leaves of the poplar cultivar Robusta (*P. deltoides* x *P. nigra*) following the procedure described in Pernaci et al. ([2014](#)). Briefly, poplar leaves were inoculated by urediniospores at the end of the summer and telia differentiated during autumn in a non-heated greenhouse. Leaves bearing dormant telia were placed outside in natural conditions during winter. Leaves were regularly tested in the lab to ensure that vernalization was reached and then kept at -3°C until further use. Basidia were artificially produced from telia by

soaking the leaves in water for six hours at room temperature, followed by 96 hours of incubation at $19 \pm 1^\circ\text{C}$ on a wet paper towel in 24 x 24 cm Petri dishes. Pieces of leaves bearing telia (~20 mg) were sampled right before soaking the leaves in water (t-0h), after 6 hours immersion in water (t-6h) and after 96 hours of incubation (t-96h). For the later condition, both telia which produced basidia visible as a dense orange mat (t-96h_BSD) and non-vernalized telia which did not produce basidia (t-96h_TEL) were separated.

2.4. RNA isolation, reverse transcription (RT) and quantitative PCR

Total RNA was isolated from telia and basidia samples with the RNeasy plant mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), using RLT buffer with β -mercaptoethanol, following manufacturer's recommendations. The RNase-Free DNase Set (Qiagen) treatment was applied to all samples according to the manufacturer's recommendations, to eliminate traces of genomic DNA. Primers were designed for *MlpCSP1*, *MlpCSP2* and *MlpCSP3* ([Supplementary Table S2](#)) and efficiency for each target sequence ranged between 80 and 99%. First-strand cDNAs were synthesized from 500 ng DNase-treated total RNA by RT with the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) in a total volume of 20 μL according to the manufacturer's instructions. For the qPCR amplification, 2 μL of one-tenth diluted RT products were amplified in 2X Absolute qPCR SYBR Green Mix (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) with 1.6 μM of specific primers with an QuantStudio™ 6 Flex system (Applied, Biosystems, Life Technologies, Saint-Aubin, France) in a final volume of 15 μL . Transcript expression levels were normalized with the reference gene *Mlp-ELF1a* using the $2^{-\Delta\text{Ct}}$ calculation ([Livak and Schmittgen, 2001](#)), and expressed relative to the highest expression level, set at 100% ([Hacquard et al., 2011b](#)).

2.5. cDNA cloning, yeast transformation and cold stress tolerance assay

MlpCSP1, *MlpCSP2* and *MlpCSP3* were amplified from t-96h_BSD cDNA using specific primers defined on the *M. larici-populina* genome sequence ([Supplementary Table S2](#)). The PCR-amplified products were digested for 1 h at 37°C with *Bam*HI/*Xho*I and *Hind*III/*Xho*I restriction enzymes for *MlpCSP1*; and *MlpCSP2* and *MlpCSP3*, respectively.

Digestion products were purified with the illustra GFX PCR DNA and gel band purification kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) and were directionally cloned in the yeast expression vector pYES2 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) carrying the URA3 selection marker driven by the GAL1 promoter; after ligation overnight at 4°C with the T4 DNA ligase (New England Biolabs, Evry, France). The sequences of the cloned fragments in the resulting plasmids pYES2::MlpCSP1, pYES2::MlpCSP2 and pYES2::MlpCSP3 were verified by Sanger sequencing (GENEWIZ, Leipzig, Germany). Yeast strain BY4741 (MATa, Ura3Δ0, Leu2Δ0, His3Δ1, Met15Δ0) grown in YPG medium [1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) glucose] was transformed with each plasmid or with the empty pYES2 plasmid as a control. All transformations were performed according to Gietz and Schiestl (2007). For yeast growth experiments, YNB selective medium [1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) glucose] supplemented with leucine, histidine, methionine was used. Yeast cells transformed with pYES2 constructs and the empty vector were incubated with shaking for 24 hours at 30°C in YNB selective medium as described above. To promote *MlpCSP* expression, cultures were then adjusted to an equal density (OD600 = 0.4) and incubated with shaking for 24 hours at 30°C in YNB inductive medium [1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) galactose] with the amino acids described above. To test the ability of transformed yeast to tolerate cold stress, induced yeast cells were re-suspended in 2 mL of YNB inductive medium to equal density (OD600 = 1), placed at -20°C during 3, 6, 9, 12 or 24 hours and placed back at 30°C for 12 hours of further growth with shaking (Gao et al., 2012). The relative cell densities were measured after the recovering step at 30°C (OD600). The experiment was performed in triplicate.

2.6. Statistical analyses

Statistical analyses were conducted with R software (R Core Team, 2018) for comparisons of means between taxonomical groups based on analysis of variance (Anova) or its non-parametric alternative (Kruskal-Wallis test); followed, when necessary, by appropriate Bonferroni-Dunn's post hoc test at the threshold level of $P=0.05$.

2.7. Phylogenetic analysis of cold-shock proteins

CSP sequences were selected from a collection of representative genomes in distinct taxonomic families available at the MycoCosm for the order Pucciniales (a single representative genome was used for the species *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* and *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, respectively, from Duplessis et al. (2011a) and Cuomo et al. (2017)); a selection of three species from other Pucciniomycotina classes (*Rhodotorula taiwanensis* MD1149 and *Microbotryum lychnidis-dioicae* p1A1 Lamole from the class Microbotryomycetes, and *Mixia osmundae* IAM 14324 v1.0 from the class Mixiomycetes); and the unique CSP in *Aspergillus nidulans* in the phylum Ascomycota as an outgroup. CSP sequences alignment and phylogeny were performed on the Phylogeny website (www.phylogeny.fr) with default parameters in the one click mode (without the Gblock option) combining alignment with Muscle and phylogeny with PhyML (Dereeper et al., 2008). The tree was built with FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) from the exported newick file.

3. Results

3.1. Annotation of fungal TF domains reveals a contraction of the TF repertoire in the order Pucciniales.

In order to have a complete view of the TF category in the order Pucciniales and to compare with other fungi, we took advantage of the updated annotation track at the JGI MycoCosm which compiles a series of 137 PFAMs associated to TF functions. We collected this information for a total of 874 fungal species for which the genomes were published and available for comparative studies (Supplementary Table S3). We performed a curation of this collection of PFAMs based on previous expert annotations (Shelest, 2017, 2008) and ended up with a total of 75 TF PFAMs (Supplementary Table S4). Those excluded lacked a DBD, contained a DBD not associated with a TF function (for instance, those of RNA polymerases), corresponded to general transcription function (e.g. TFII domains) or were related to plant TF with a low representation in the overall dataset. PFAM with a very low representation among all fungi (less than 10 occurrences found among 874 genomes) were also discarded from the set. A total of 58 TF families were

defined from their DBD similarity, corresponding to 480339 TF domains in 874 fungal genomes ([Table 1](#)). The order Pucciniales belongs to the subphylum Pucciniomycotina in the phylum Basidiomycota. In order to compare rust fungal TFs, we set taxonomical groups as follows: Pucciniales (n=12), Other_Pucciniomycotina (n=13), Ustilaginomycotina (n=28), Other_Basidiomycota (n=233) and Ascomycota (n=588). In average, the total number of genes is greater in Pucciniales compared with other fungal groups, i.e. 18280 ± 1580 in Pucciniales versus $7788 \text{ genes} \pm 500$ in Other_Pucciniomycotina, $6945 \text{ genes} \pm 628$ in Ustilaginomycotina, $15137 \text{ genes} \pm 687$ in Other_Basidiomycota and $10920 \text{ genes} \pm 163$ in Ascomycota. On the contrary, whereas the numbers of TF domains and total gene tend to increase concomitantly in all taxonomical groups, the number of TF domains tends to slightly drop in the order Pucciniales ([Figure 1](#)). These fungi present a significant reduction relative to Ascomycota and Other_Basidiomycota (Kruskal-wallis, Bonferonni-Dunn test; p-value < 0.0001 and p-value < 0.05, respectively), but not to Other_Pucciniomycotina or Ustilaginomycotina. These results clearly indicate differences between the genome evolution of Pucciniales in comparison to other basidiomycetes and ascomycetes, with a marked contraction in the Pucciniales.

3.2. Comparison of TF families distribution across fungi shows specific evolutionary trajectories in Pucciniales.

To evaluate whether the difference observed in fungal TF domains distribution is related to specific contraction or expansion of particular TF families, we extracted the families most represented in the whole dataset ([Table 2](#)). The top 10 TF families (83% of the whole fungal TF domains collection) are shown in [Figure 2](#). The Zn cluster (28.1%), Fungal-trans (24.1%), Zf-C2H2 (9.8%), Zf-C3HC4 (6.5%), and SET (3.3%) families are predominant. Globally, a similar picture can be observed in all surveyed fungal groups. At the contrary, the order Pucciniales presents a different proportion and the four major families are in order Zf-C2H2, Zf-C3HC4, Zn cluster and SET ([Figure 2A](#)). Moreover, we can see that whereas the Zn cluster TF dominates in all other fungi, the Zf-C2H2 is more represented in the Pucciniales (ratio of Zf-C2H2/Zn cluster: 1.75 versus 0.62 in average in other fungi; [Figure 2B](#)). This clearly

points at different evolutionary relationships between the major families of TFs in Pucciniales and other taxa.

3.3. Survey of TF families reveals expansion of the CSD family in Pucciniales.

To see if there are TF families with unusual distribution, we compared the number of TF domains for each TF family among taxonomical groups. There are 13 families that are significantly differentially represented in Pucciniales than in at least one other group (four over-represented and nine under-represented) and most of them differ from one or two groups ([Table 3](#)). The CSD family is outstanding in this respect, being significantly over-represented in the Pucciniales and Other_Pucciniomycotina compared with all other fungi (in average 3.8 and 3.2 CSDs per genome in Other_Pucciniomycotina and Pucciniales, respectively, against 0.07 in all other fungi; [Figure 3](#)). Overall, the Pucciniales TF repertoire does not seem to be marked by major expansions or contractions; only the CSD family shows a significant expansion.

3.4. Phylogeny analysis of CSPs supports a specific expansion at the root of the order Pucciniales.

To determine the evolutionary relationship between CSPs from the order Pucciniales, we built a phylogenetic tree for CSPs from representative genomes in this order, a selection of three species from other Pucciniomycotina classes, and a single CSP from the phylum Ascomycota (*Aspergillus nidulans*) as an outgroup. The [Figure 4](#) presents the phylogenetic tree (combining alignment with Muscle and phylogeny with PhyML) and a specific focus on the CSD alignment based on 33 full-length amino acid sequences ([Supplementary Text S1](#)). The phylogeny showed two major branches for the Pucciniomycotina with a clear dissociation between Pucciniales and other Pucciniomycotina. Two subclades (highlighted in red and green in [Figure 4](#)) on one branch and one clade (shown in blue in [Figure 4](#)) on the other branch, only consisted of Pucciniales. Within these clades, distinct branches of CSPs belonging to the families Melampsoraceae, Coleosporiaceae and Pucciniaceae were retrieved, supporting the taxonomy of rust fungi. The phylogeny suggests that an ancient duplication occurred at the root of the Pucciniomycotina, and a specific one at the root of the Pucciniales.

Furthermore, subsequent duplications occurred independently in two of the three clades for a few rust species (*M. allii-populina*, *P. triticea*). The CSD alignment showed a relative conservation over the 70 amino acids of the domain compared to the outgroup and the RNP1 and RNP2 motifs exhibit higher levels of conservation (Figure 4). To conclude, this phylogenetic comparison indicates that the CSP expansion likely occurred through ancient and conserved duplications followed by a few more recent ones; with the presence of a conserved CSD containing the RNP1 and RNP2 signature motifs.

3.5. Transcriptomics of the poplar rust fungus highlights specific expression profiles of TFs during its life cycle.

The poplar rust fungus *M. larici-populina* is the only rust fungus for which a survey of the complete life cycle has been established by transcriptomics, covering stages at which all spore forms are formed. Taking advantage of this dataset (Guerillot et al., 2021), we extracted the expression profiles of 213 genes (among a total of 252 TF genes) belonging to TF families. The missing expression profiles correspond to genes for which expression details were not available from the oligoarrays defined on early versions of the genome. The Figure 5 presents the global expression profiling of the 213 *M. larici-populina* TF genes sorted by k-means clustering (see Supplementary Figure S1 for the expanded view of the global profile and k-means clusters). Overall, the expression of most genes was not restricted to a single stage, and only a few clusters were predominantly associated with a spore stage (k3, basidia) or an infection stage (i.e. k2 in larch and k4 and k9 in poplar). Expression during time course infection on the poplar host was most often associated with the spore types formed before or after infection (k1, k5, k6, k8 and k10). Interestingly, the k10 cluster corresponds to TF genes expressed at almost all surveyed stages except for early timepoints of poplar infection. Only a limited number of genes showed a specific or preferential expression on a given host, larch (k2; spermogonia and aecia) or poplar (k4, k7 and k9; time course infection), or at a given spore stage (k3; basidia) (see also Supplementary Figure S2). Similarly, only a few TF families could be evidently assigned to a specific stage, such as the CSD family to basidia or the FAR1 family to 24-48 hpi, the earliest infection stages of

the poplar time course infection (see Supplementary Figure S1 for profiling according to TF families without grouping). To conclude, this transcriptomic survey allows to derive groups of TF genes coordinately expressed along the poplar rust life cycle and to associate the expression of the FAR1 and CSD families to specific *M. larici-populina* stages. Particularly, the CSD family is only expressed in basidia, a transient stage formed right after the overwintering period.

3.6. RTqPCR expression profiling confirms the high induction of poplar rust CSP genes during basidia formation and suggests a role in telia dormancy exit

In order to validate the specific expression of *MlpCSP* genes observed in basidia by RNAseq, we performed a RTqPCR experiment with poplar rust telia and basidia produced in laboratory conditions during the fungal dormancy exit. Similar temporal patterns of transcript expression were observed for the three *MlpCSP* genes (Figure 6) with a relative increase of expression at six hours (telia soaked in water at room temperature) compared with t-0h (dormant telia collected from environmental conditions after an overwintering period). Significantly higher expression levels were then observed for the three genes in basidia produced from overwintered telia after 96 h of incubation at 19°C compared to telia at previous time points (Anova; p -value < 0.001 for *MlpCSP1* and *MlpCSP2* and p -value < 0.01 for *MlpCSP3*). Expression levels of *MlpCSP* genes in telia that did not produce any basidia after 96 h of incubation (i.e. full extent of dormancy not reached during winter) were not different from the expression in dormant telia. This result validates the specific expression of *MlpCSP* genes in basidia and suggests that the expression could contribute to dormancy exit after the vernalization of poplar rust teliospores.

3.7. Expression of *MlpCSP* genes in yeast allows cell growth recovery after exposure to cold stress.

In the absence of any genetic transformation system for the poplar rust, we expressed each of the three *M. larici-populina* CSP genes in yeast cells to evaluate their functional impact, the yeast genome being deprived of CSP gene. We compared the viability of yeast cells transformed with pYES2::*MlpCSP1*, pYES2::*MlpCSP2* and pYES2::*MlpCSP3* plasmids with an empty pYES2 plasmid as a control, after applying

different periods of cold stress (i.e. 3 to 24 h of exposure to -20°C) followed by a period of 12 h at an optimal growth temperature of 30°C (Figure 7). Before nine hours of cold treatment, no significant difference could be observed between the control and the different constructs (Anova; p -value < 0.05). All transformed yeasts were sensitive to freezing with a decrease of cell viability. From 9 to 24 hours of cold exposure, yeast cells carrying the construct pYES2::MlpCSP2 exhibited a significant higher level of cell growth relative to the control. The yeast cells carrying the pYES2::MlpCSP1 and pYES2::MlpCSP3 constructs showed significant higher levels of cell growth from 12 to 24 hours of exposure to cold compared with the control yeast (Anova; p -value < 0.05). Altogether, these results indicate that *MlpCSP1*, *MlpCSP2* and *MlpCSP3* can all contribute to cold stress tolerance in fungal cells.

4. Discussion

Rust fungi are obligate plant pathogens with a unique biological cycle among eukaryotes marked by an alternation of up to five different spore stages differentiated on one or two different host plants (Lorrain et al., 2019). TFs are key cellular elements to finely tune the regulation of genetic programs underlying developmental transitions influenced by both host and environmental signals (Duplessis et al., 2021). Studies of TFs in rust fungi are scarce. The homolog of *S. cerevisiae* STE12 involved in morphological transitions and sexual development was studied in the wheat stripe rust fungus *P. striiformis* f. sp. *tritici*, in which *PstSTE12* silencing inhibits the pathogen growth *in planta* (Zhu et al., 2018). Also, the homeodomain pair HD1 and HD2 which play a critical role during mating in fungi were cloned from the wheat rust *Puccinia triticina* and were proven to be active when expressed in the heterologous system *Ustilago maydis* (Cuomo et al. 2017). So far, apart from global surveys in fungi (Shelest, 2017, 2008), no dedicated analysis of TF was conducted in rust fungi. Here, by combining a dedicated annotation of TF genes and transcriptomics in a model rust fungus, we address some biological specificities in rust fungi related to their peculiar life cycle.

A previous survey of the TFome in fungal genomes showed that TF numbers tend to increase with the size of the gene complement (Shelest, 2017).

Strikingly, whereas rust fungal genomes present significantly larger gene numbers than other fungi, they present reduced TF repertoires. On the other hand, some TF families have had peculiar evolutionary history. For instance, the proportion of Zf-C2H2 related to Zn cluster is higher in Pucciniales and Pucciniomycotina when compared to other fungi. The Zn cluster is the most abundant TF family in fungi and more particularly in younger Ascomycota taxa; and they are associated to a variety of regulatory processes (Shelest, 2017; Weirauch and Hughes, 2011). A future challenge will be to determine which specific Zn cluster and Zf-C2H2 TF genes have been retained or lost in Pucciniales and whether their regulatory roles and target genes are conserved. Apart from these striking differences, only a handful of gene family expansions or contractions could be observed, with CSPs standing out in this respect. Whereas CSPs are absent from a large majority of ascomycetes and basidiomycetes, they are significantly expanded in the order Pucciniales and in other Pucciniomycotina, which exhibit up to five genes. As our analysis suggests, CSP expansion originates from successive duplications in the subphylum Pucciniomycotina and three types of CSP genes belonging to the same branch can be distinguished in the phylogeny of the order Pucciniales. Fungi of the Pucciniomycotina have been reported in a diversity of ecological habitats, including extreme environments imposing strong abiotic stresses (e.g. arctic ice, deep-sea habitats; Aime et al., 2014; Toome-Heller, 2016). Pucciniales that are found in temperate, montane or boreal climates most often display a dormant phase during winter in their cycle (Duplessis et al., 2021). The expansion of CSP genes in Pucciniomycotina suggests a role in their adaptation to cold environment.

Transcriptomics is an approach of choice to decipher TF functions in eukaryotes. By combining different transcriptomic studies conducted in the model rust fungus *M. larici-populina* (Guerillot et al., 2021), it is possible to specifically survey TF expression along the rust life cycle in order to infer TF functions. As expected for this cellular category, a variety of TF genes from different families are expressed at each life stage. Specific TFs associated with a given stage or with a given host plant can be identified. Interestingly, nearly 80% of the TFs with the highest expression levels were previously reported as

regulators of key virulence pathways in phytopathogenic fungi (John et al., 2021). During time course infection of the poplar host, preferential expression of TF genes can also be associated with early colonization, biotrophic growth or sporulation. Similar profiles were previously described for other categories such as virulence effectors (Duplessis et al., 2011b; Hacquard et al., 2012), and it will be crucial to determine whether specific TF can be assigned to such regulation. Moreover, the expression of only few TF families could be restricted to a given stage. For instance, almost all genes of the FAR1 family show a specific expression at the earliest stages of poplar infection, whereas they are not detected in sporulating spores. At this stage, infection hyphae are colonizing the host mesophyll (Hacquard et al., 2011a). An assumed role of FAR1 is mobilization of intracellular lipid reserves during plant infection by the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae* (bin Yusof et al., 2014). It would be interesting to decipher the exact role of FAR1 at this stage and whether regulation of lipid metabolism also plays a role at this stage of rust infection.

M. larici-populina CSPs exhibit the most remarkable expression profile among TF genes, restricted to the basidia stage with the highest transcript levels across the global expression dataset. Basidia are produced from telia right after overwintering when favorable conditions are met (Duplessis et al., 2021). This stage is transient and basidiospores rapidly differentiate to realize infection on larch, the alternate host of the poplar rust fungus (Hacquard et al., 2011a; Pernaci et al., 2014). Temperature and moisture seem to be crucial factors to exit winter dormancy (Mendgen, 1984). An experimental set-up mimicking dormancy exit confirmed the high expression of the three CSP genes, highlighting their major role in the transition from cold to favorable temperatures. The biotrophic status of rust fungi impedes their genetic manipulation and gene functional characterization requires heterologous systems (Bakkeren and Szabo, 2020; Hu et al., 2007; Lorrain et al., 2018b). In order to investigate the role of CSP function, the three *MlpCSPs* were expressed in yeast cells to assay cold recovery as previously described for other fungi (Fang and Leger, 2010). Yeast cells expressing the different rust CSPs showed an improved growth after exposure at -20°C compared to control yeast devoid of CSP. Here, we show that the three *MlpCSPs* are

highly expressed in basidia and can improve growth of yeast cells after a cold shock. Altogether our results clearly indicate that CSPs are major TFs of the rust life cycle with a role associated to dormancy exit and basidia differentiation. In other eukaryotes a variety of functions have been assigned to CSPs (Heinemann and Roske, 2021). A next challenge will be to determine whether each of the three *MlpCSP* genes exhibit some specificity or show functional redundancy in the regulation of subsequent cellular processes.

To conclude, by combining functional annotation in rust genomes and life cycle survey in transcriptomics data, we open the way to decipher key regulatory processes in the complex biology of rust fungi. Most often, only infection on the main host is studied in rust fungi precluding the understanding of other stages. Our strategy allows to address for the first time the function of regulatory genes in basidia of rust fungi. Beyond the case of CSPs, other major categories may now be considered for detailed analysis at different stages. Fine dissection of specific rust stages by omics approach should help to better define the genetic programs correlating with TF expression.

Funding

CL, JP, PF and SD are supported by the Labex Arbre (Programme Investissement d'Avenir, ANR-11-LABX-0002-01). CL thesis is funded by the Region Grand Est and the French National Research Agency (ANR-18-CE32-0001, Clonix2D project). ES is funded from Research England's Expanding Excellence in England (E3) Fund.

CRedit authorship contribution statement

Clémentine Louet: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Data Curation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing, Visualization, Supervision. **Carla Blot:** Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Data Curation. **Ekaterina Shelest:** Methodology, Formal analysis, Investigation, Resources, Data Curation, Writing - Review & Editing. **Pamela Guerillot:** Methodology, Software, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Data Curation, Writing - Review & Editing. **Jérémy Pétrowski:** Resources. **Pascal Frey:** Resources, Writing - Review & Editing, Funding acquisition.

Sébastien Duplessis: Conceptualization, Methodology, Software, Validation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We would like to thank the Redox team of the UMR IAM for hosting molecular experiments, providing inputs and material as well as for rich discussions along the way. We would like to thank all colleagues who were involved in generating primary poplar rust transcriptomic data that we exploited here.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary Table S1. Expression values of the poplar rust fungus TF genes.

Supplementary Table S2. Primers for cloning and expression analysis of *Melampsora larici-populina* cold shock domain (MlpCSP) genes.

Supplementary Table S3. List of fungal genomes from JGI.

Supplementary Table S4. List and occurrence of TFs detected in fungal genomes.

Supplementary Figure S1. Expression profiling of *Melampsora larici-populina* TF genes grouped by k-means (k= 10) across the life cycle. **A.** Global expression profile with genes sorted by TF families. **B.** Global expression profile with genes sorted by k-means. Expression values scale from blue to red represents normalized expression levels from 0 (deep blue) to maximum value (deep red) at each stage. Morpheus

(<https://software.broadinstitute.org/morpheus>)

parameters used for k-means were as follows: one minus pearson's correlation, cluster by rows, number of clusters 10 (1000 iterations). For each gene, the id shown on the right side of the profile indicates the Joint Genome Institute MycoCosm protein-ID number with the associated PFAM and TF family in brackets. The 10 k-means are shown on the right side

of each profile with k-means colors corresponding in A and B.

Supplementary Figure S2. Top 10 most highly expressed *Melampsora larici-populina* TF genes at each stage of the poplar rust life cycle. The life cycle is shown ordered from stages occurring on the telial host to those occurring on the aecial host. URE and UREg, dormant and germinating urediniospores, respectively; T24 to T168, hours post-inoculation in a time course infection series on poplar leaves inoculated with urediniospores; TEL, telia; BSD, basidia; SPG, spermogonia; and AEC, aecia. The top 10 most highly expressed TFs have been grouped according to the life cycle as stage-specific, host-specific or other (not host- or stage-specific) based on the stage where they showed highest expression levels.

Supplementary Text S1. List of cold-shock amino-acid sequences used in this study.

References

- Aime, M.C., McTaggart, A.R., 2021. A higher-rank classification for rust fungi, with notes on genera. *Fungal Systematics and Evolution* 7, 21–47. <https://doi.org/10.3114/fuse.2021.07.02>
- Aime, M.C., McTaggart, A.R., Mondo, S.J., Duplessis, S., 2017. Phylogenetics and phylogenomics of rust fungi, in: *Advances in Genetics*. pp. 267–307. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2017.09.011>
- Aime, M.C., Toome, M., McLaughlin, David J., 2014. Pucciniomycotina, in: McLaughlin, D.J., Spatafora, J.W. (Eds.), *Systematics and Evolution*. Springer, Berlin, pp. 271–294. https://doi.org/10.1007/978-3-642-55318-9_10
- Bakkeren, G., Szabo, L.J., 2020. Progress on molecular genetics and manipulation of rust fungi. *Phytopathology* 110, 532–543. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-19-0228-IA>
- bin Yusof, M.T., Kershaw, M.J., Soanes, D.M., Talbot, N.J., 2014. FAR1 and FAR2 regulate the expression of genes associated with lipid metabolism in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS ONE* 9, e99760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099760>
- Chaikam, V., Karlson, D.T., 2010. Comparison of structure, function and regulation of plant cold shock domain proteins to bacterial and animal cold shock domain proteins. *BMB Reports* 43, 1–

8.
<https://doi.org/10.5483/BMBRep.2010.43.1.001>
Charoensawan, V., Wilson, D., Teichmann, S.A., 2010. Genomic repertoires of DNA-binding transcription factors across the tree of life. *Nucleic Acids Research* 38, 7364–7377. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq617>
- Cuomo, C.A., Bakkeren, G., Khalil, H.B., Panwar, V., Joly, D., Linning, R., Sakthikumar, S., Song, X., Adiconis, X., Fan, L., Goldberg, J.M., Levin, J.Z., Young, S., Zeng, Q., Anikster, Y., Bruce, M., Wang, M., Yin, C., McCallum, B., Szabo, L.J., Hulbert, S., Chen, X., Fellers, J.P., 2017. Comparative analysis highlights variable genome content of wheat rusts and divergence of the mating loci. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 7, 361–376. <https://doi.org/10.1534/g3.116.032797>
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.M., Gascuel, O., 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic acids research* 36, W465–W469. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn180>
- Duplessis, S., Bakkeren, G., Hamelin, R., 2014. Advancing knowledge on biology of rust fungi through genomics, in: *Advances in Botanical Research*. Elsevier Ltd, pp. 173–209. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397940-7.00006-9>
- Duplessis, S., Cuomo, C.A., Lin, Y.-C., Aerts, A., Tisserant, E., Veneault-Fourrey, C., Joly, D.L., Hacquard, S., Amselem, J., Cantarel, B.L., Chiu, R., Coutinho, P.M., Feau, N., Field, M., Frey, P., Gelhaye, E., Goldberg, J., Grabherr, M.G., Kodira, C.D., Kohler, A., Kues, U., Lindquist, E.A., Lucas, S.M., Mago, R., Mauceli, E., Morin, E., Murat, C., Pangilinan, J.L., Park, R., Pearson, M., Quesneville, H., Rouhier, N., Sakthikumar, S., Salamov, A.A., Schmutz, J., Selles, B., Shapiro, H., Tanguay, P., Tuskan, G.A., Henrissat, B., Van de Peer, Y., Rouze, P., Ellis, J.G., Dodds, P.N., Schein, J.E., Zhong, S., Hamelin, R.C., Grigoriev, I. V., Szabo, L.J., Martin, F., 2011a. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 9166–9171. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019315108>
- Duplessis, S., Hacquard, S., Delaruelle, C., Tisserant, E., Frey, P., Martin, F., Kohler, A., 2011b. *Melampsora larici-populina* transcript profiling during germination and timecourse infection of poplar leaves reveals dynamic expression patterns associated with virulence and biotrophy. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24, 808–818. <https://doi.org/10.1094/MPMI>
- Duplessis, S., Lorrain, C., Petre, B., Figueroa, M., Dodds, P.N., Aime, M.C., 2021. Host adaptation and virulence in heteroecious rust fungi. *Annual Review of Phytopathology* 59, 17.1-17.20. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-020620>
- Fang, W., Leger, R.J. St., 2010. RNA binding proteins mediate the ability of a fungus to adapt to the cold. *Environmental Microbiology* 12, 810–820. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02127.x>
- Figueroa, M., Hammond-Kosack, K.E., Solomon, P.S., 2018. A review of wheat diseases—a field perspective. *Molecular Plant Pathology* 19, 1523–1536. <https://doi.org/10.1111/mpp.12618>
- Gao, C., Jiang, B., Wang, Y., Liu, G., Yang, C., 2012. Overexpression of a heat shock protein (ThHSP18.3) from *Tamarix hispida* confers stress tolerance to yeast. *Molecular Biology Reports* 39, 4889–4897. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1284-2>
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., 2007. Yeast transformation by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Methods in Molecular Biology* 2, 31–34. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1363-3_1
- Godoy, C.V., Seixas, C.D.S., Soares, R.M., Marcelino-Guimarães, F.C., Meyer, M.C., Costamilan, L.M., 2016. Asian soybean rust in Brazil: past, present, and future. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 51, 407–421. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500002>
- Grigoriev, I. V., Nikitin, R., Haridas, S., Kuo, A., Ohm, R., Ollilar, R., Riley, R., Salamov, A., Zhao, X., Korzeniewski, F., Smirnova, T., Nordberg, H., Dubchak, I., Shabalov, I., 2014. MycoCosm portal: Gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Research* 42. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1183>
- Guerillot, P., Morin, E., Kohler, A., Louet, C., Duplessis, S., 2021. A comprehensive collection of transcriptome data to support life cycle analysis of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*. bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.07.25.453710>
- Hacquard, S., Delaruelle, C., Frey, P., Tisserant, E., Kohler, A., Duplessis, S., 2013. Transcriptome

- analysis of poplar rust telia reveals overwintering adaptation and tightly coordinated karyogamy and meiosis processes. *Frontiers in Plant Science* 4, 456. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00456>
- Hacquard, S., Joly, D.L., Lin, Y.-C., Tisserant, E., Feau, N., Delaruelle, C., Legué, V., Kohler, A., Tanguay, P., Petre, B., Frey, P., Van De Peer, Y., Rouzé, P., Martin, F., Hamelin, R.C., Duplessis, S., 2012. A comprehensive analysis of genes encoding small secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-populina* (Poplar leaf rust). *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25, 279–293. <https://doi.org/10.1094/MPMI>
- Hacquard, S., Petre, B., Frey, P., Hecker, A., Rouhier, N., Duplessis, S., 2011a. The poplar-poplar rust interaction: insights from genomics and transcriptomics. *Journal of Pathogens* 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/716041>
- Hacquard, S., Veneault-Fourrey, C., Delaruelle, C., Frey, P., Martin, F., Duplessis, S., 2011b. Validation of *Melampsora larici-populina* reference genes for in planta RT-quantitative PCR expression profiling during time-course infection of poplar leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 75, 106–112. <https://doi.org/10.1016/J.PMPP.2010.10.003>
- Heinemann, U., Roske, Y., 2021. Cold-shock domains—Abundance, structure, properties, and nucleic-acid binding. *Cancers* 13. <https://doi.org/10.3390/cancers13020190>
- Hu, G., Kamp, A., Linning, R., Naik, S., Bakkeren, G., 2007. Complementation of *Ustilago maydis* MAPK mutants by a wheat leaf rust, *Puccinia triticina* homolog: potential for functional analyses of rust genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20, 637–647. <https://doi.org/10.1094/MPMI>
- Hughes, T.R., 2011. Introduction to “a handbook of transcription factors.” *Subcellular Biochemistry* 52, 1–6. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9069-0_1
- John, E., Singh, K.B., Oliver, R.P., Tan, K.C., 2021. Transcription factor control of virulence in phytopathogenic fungi. *Molecular Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1111/mpp.13056>
- Landsman, D., 1992. RNP-1, an RNA-binding motif is conserved in the DNA-binding cold shock domain. *Nucleic Acids Research* 20, 2861–2864. <https://doi.org/10.1093/nar/20.11.2861>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lorrain, C., Gonçalves dos Santos, K.C., Germain, H., Hecker, A., Duplessis, S., 2019. Advances in understanding obligate biotrophy in rust fungi. *New Phytologist* 222, 1190–1206. <https://doi.org/10.1111/nph.15641>
- Lorrain, C., Marchal, C., Hacquard, S., Delaruelle, C., Pétrowski, J., Petre, B., Hecker, A., Frey, P., Duplessis, S., 2018a. The rust fungus *Melampsora larici-populina* expresses a conserved genetic program and distinct sets of secreted protein genes during infection of its two host plants, larch and poplar. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 31, 695–706. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-17-0319-R>
- Lorrain, C., Petre, B., Duplessis, S., 2018b. Show me the way: rust effector targets in heterologous plant systems. *Current Opinion in Microbiology* 46, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.01.016>
- Mendgen, K., 1984. Development and physiology of teliospores, in: W Bushnell, A.R. (Ed.), *The Cereal Rusts*. Cambridge, pp. 375–398. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-148401-9.50018-2>
- Nakaminami, K., Karlson, D.T., Imai, R., 2006. Functional conservation of cold shock domains in bacteria and higher plants. *PNAS* 103, 10122–10127. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603168103>
- Pabo, C.O., Sauer, R.T., 1992. Transcription factors: Structural families and principles of DNA recognition. *Annual Review of Biochemistry* 61, 1053–1095. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.61.070192.005201>
- Pernaci, M., De Mita, S., Andrieux, A., Pétrowski, J., Halkett, F., Duplessis, S., Frey, P., 2014. Genome-wide patterns of segregation and linkage disequilibrium: the construction of a linkage genetic map of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*. *Frontiers in Plant Science* 5, 454. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2014.00454>
- Shelest, E., 2017. Transcription factors in fungi: TFome dynamics, three major families, and dual-specificity TFs. *Frontiers in Genetics* 8, 53. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00053>
- Shelest, E., 2008. Transcription factors in fungi. *FEMS*

- Microbiology Letters 286, 145–151.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01293.x>
- Spanu, P.D., 2012. The genomics of obligate (and nonobligate) biotrophs. Annual Review of Phytopathology 50, 91–109.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-173024>
- Team, R.C., 2018. R: A language and environment for statistical computing (version 3.5.2). R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Toome-Heller, M., 2016. Latest developments in the research of rust fungi and their allies (Pucciniomycotina), in: Li, D.-W. (Ed.), Biology of Microfungi. Springer, Switzerland, pp. 147–168.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-29137-6_7
- Weirauch, M.T., Hughes, T.R., 2011. A catalogue of eukaryotic transcription factor types, their evolutionary origin, and species distribution, in: A Handbook of Transcription Factors. Springer, Dordrecht, pp. 25–73.
https://doi.org/10.1007/978-90-481-9069-0_3
- Zhang, Y., Burkhardt, D.H., Rouskin, S., Li, G.W., Weissman, J.S., Gross, C.A., 2018. A stress response that monitors and regulates mRNA structure is central to cold shock adaptation. Molecular Cell 70, 274–286.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.035>
- Zhu, X., Liu, W., Chu, X., Sun, Q., Tan, C., Yang, Q., Jiao, M., Guo, J., Kang, Z., 2018. The transcription factor *PstSTE12* is required for virulence of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. Molecular Plant Pathology 19, 961–974.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12582>

Figures

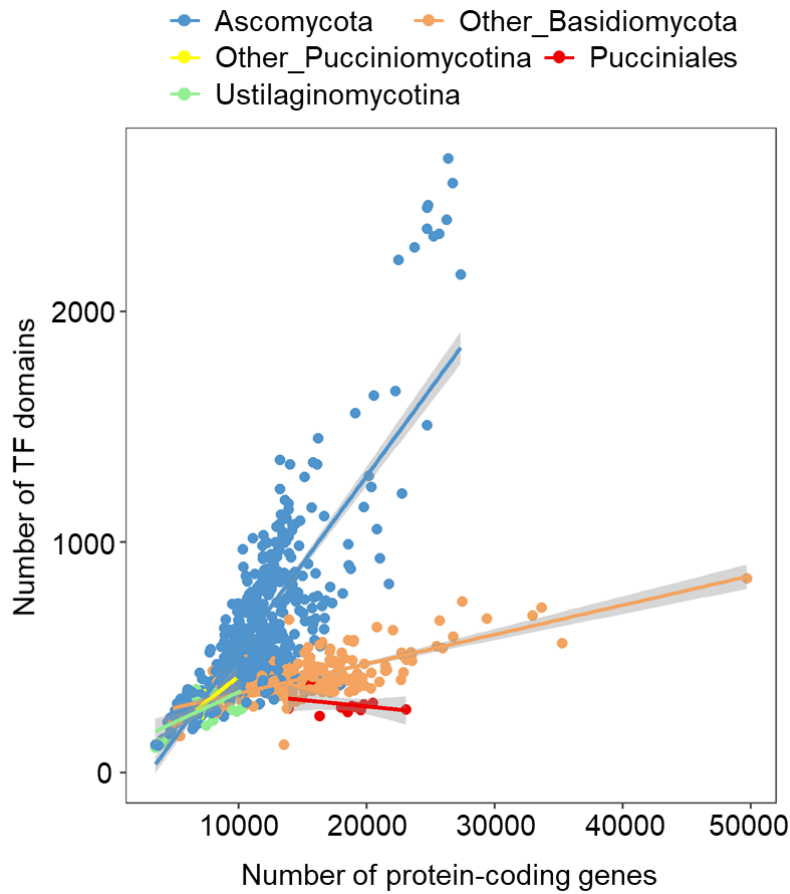


Figure 1. Distribution of the number of TF domains according to the number of protein-coding genes in fungal genomes.

Each dot represents a species with a color code according to fungal taxonomical groups. Linear trendlines are indicated for each taxonomical group with the same colour-code as for dots and the level of confidence interval (0.95) is represented in grey. Other_Basidiomycota: Basidiomycota excluding the subphyla Pucciniomycotina and Ustilaginomycotina. Other_Pucciniomycotina: Pucciniomycotina excluding the order Pucciniales.

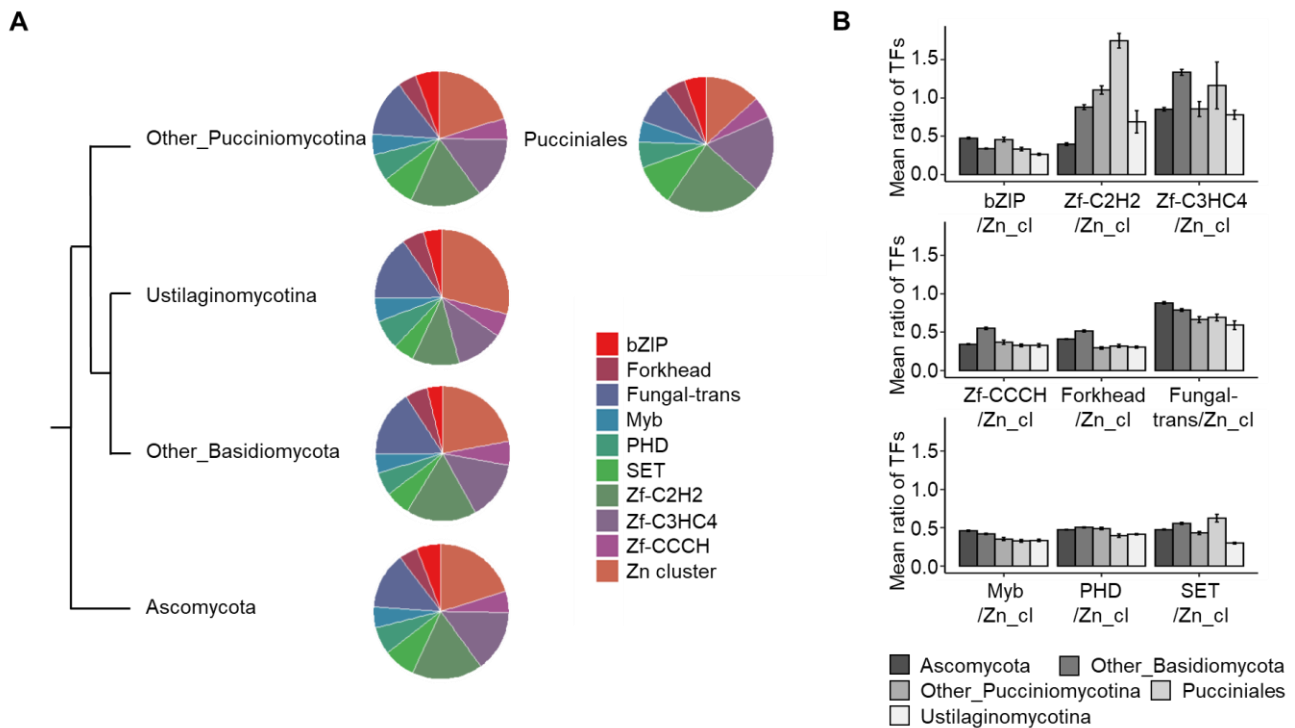


Figure 2. Overview of the proportion of the top 10 TF families in fungal genomes.

(A) Pie charts displaying the proportion of the top 10 TF families in fungal taxonomical groups. (B) Ratio comparison of each of the top 10 TF family related to the Zn-cluster family (largest family in Ascomycota and Basidiomycota) for each taxonomical group (average values and standard errors are shown). Other_Basidiomycota: Basidiomycota excluding the subphyla Pucciniomycotina and Ustilaginomycotina. Other_Pucciniomycotina: Pucciniomycotina excluding the order Pucciniales. Tree not to scale according to the fungal phylogeny displayed at the Joint Genome Institute Mycosm.

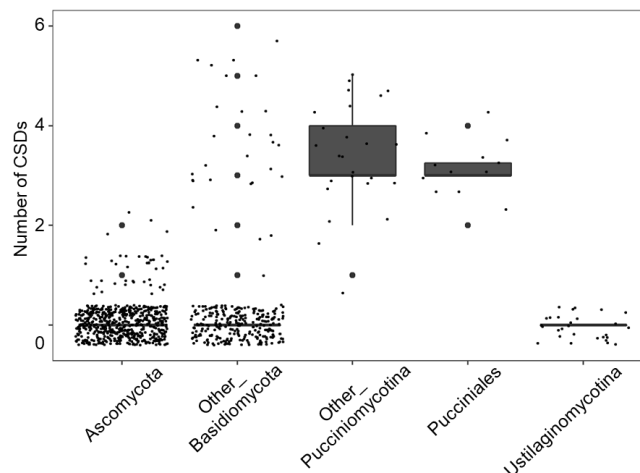


Figure 3. Abundance of cold-shock domains (CSDs) across different fungal taxonomic genomes.

Each small dot represents a species. Other_Basidiomycota: Basidiomycota excluding the subphyla Pucciniomycotina and Ustilaginomycotina. Other_Pucciniomycotina: Pucciniomycotina excluding the order Pucciniales. The boxplot outliers are indicated as big dots.

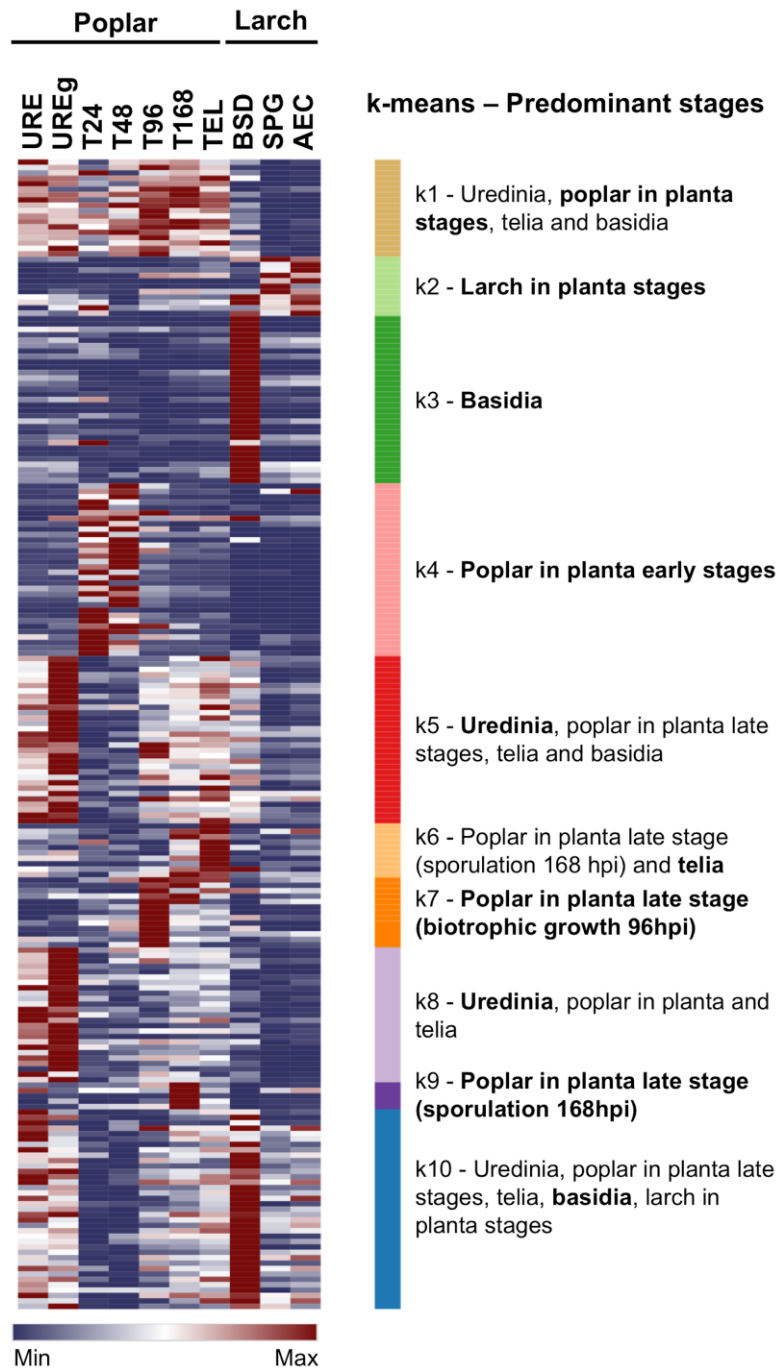


Figure 5. Global expression profiling of the poplar rust fungus TF genes across its life cycle.

Expression levels of 213 TF genes were collected from various life stages and grouped by k-means partitioning (k= 10). Life stages are organized according to the yearly poplar rust life cycle starting from stages on the telial host, poplar, followed by stages on the aecial host, larch. Color scale from blue to red represents normalized expression levels from 0 to maximum value at each stage. Biological stages showing high expression levels (i.e. above average values) in each cluster are depicted on the right side of the expression profile and the predominant stage (peak of expression) is highlighted in bold. URE and UREg, dormant and germinating urediniospores, respectively; T24 to T168, hours post-inoculation in a time course infection series on poplar leaves inoculated with urediniospores; TEL, telia; BSD, basidia; SPG, spermogonia; and AEC, aecia.

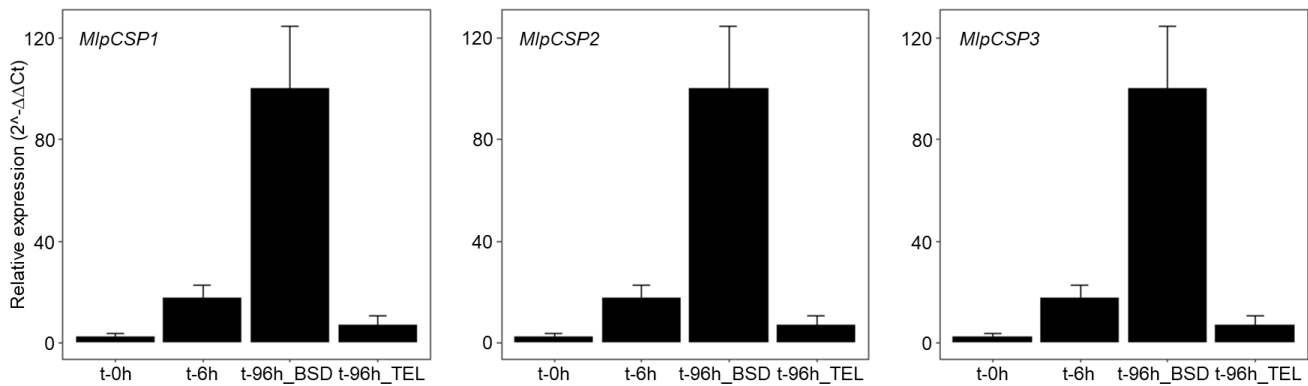


Figure 6. Expression profiles of *Melampsora larici-populina* CSP genes in a dormancy exit experimental setting.

Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed for MlpCSP1, MlpCSP2 and MlpCSP3 during a time-course dormancy exit series set on poplar leaves. Expression levels were measured in dormant telia collected from poplar leaves maintained in environmental conditions during winter (t-0h), in telia incubated in water for 6 h at room temperature (t-6h), in basidia differentiated from telia after 96 h at 19°C (t-96h_BSD) and in non-vernalized telia after 96 h at 19°C (t-96h_TEL). Mlp-ELF1a was used as a reference gene for the calculation of each transcript expression levels ($2^{-\Delta Ct}$). For each transcript, expression levels are presented as percentages of the highest level measured ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Error bars represent standard deviation of the mean from six biological replicates.

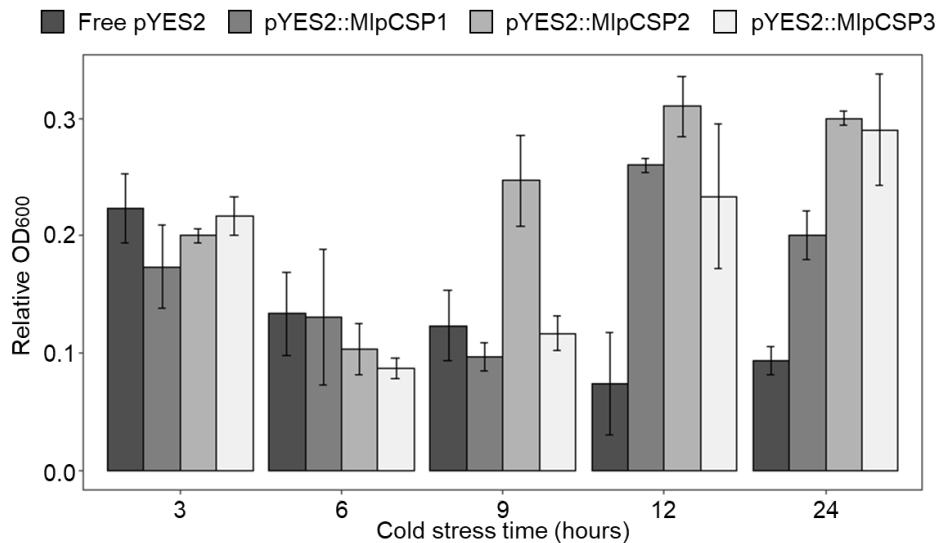


Figure 7. Cell growth recovery assay after cold stress exposure in yeast cells expressing *Melampsora larici-populina* CSP genes.

Yeast cells transformed with plasmids pYES2::MlpCSP1, pYES2::MlpCSP2 and pYES2::MlpCSP3 and empty pYES2 as a control were incubated in an inductive medium for 24 hours at 30°C. The ability of transformed yeast cells to tolerate cold stress was tested by placing the cells at -20°C during 3, 6, 9, 12 or 24 hours and back at 30°C for 12 hours of further growth. The relative cell densities were measured after the recovering step at 30°C (OD600) and compared to cell densities before freezing. Values correspond to the mean of three biological replicates and error bars indicate the standard deviation of the mean.

Tables

Table 1. Fungal transcription factor families according to their DNA-binding domains (associated PFAM).

TF gene family name	Associated PFAM (ID: name)
AFT	PF08731: Transcription factor, AFT
AP2	PF00847: AP2 domain
AT-hook	PF02178: AT-hook, DNA-binding motif
BRF1	PF07741: Brf1-like, TBP-binding domain
bZIP	PF00170: bZIP transcription factor; PF07716: Basic-leucine zipper (bZIP) region
CBFB-NFYA	PF02045: CCAAT-binding transcription factor (CBF-B/NF-YA), subunit B
CBFD_NFYB_HMF	PF00808: Histone-like transcription factor (CBF/NF-Y) and archaeal histone
Copper-fist	PF00649: Copper fist DNA-binding domain
CP2	PF04516: CP2 transcription factor
CSD	PF00313: Cold-shock protein (CSP), DNA-binding
DDT	PF02791: DDT domain
DP	PF08781: Transcription factor, DP
DUF4347	PF14252: Domain of unknown function (DUF4347)
DUF702	PF05142: Domain of unknown function (DUF702)
FAR1	PF03101: FAR1 DNA-binding domain
Forkhead	PF00250: Forkhead domain; PF00498: Forkhead-associated (FHA) domain
Fungal-trans	PF04082: Fungal specific transcription factor domain; PF11951: Fungal specific transcription factor domain
GCM	PF03615: GCM motif protein
GCR1-C	PF12550: Transcriptional activator of glycolytic enzymes
HLH	PF00010: Helix-loop-helix DNA-binding domain
HMG-box	PF00505: High mobility group (HMG) box; PF09011: High mobility group (HMG)-box domain; PF04769: Mating-type protein MAT alpha 1 HMG-box
Homeobox/Homeodomain	PF00046: Homeobox/Homeodomain; PF05920: Homeobox KN domain
HSF DNA-bind	PF00447: Heat shock factor (HSF)-type, DNA-binding
HTH	PF01381: Helix-turn-helix; PF13560: Helix-turn-helix domain
KilA-N	PF04383: KilA-N domain
Myb	PF00249: Myb-like, DNA-binding domain; PF13837: Myb/SANT-like, DNA-binding domain; PF13921: Myb-like, DNA-binding domain
NDT80_PhoG	PF05224: NDT80/PhoG-like, DNA-binding family
Not1	PF04054: CCR4-Not complex component, Not1
NOT2_3_5	PF04153: NOT2/NOT3/NOT5 family
PC4	PF02229: Transcriptional Coactivator p15 (PC4)
PHD	PF00628: PHD-finger; PF13831: PHD-finger
PHF5	PF03660: PHF5-like protein
Rap1-DNA-binding	PF09197: Rap1, DNA-binding
RFX-DNA-binding	PF02257: RFX DNA-binding domain
S1FA	PF04689: DNA-binding protein, S1FA
SET	PF00856: SET domain
SGT1	PF07093: SGT1 protein

SRF-TF	PF00319: SRF-type transcription factor (DNA-binding and dimerisation domain)
STE	PF02200: STE-like transcription factor
T-box	PF00907: T-box
TBP	PF00352: Transcription factor, TFIID (or TATA-binding protein, TBP)
TEA	PF01285: TEA/ATTS domain
Tfb2	PF03849: Transcription factor, Tfb2
TRAUB	PF08164: Apoptosis-antagonizing transcription factor, C-terminal
Vhr1	PF04001: Transcription factor, Vhr1
WRKY	PF03106: WRKY DNA-binding domain
YL1	PF05764: YL1 nuclear protein
Zf-C2H2	PF00096: Zinc finger, C2H2-type; PF12171: Zinc finger, double-stranded RNA-binding; PF13894: C2H2-type zinc finger; PF13912: C2H2-type zinc finger; PF13913: Zinc finger, C2HC-type
Zf-C3HC4	PF00097: Zinc finger, C3HC4-type (RING finger); PF13920: Zinc finger, C3HC4-type (RING finger); PF13923: Zinc finger, C3HC4-type (RING finger)
Zf-C5HC2	PF02928: C5HC2 zinc finger
Zf-CCCH	PF00642: Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type (and similar)
Zf-GATA	PF00320: GATA zinc finger
Zf-HC5HC2H	PF13771: PHD-like zinc-binding domain; PF13832: PHD-zinc-finger like domain
Zf-met	PF12874: Zinc finger, C2H2-type
Zf-NF-X1	PF01422: NF-X1 type zinc finger
Zf-TAZ	PF02135: Zinc finger, TAZ
Zn cluster	PF00172: Fungal Zn(2)-Cys(6) binuclear cluster domain

Table 2. The Top 10 TF families in fungal genomes.

TF gene family name	Occurrence (x1000)	TF repertoire proportion (%)
Zn cluster	130	28,07
Fungal-trans	111	24,12
Zf-C2H2	45	9,83
Zf-C3HC4	30	6,53
SET	15	3,27
PHD	15	3,18
Myb	13	2,90
Forkhead	13	2,84
bZIP	13	2,83
Zf-CCCH	12	2,63

Table 3. TF families significantly over- or under-represented in Pucciniales related to other fungal taxonomical groups.

TF gene family name	Comparison	Number of groups	Related taxonomical groups*
CSD	Over-represented	3	Ascomycota (P<0,0001); Other_Basidiomycota (P<0,0001); Ustilaginomycotina (P<0,0001)
STE	Over-represented	2	Other_Pucciniomycotina (P<0,001); Ustilaginomycotina (P<0,0001)
Homeobox/Homeodomain	Over-represented	1	Ustilaginomycotina (P<0,01)
HSF DNA-bind	Over-represented	1	Ascomycota (P<0,0001)
PC4	Under-represented	3	Ascomycota (P<0,0001); Other_Basidiomycota (P<0,0001); Other_Pucciniomycotina (P<0,0001)
Forkhead	Under-represented	2	Ascomycota (P<0,05); Other_Basidiomycota (P<0,0001)
Zf-C2H2	Under-represented	2	Ascomycota (P<0,0001); Other_Basidiomycota (P<0,05)
bZIP	Under-represented	1	Ascomycota (P<0,05)
CP2	Under-represented	1	Ascomycota (P<0,0001)
HMG	Under-represented	1	Other_Basidiomycota (P<0,001)
NDT80_PhoG	Under-represented	1	Ascomycota (P<0,0001)
Zf-CCCH	Under-represented	1	Other_Basidiomycota (P<0,05)
Zf-GATA	Under-represented	1	Other_Basidiomycota (P<0,001)

*P-value level after performing a pairwise comparison with a Dunn test (Bonferroni correction)

**3. Résultats complémentaires : Article n°4 – A
comprehensive collection of transcriptome data to
support life cycle analysis of the poplar rust fungus
*Melampsora larici-populina***

Pamela Guerillot, Emmanuelle Morin, Annegret Kohler, Clémentine Louet, Sébastien Duplessis

Article de recherche en libre accès sur le serveur BioRxiv depuis le 26 juillet 2021.

<https://www.BioRxiv.org/content/10.1101/2021.07.25.453710v1>

A comprehensive collection of transcriptome data to support life cycle analysis of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*

Pamela Guerillot¹, Emmanuelle Morin¹, Annegret Kohler¹, Clémentine Louet¹, Sébastien Duplessis^{1*}

¹Université de Lorraine, INRAE, UMR 1136 IAM, F-54000 Nancy, France

*Corresponding author:

Sébastien Duplessis

Université de Lorraine, INRAE, UMR 1136 IAM

Interactions Arbres-Microorganismes

54000 Nancy, France

Sebastien.duplessis@inrae.fr

ORCID: 0000-0002-2072-2989

Abstract

Melampsora larici-populina is an obligate biotrophic plant pathogen responsible for the poplar rust disease. This fungus belongs to the taxonomical order Pucciniales and exhibits a complex heteroecious and macrocyclic life cycle, i.e. it has the capacity to infect two unrelated host plants, larch and poplar, and to form five distinct spore types through the year. The *M. larici-populina* genome has been sequenced and annotated in 2011 and since, different transcriptomic analyses were conducted at different stages with oligoarrays and later on with RNA-Seq covering most of its life cycle. Here, we collected published transcriptome data for the poplar rust fungus, transposed them for the version 2 of the genome now available at the Joint Genome Institute Mycocosm website and performed normalization of different oligoarray datasets on one hand, and of RNA-Seq on the other hand. We report a comprehensive normalized dataset for this fungus, made available for the community, which allows life cycle transcriptomics analysis.

Key-words: Pucciniales, oligoarrays, RNA-Seq, heteroecious, macrocyclic.

1. Research background

Rust fungi belong to the taxonomical order Pucciniales that consists of more than 7000 species (Aime and McTaggart, 2021). These obligate biotrophic fungi infect a large number of host plants in which they cause important damages. They are a threat to food security and their repeated epidemics are under surveillance worldwide (Figueroa et al. 2017, Lorrain et al. 2019). Since their trophic status impedes easy manipulation under laboratory conditions -i.e. they must be multiplied in living host plants and there are no routine genetic manipulations- genomics and transcriptomics have been approaches of choice which have allowed great progress in the past ten years in the understanding of their biology (Aime et al. 2017; Bakkeren and Szabo, 2020). Rust fungi exhibit the most complex life cycle among fungi with (i) the capacity to alternate onto two different taxonomically unrelated host plants (called heteroecism in such rust fungi), (ii) the production of up to five different spore types through the year (called macrocyclic rust fungi) and (iii) the presence of a dormancy period during the winter season for rust fungi found in temperate, montane or boreal conditions (Duplessis et al. 2021). Despite such an intriguing biological cycle marked by many different developmental and environmental controlled stages, most of the transcriptomics studies conducted in rust fungi were limited to a few conditions (Duplessis et al. 2012; Duplessis et al. 2014). Indeed, the majority of the transcriptome studies were focused on the host in which epidemics and major symptoms are recorded with time-course

infection studies, isolation of infection structures or spore germination and host colonization (Lorrain et al. 2019). Only recently, a larger number of biological stages were considered for transcriptomics in a handful of rust fungi (for a recent review, see Duplessis et al. 2021).

M. larici-populina is responsible for the poplar rust disease and causes important loss in poplar plantations worldwide (Steenackers et al. 1996). It was a pioneer target for rust genomics (Duplessis et al. 2011a). Several transcriptome analyses were performed in the last decade aiming at studying genetic programs expressed at specific stages of the life cycle, and particularly in the different spores that are produced on the two host plants, larch and poplar (Duplessis et al. 2021).

As more genomes are made available within the fungal order Pucciniales, more transcriptome studies will be carried and comparative transcriptomics through cross-comparison of datasets between species will foster a better understanding of the biology of these fungi. Our goal here is to provide a comprehensive consolidated dataset of life cycle expression profiling for the poplar rust *M. larici-populina* that is up-to-date with the most recent version of the genome (version 2) available at the JGI Mycocosm, that can be easily explored and compared with other rust. Moreover, rust fungal genomes exhibit specific genomic features such as a large genome size, a high content in transposable elements and expanded gene catalogs (Aime et al. 2017). Altogether, these features render genome sequencing and assembly tedious and time-

consuming, even with long molecule sequencing technologies. Thus, transcriptomics of rust species without a reference genome is still a favorite approach and more analysis may be expected in the coming years. Comparison to the poplar rust genome annotation and to the life cycle transcriptomics dataset reported here will allow researchers in the rust community to rapidly compare their data and strengthen their hypotheses.

2. Methodology

Preliminary note: Although all transcriptomics data were produced in our laboratory, we decided to realize data collection and comparison as if we were an external user, collecting published expression datasets from the NCBI transcriptome repository Gene Expression Omnibus. Additional datasets were deposited in the FigShare repository (doi: 10.6084/m9.figshare.15048822). In case of discontinuity of service, the datasets are available from the corresponding author.

Original *M. larici-populina* transcriptomic datasets

Transcriptomics data established with the first version of the *M. larici-populina* reference genome isolate 98AG31 were retrieved from the NCBI Gene Expression Omnibus portal (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) using source data identifiers GSE21624, GSE49099, and GSE106863 described in the related publications: dormant and germinated urediniospores and time course infection of poplar leaves from 24 to 168 hours post-inoculation (hpi) by urediniospores (Nimblegen oligoarrays; Duplessis et al., 2011b); telia collected in autumn before winter dormancy (Nimblegen oligoarrays; Hacquard et al., 2013); basidia produced from telia right after exiting dormancy, and pycnia and aecia produced on larch needles after infection with basidiospores (Illumina HiSeq RNA-Seq; Lorrain et al., 2018). All RNA sources correspond to the genome reference isolate 98AG31, except for telia, which were isolated from natural samples (Hacquard et al., 2013).

Processing of oligoarray expression datasets

In the original publications and GEO series, expression profiles were established based on the gene annotation of *M. larici-populina* genome version 1 (16,499 genes). The current genome annotation (version 2) contains 19,550 genes, of which only a portion overlaps, making direct comparison limited. Genome annotations are available from the JGI Mycocosm website (<https://mycocosm.jgi.doe.gov>; Grigoriev et al. 2014). The initial expression data were re-analyzed in an attempt to transpose available expression data to the version 2 of the poplar rust genome annotation. First, the oligonucleotide sequences from the custom-commercial Roche-NimbleGen arrays (GEO platform GPL10350) were compared to the transcripts annotated in the version 2 of the genome using the blastn tool and were assigned to a given transcript only if the sequence showed a strict identity of 100% with a given oligonucleotide. Out of 72,038 oligoprobes, 50,676 matched to a transcript from the version 2 (with 1 to 4 probes per transcript). These 50,676 oligoprobes were associated with 13,804 transcripts from the version 2 of the *M. larici-populina* genome. These oligoprobes were selected along with 1,064 random probes used to determine background levels and are presented in the Dataset 1. Then, the raw fluorescence values assigned to the oligonucleotides in the GSE21487 and GSE49099 series were retrieved from the GEO website and all these data were analyzed with the

ARRAYSTAR software (DNASTAR, Inc. Madison, WI, USA) following the procedure described in the original publications. ARRAYSTAR generates a normalization of the expression level of each transcript across oligoprobes and across biological replicates of the different biological stages considered. The major difference here with the original publications, is the normalization of all samples from Duplessis et al. (2011b) and Hacquard et al. (2013) altogether. The normalized expression values of the 13,804 transcripts are presented in the Dataset 2.

Processing of RNA-Seq expression datasets

Illumina RNA-Seq raw data from GSE106863 (Lorrain et al. 2018) were re-analyzed using the *M. larici-populina* genome version 2 following a similar procedure than in the original publication and the updated RNA-Seq analysis is now available at GEO as series GSE180724. Briefly, paired end reads from *M. larici-populina* basidia, spermogonia (also called pycnia) and aecia were mapped to transcripts from the poplar rust genome version 2 using the CLC Genomics Workbench 12.0 software (QIAGEN Digital Insights). Based on the CLC quality control, five nucleotides were removed at the 5' and 3' ends of the reads and the trimmed sequences were mapped onto *M. larici-populina* transcripts (https://mycocosm.jgi.doe.gov/Mellp2_3/; Mellp2_3_GeneCatalog_transcripts_20151130.nt.fasta) using the CLC RNA-Seq Analysis procedure considering 90% identity over 90% of the sequence length (10 hits maximum per read). The unique reads values were retrieved for each transcript and data analysis and normalization were performed with DESeq2 (v1.32.0; Love et al. 2014) as described in Lorrain et al. 2018. Unique reads obtained after the CLC RNA-Seq analysis are available in the series GSE180724 and all normalized read counts obtained from DESeq2 are available in the Dataset 3. The R program version 4.1.0 (R core team, 2020) was used for presenting distribution of expression data in boxplots, through the packages tidyverse v1.3.1 (Wickham et al. 2019) and ggplot2 v3.3.5 (Wickham, 2009).

3. *M. larici-populina* life cycle transcriptomics dataset description

Expression values obtained with NimbleGen oligoarrays and RNA-Seq for the 13,804 transcripts annotated in the *M. larici-populina* genome version 2 were combined into a single Dataset 4 in order to view expression levels at the following life cycle stages: dormant and germinated urediniospores, time course infection of poplar leaf tissues by urediniospores at 24, 48, 96 and 168 hours post-inoculation (hpi), early telia in autumn, basidia formed in spring, and spermogonia (pycnia) and aecia produced after 7 and 14 days on larch needles. The box-plots in Figure 1 show the distribution of expression data at the different stages. Attempts were made to cross normalize the oligoarrays and RNA-Seq data (e.g. quantile normalization) to help comparison, however low expression values close to (or below) background systematically artificially rose at too high levels for accurate use of the data (not shown). The best option remained to place the life stages expression levels next to each other with the knowledge of the differences and limits in the methods used for data generation. The Table 1 shows the levels of the quartiles from the box-plots displayed in Figure 1, which allows to determine whether the expression levels in the dataset should be considered below background, very low (below quartile 1), medium low or medium high (between the median and adjacent quartiles 1

and 3, respectively), or high (between quartile 3 and maximum value). Since cross-normalization was not satisfying, while exploring Dataset 4, users must always have in mind the intrinsic nature of the data and the distribution of expression values as depicted in Figure 1.

Datasets

Dataset 1 to 4 are available in the FigShare repository under doi: [10.6084/m9.figshare.15048822](https://doi.org/10.6084/m9.figshare.15048822).

Dataset 1. Match between oligonucleotides of the GEO platform GPL10350 and genes from the *M. larici-populina* genome version 2.

Dataset 2. Normalized expression values of 13,804 transcripts in the *M. larici-populina* genome version 2 detected at life cycle stages initially reported in Duplessis et al. (2011b) and Hacquard et al. (2013) from oligoarray-based transcriptomics.

Dataset 3. Normalized expression values of 19,550 genes from *Melampsora larici-populina* genome version 2 determined from life cycle stages reported in Lorrain et al. (2018) from RNA-Seq transcriptomics.

Dataset 4. *Melampsora larici-populina* life cycle transcriptomics dataset. Expression values of 13,804 genes in the *M. larici-populina* genome version 2 determined with oligoarrays and RNA-Seq experiments reported in Duplessis et al. (2011a), Hacquard et al. (2013) and Lorrain et al. (2018).

Acknowledgements

AK, CL, EM and SD are supported by the French “Investissement d’Avenir” program ANR- 11-LABX-0002-01, Lab of Excellence ARBRE. CL is supported by a PhD fellowship from the Region Lorraine and the French National Research Agency (ANR-18-CE32-0001, Clonix2D).

References

Aime MC, MacTaggart AR, Mondo SJ, Duplessis S. 2017. Phylogenetics and phylogenomics of rust fungi. *Adv. Fungal Genet.* 100: 267–307.
 Aime MC, McTaggart AR. 2021. A higher-rank classification for rust fungi, with notes on genera. *Fungal Syst. Evol.* 7: 21–47.
 Bakkeren G, Szabo LJ. 2020. Progress on molecular genetics and manipulation of rust fungi. *Phytopathology* 110: 532–543
 Duplessis S, Cuomo CA, Lin YC, Aerts A, Tisserant E, Veneault-Fourrey C, Joly DL, Hacquard S, Amselem J, Cantarel B et al. 2011a. Obligate

biotrophy features unravelled by the genomic analysis of rust fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 9166–9171.
 Duplessis S, Hacquard S, Delaruelle C, Tisserant E, Frey P, Martin F, Kohler A. 2011b. *Melampsora larici-populina* transcript profiling during germination and timecourse infection of poplar leaves reveals dynamic expression patterns associated with virulence and biotrophy. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 24: 808–818.
 Duplessis S, Joly DJ, Dodds PN. 2012. Rust effectors. In: Martin F, Kamoun S, eds. *Effectors in plant-microbes interactions*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 155–193.
 Duplessis S, Bakkeren G, Hamelin R. 2014. Advancing knowledge on biology of rust fungi through genomics. *Adv. Bot. Res.* 70: 173–209.
 Duplessis S, Lorrain C, Petre B, Figueroa M, Dodds P, Aime MC. 2021. Host Adaptation and virulence in heteroecious rust fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 59: 17.
 Figueroa M, Hammond-Kosack KE, Solomon PS. 2017. A review of wheat diseases: a field perspective. *Mol. Plant Pathol.* 19: 1523–1536.
 Grigoriev IV, Nikitin R, Haridas S, Kuo A, Ohm R, Ollilar R, Riley R, Salamov A, Zhao X, Korzeniewski F, et al. 2014. MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Res.* 42: D699–D704.
 Hacquard S, Delaruelle C, Frey P, Tisserant E, Kohler A, Duplessis S. 2013. Transcriptome analysis of poplar rust telia reveals overwintering adaptation and tightly coordinated karyogamy and meiosis processes. *Frontiers Plant Sci.* 4: 456.
 Lorrain C, Marchal C, Hacquard S, Delaruelle C, Petrowski J, Petre B, Hecker A, Frey P, Duplessis S. 2018. The rust fungus *Melampsora larici-populina* expresses a conserved genetic program and distinct sets of secreted protein genes during infection of its two host plants, larch and poplar. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 31: 695–706.
 Lorrain C, Gonçalves Dos Santos KC, Germain H, Hecker A, Duplessis S. 2019. Advances in understanding obligate biotrophy in rust fungi. *New Phytol.* 222: 1190–1206.
 Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15: 550.
 R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.r-project.org/index.html>.
 Steenackers J, Steenackers M, Steenackers V, Stevens M. 1996. Poplar diseases, consequences on growth and wood quality. *Biomass Bioenerg.* 10: 267–274.
 Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, D’Agostino McGowan L, François R, Golemund G, Hayes A, Henry L, et al. 2019. Welcome to the tidyverse. *J. Open Source Software* 4: 1686.
 Wickham H. 2009. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag, New York.

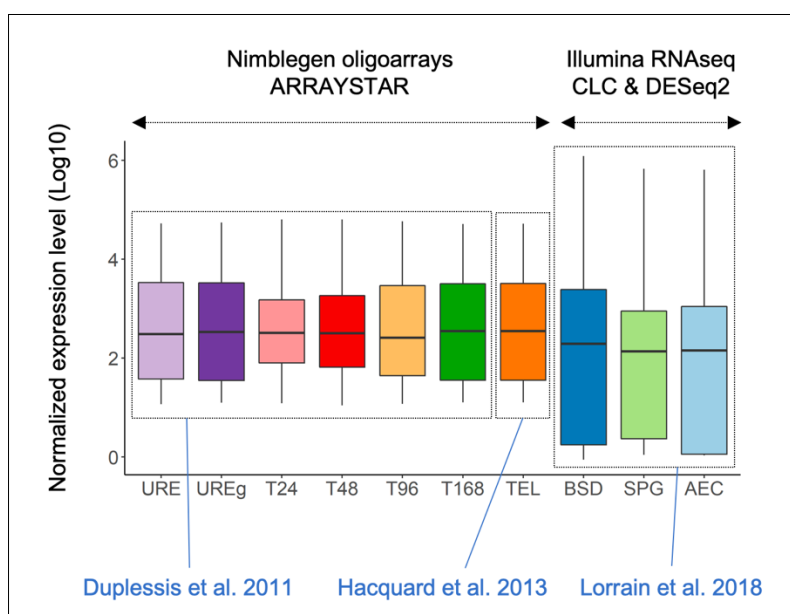


Figure 1. Distribution of normalized expression levels at various stages of the *M. larici-populina* life cycle. Boxplots showing the distribution of average normalized expression values (fluorescence levels or sequencing counts). The top and bottom of boxes correspond to the 25 and 75 % quartiles, respectively. The middle line represents the median. Bottom and top lines refer to the min and max values respectively. The source of the data, i.e. publication, transcriptome approach and softwares, are indicated below and above the box-plots, respectively.

Table 1. Distribution of normalized expression levels of the *Melampsora larici-populina* life cycle transcriptomics dataset.

	Oligorrays							RNA-Seq		
Life stages ^a	URE	UREg	T24	T48	T96	T168	TEL	BSD	SPG	AEC
Background ^b	18	18	44	30	19	16	16	9	6	20
Min.	15	15	17	14	15	14	14	1	1	1
Quartile q1	38	36	165	93	49	36	36	2	3	2
Median	309	350	526	425	295	366	360	196	138	158
Quartile q3	3,377	3,376	1,615	1,954	2,989	3,177	3,275	2,425	904	1,130
Max.	42,536	42,106	62,884	57,820	51,760	47,344	48,967	1,175,964	653,273	541,268

^a URE, dormant urediniospores; UREg, germinated urediniospores; T24, T48, T96 and T168, hours post-inoculation during time course infection of poplar leaves; TEL, telia; BSD, basidia; SPG, spermatogonia at 1 week post-inoculation on larch needles; AEC, aecia at 2 weeks post inoculation on larch needles.

^b background levels were established from 1063 random oligonucleotides on the Nimblegen custom oligoarrays and background count values for RNAseq were considered at an arbitrary level of 10 unique reads.

Chapitre V – Discussion générale

1. L'interaction peuplier-rouille du peuplier : questions et stratégies de recherche dans l'UMR 1136 IAM

L'UMR 1136 IAM mène un projet scientifique transversal entre les trois équipes composant l'unité qui vise à étudier les mécanismes et l'évolution des interactions entre le peuplier et la rouille du peuplier à travers un continuum d'approches allant de la biochimie des protéines jusqu'à l'étude de l'évolution des populations du champignon. Depuis 2003, plusieurs travaux de thèse ont alimenté les connaissances sur la biologie du champignon en alliant une ou plusieurs disciplines de recherche que maîtrisent les chercheurs de cette unité (Figure 29). Dans mon travail de thèse, l'UMR a décidé de réunir un large ensemble de compétences, en génétique et génomique des populations, en génomique et transcriptomique, et en biochimie des protéines, afin d'étudier de manière intégrée plusieurs aspects du processus infectieux chez le champignon.

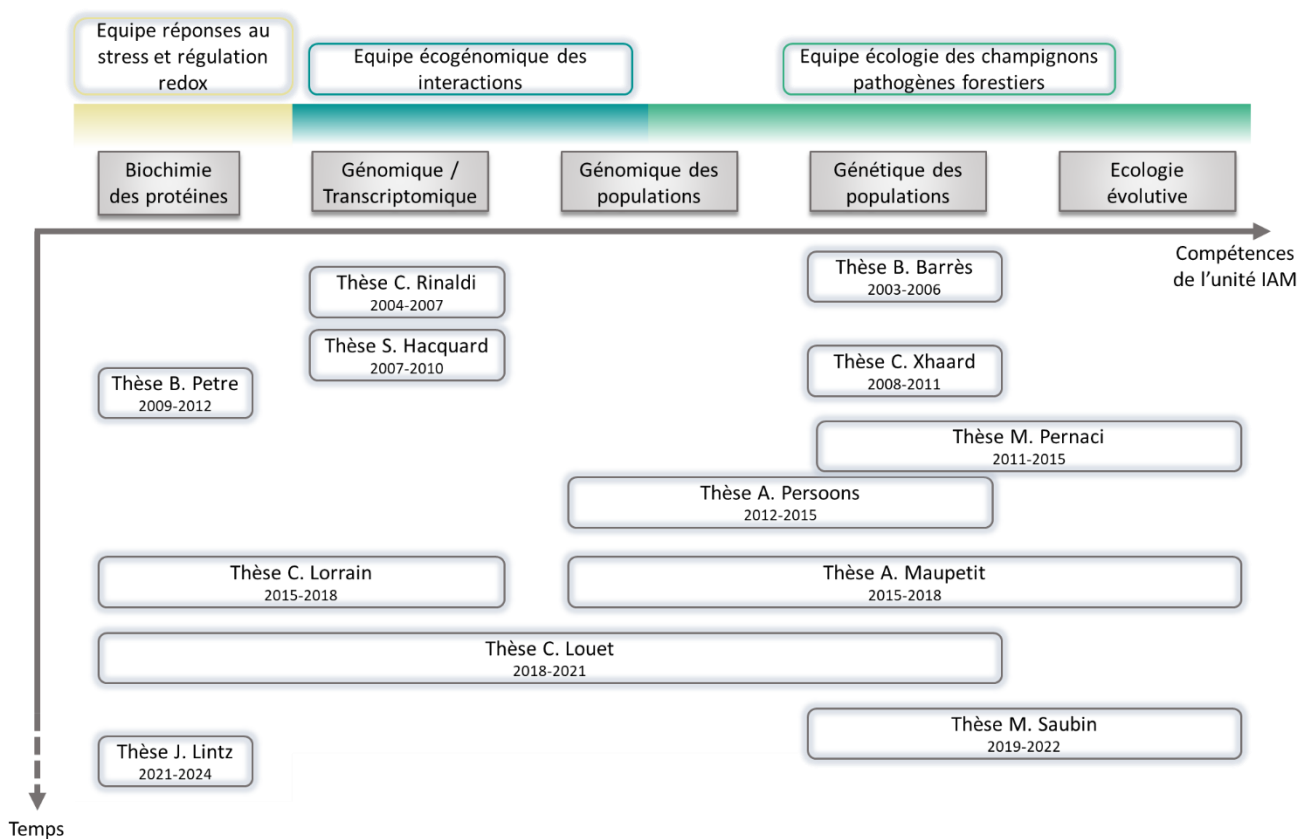


Figure 29. Le projet peuplier-rouille du peuplier : un projet d'interface de l'UMR 1136 IAM entre les différentes équipes composant l'UMR et formant un continuum de disciplines de recherche.

Toutes les thèses apparentées au projet peuplier-rouille du peuplier de l'UMR 1136 IAM sont représentées dans cette figure. Elles sont positionnées au cours du temps, selon les principales disciplines exercées et selon les équipes au sein desquelles elles ont évolué. Il est assumé dans cette figure de ne pas être exhaustif quant à la diversité des compétences de l'unité.

Mon travail a permis de compléter nos connaissances sur la biologie de *M. larici-populina* en décrivant dans un premier temps les processus moléculaires et génétiques responsables du contournement de la résistance RMIp7. L'analyse évolutive au locus candidate *AvrMlp7* sur un échantillonnage temporel a permis de mettre en évidence l'augmentation significative des fréquences alléliques de deux altérations au locus en association avec un remplacement génétique des populations et l'émergence d'individus virulents a7. La possibilité de décrypter précisément un processus de contournement représente une avancée majeure pour la compréhension et la prédiction de l'évolution des interactions moléculaires entre les Pucciniales et leurs hôtes. Le second volet de mon projet de thèse a permis d'amorcer les analyses fonctionnelles du gène candidat *AvrMlp7* et d'identifier sa localisation chloroplastique. Les résultats obtenus complètent le projet de recherche de l'unité, mais au-delà, alimentent un front de science émergent dans l'étude des effecteurs des agents pathogènes (et plus particulièrement des Pucciniales) qui est leur localisation chloroplastique. Enfin, l'annotation des génomes fongiques sur la base des données mises à disposition par le JGI, m'ont permis de me concentrer sur les facteurs de transcription de *M. larici-populina* et de montrer à travers une analyse de génomique comparative et l'étude de leur expression au cours du cycle de vie que la famille protéique de type 'cold-shock' jouait un rôle vraisemblablement important lors de la levée de dormance du pathogène. Ces travaux permettent ainsi d'amorcer l'analyse comparative des différents programmes génétiques exprimés au cours du cycle de vie des Pucciniales, à des stades peu étudiés jusqu'à présent.

Ce dernier chapitre replace mes travaux de thèse dans le contexte général des interactions moléculaires hôte-pathogène et aborde les questions auxquelles le domaine scientifique et le projet de l'UMR sont confrontés. J'aborderai les points de discussion liés aux articles et résultats présentés dans les chapitres précédents et les perspectives associées. De plus, je montrerai dans quelle mesure ces travaux nous permettent d'avancer dans la compréhension des mécanismes d'interaction plantes-microorganismes. Premièrement, je vais recontextualiser les dix années de recherche sur le contournement de la résistance RMIp7 abordés dans le [chapitre II](#), notamment en explicitant la complémentarité des travaux réalisés et les apports de ces derniers pour les futurs travaux de recherche. Deuxièmement, je discuterai plus spécifiquement de la caractérisation fonctionnelle du gène candidat *AvrMlp7*, abordée dans le [chapitre III](#), pour identifier sa localisation et sa fonction. Je me concentrerai ensuite sur des aspects de génomique et de transcriptomique, abordés dans le [chapitre IV](#), en précisant les avancées réalisées dans la compréhension de la biologie du champignon et de l'infection associée. Enfin, j'évoquerai les avancées réalisées et les limites intrinsèques imposées par les pathosystèmes non-modèles, et plus particulièrement par les microorganismes biotrophes obligatoires.

2. Pouvoir remonter dans le temps pour mieux comprendre les scénarios de contournement : cas de la résistance RMIp7

2.1. Un bouleversement populationnel en lien avec un locus unique soumis à sélection

L'un des objectifs du projet transversal évoqué ci-dessus est de décrire les effets démographiques d'un contournement de résistance par *M. larici-populina* et d'en identifier les déterminants génétiques. Les dix dernières années de recherche sur ce sujet ([Figure 30](#)) ont mis en évidence un impact très fort du contournement de la résistance RMIp7 sur la démographie et la génétique des populations de cet agent pathogène ([Persoons et al. 2017](#); [Xhaard et al. 2011](#)). Les études de génétique des populations ont d'abord identifié deux groupes génétiques distincts d'après une analyse d'échantillons contemporains ([Xhaard et al. 2011](#)), puis un troisième avec l'ajout de la dimension temporelle et d'isolats collectés avant le contournement ([Persoons et al. 2017](#)). Ces résultats montrent de façon cohérente que la structure génétique des populations de *M. larici-populina* a été façonnée quasi exclusivement par les événements démographiques et de sélection résultant de la forte pression de sélection due à la plantation massive des peupliers porteurs de la résistance RMIp7 ([Pinon and Frey 2005](#)). En effet, ces groupes génétiques sont notamment distinguables par l'abondance des phénotypes avirulents A7 (dont groupe génétique ancestral « Fossile » et le groupe génétique « Sauvage » ayant échappé aux pressions de sélection liées aux plantations de peupliers) ou à l'inverse la prédominance des phénotypes virulents a7 (dans le groupe émergent « Cultivé »). Même si le scénario démographique expliquant l'origine de ce nouveau groupe génétique Cultivé reste discuté, l'identification des déterminants génétiques responsables du contournement a été au cœur de l'attention des recherches de l'UMR. En effet, des approches de génomique des populations par scan génomique et GWAS ont conduit avec succès à l'identification d'un unique gène d'avirulence candidat *AvrMlp7*, localisé sur le chromosome 15 de *M. larici-populina* ([Persoons et al. 2021](#)). Le [chapitre II](#) de ce projet de thèse a donc eu pour objectif de caractériser plus finement l'évolution de ce locus candidat et de contextualiser les résultats par rapport à l'histoire évolutive de cet agent pathogène.

En combinant des approches de génétique des populations et des approches moléculaires, nous avons mis en évidence deux variations au niveau du locus candidat *AvrMlp7* contribuant à la virulence a7 en altérant l'allèle sauvage avirulent : une mutation non-synonyme dans la séquence codante (allèle muté avr) et une large délétion du gène (allèle \emptyset). Plus intéressant encore, ces deux variations sont deux

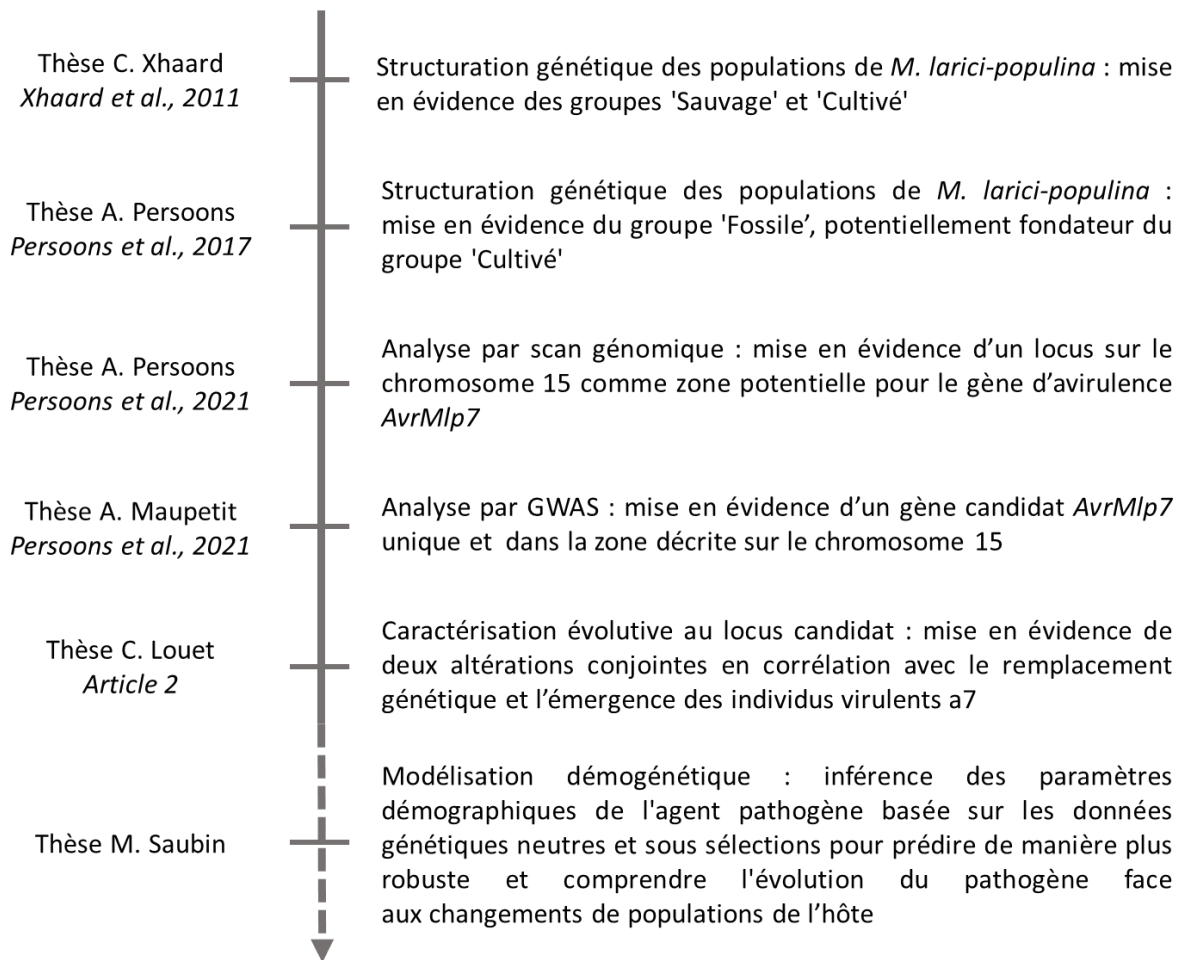


Figure 30. Dix années de travaux de recherche doctorale en génétique et génomique des populations qui alimentent les connaissances sur les capacités de contournement des gènes de résistance par *Melampsora larici-populina*.

L'ensemble des résultats majeurs des travaux de thèse de l'UMR 1136 IAM liés au contournement de la résistance RMIp7 est représenté de manière chronologique, dans cette figure.

mécanismes moléculaires non-exclusifs qui peuvent être trouvés en association au sein du génotype diploïde de cet agent pathogène. Enfin, l'analyse temporelle a révélé la présence à la fois de l'allèle muté *avr* et de la délétion \emptyset au moins cinq années avant le contournement de la résistance RMIp7, au sein des tout premiers échantillons disponibles dans la collection. Une fois la résistance contournée, les deux allèles conduisant à la virulence ont augmenté en fréquence rapidement et concomitamment par sélection au sein des individus virulents a7. Enfin, la disparition de l'allèle sauvage *Avr*, l'émergence du groupe génétique Cultivé et l'augmentation en fréquence des individus virulents a7 sont trois événements qui se sont déroulés de manière conjointe ([Figure 31](#)), renforçant encore plus le rôle du gène candidat *AvrMlp7* comme l'unique déclencheur du contournement de la résistance RMIp7 (cf. [Chapitre II](#)). Cette étude validerait ainsi de manière indirecte que ce gène candidat est bien le gène d'avorulence.

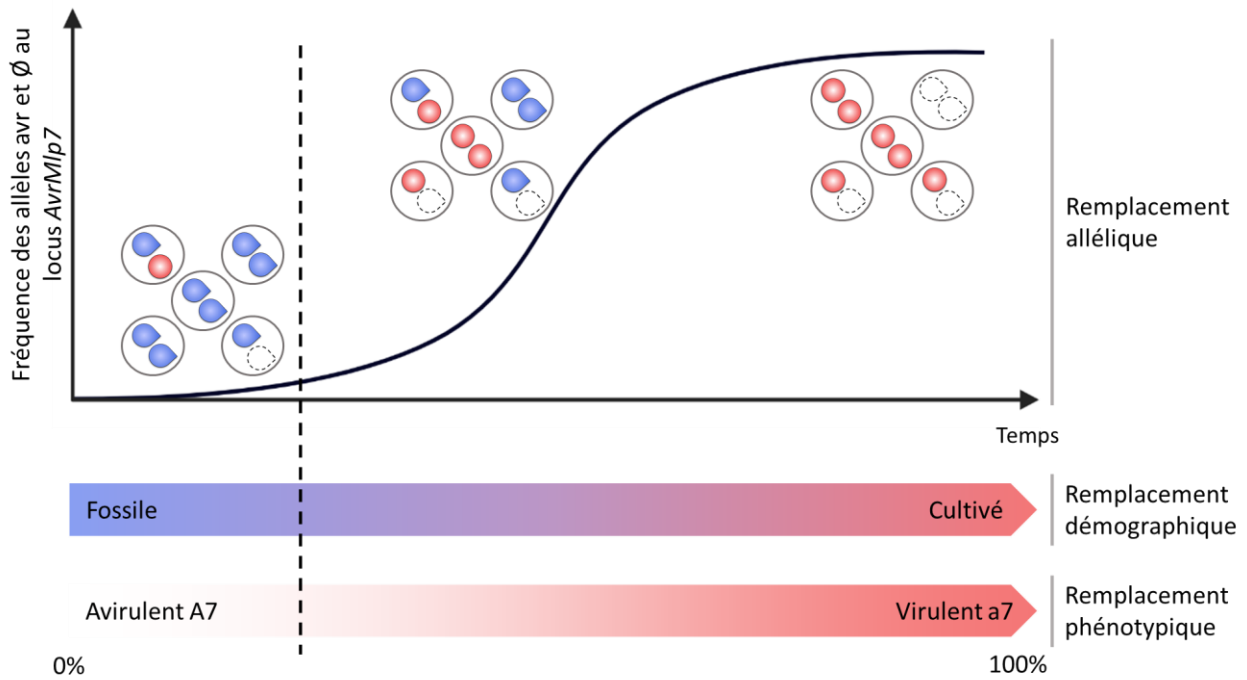


Figure 31. Deux variations conjointes au locus candidat *AvrMlp7* chez *Melampsora larici-populina* sont en corrélation avec le remplacement génétique et l'émergence des individus virulents a7.

Trois types d'allèles ont été détectés au locus candidat *AvrMlp7* : l'allèle sauvage d'avorulence Avr (en bleu), l'allèle muté avr (en rouge) et l'allèle nul causé par la délétion Ø (en blanc). Un remplacement allélique des allèles Avr, par les allèles avr et Ø conduisant à la virulence, a été identifié de manière conjointe avec le remplacement démographique du groupe génétique Fossile par le groupe génétique Cultivé et avec le remplacement phénotypique des individus avirulents A7 par des individus virulents a7. Ce locus candidat semble ainsi lié au bouleversement populationnel observé suite au contournement de la résistance RMIp7 en 1994 (ligne en pointillée).

Un aspect n'a pas été abordé lors de cette étude et continue à alimenter notre réflexion. D'après le suivi épidémiologique sur le territoire français, entre le premier individu virulent a7 détecté en 1994, jusqu'à la complète propagation de ces derniers sur l'ensemble du territoire, seulement quatre années se sont écoulées (Figure 14 ; Fabre et al. 2021; Persoons et al. 2017). De manière intuitive, nous pouvons suggérer que cette rapidité d'expansion a pu être liée à diverses capacités en lien avec le cycle de vie de l'agent pathogène (capacité migratoire, reproduction sexuée, ...) mais également liée à la dualité des altérations au locus d'avorulence *AvrMlp7*. Toutefois, douze années se sont écoulées entre la mise sur le marché de cultivars résistants RMIp7 (1982) et le contournement de ce même gène de résistance (1994). Ce temps long avant contournement soulève ainsi plusieurs questions. De manière troublante, nous avons déterminé que les altérations au locus étaient déjà présentes dans la population de *M. larici-populina* à un état hétérozygote, au moins cinq ans avant le contournement. De manière conceptuelle, le contournement d'une résistance se décompose en trois étapes (Figure 9). La première est l'apparition d'une variation bénéfique dans le génome de l'agent pathogène. Cette

variation entre en compétition avec les allèles déjà présents dans la population pathogène et peut s'accumuler de manière substantielle, en fonction de sa capacité concurrentielle (étape 2). Plus la variation est compétitive, plus sa probabilité d'expansion est élevée (étape 3). Néanmoins, chez les agents pathogènes en règle générale, l'évolution vers la virulence s'accompagne souvent d'une diminution de fitness (aussi appelée coût de la virulence) lors de l'infection d'hôtes sensibles dépourvus des résistances correspondantes. De manière intéressante, une diminution drastique de la plantation de cultivars de peupliers porteurs de la résistance RMIp7 a été observée entre 1996 et 2006 (Hayden *et al.*, non publié). En raison du caractère pérenne des peupliers, les pressions de sélection associées à ces derniers ont diminué seulement 15 à 20 ans après. Conjointement, des individus assignés au groupe génétique Cultivé mais ne portant pas la virulence a7 (testé par pathotypage) ont été détectés à partir de 2015. De plus, les premiers individus contournant présentaient une durée de latence supérieure (huit jours) aux individus contournant plus récents (sept jours), sur le cultivar 'Beaupré' (résistant RMIp7) (Pinon and Frey 2005). Ces résultats suggèrent donc l'existence de coûts de fitness pour *M. larici-populina* dans l'expression de la virulence envers RMIp7.

Chez le virus de la pomme de terre PVY (*Potato virus Y*), il a été montré que l'altération la plus bénéfique prédomine à un point d'équilibre alors que les autres altérations peuvent être non identifiées tout simplement car moins présentes ou moins compétitives (Fabre *et al.* 2012a). Nous pouvons donc suggérer que les deux variations identifiées dans cette étude seraient les moins coûteuses pour la fitness de l'agent pathogène en situation de fortes pressions de sélection. Un autre élément qui va en faveur de cette hypothèse vient du suivi temporel de la fréquence des altérations au locus candidat *AvrMlp7*. La fréquence de l'allèle de délétion dans la population de *M. larici-populina* a augmenté suite au contournement de la résistance RMIp7, jusqu'à devenir majoritaire au détriment de l'allèle mutée *avr*. Le mécanisme de délétion provoquant l'inactivation de cet effecteur semble donc être l'altération la moins coûteuse pour la fitness du pathogène. Sans doute, existe-t-il d'autres variations conduisant à la virulence à faible fréquence dans les populations de l'agent pathogène mais pour l'heure aucune d'elles n'a été identifiée. Ainsi, les coûts de virulence sont des déterminants majeurs de l'évolution des agents pathogènes au sens large et donc des paramètres importants pour prédire la durabilité des résistances (Leach *et al.* 2001). Dans ce contexte, il serait donc intéressant d'étudier s'il existe des coûts associés aux variations au niveau du locus candidat *AvrMlp7* par une caractérisation plus fine des variations phénotypiques, dans le but d'améliorer notre compréhension du scénario d'évolution de cet agent pathogène.

2.2. Préciser les scénarios d'évolution des interactions

Une étude récente de modélisation sur la dynamique de contournement des résistances a mis en évidence l'influence de la ploïdie et du cycle de vie des agents pathogènes sur la durabilité des résistances (Saubin et al. 2021). Dans le cas des agents pathogènes diploïdes possédant un cycle de vie qui nécessite l'alternance entre deux hôtes pour compléter leur cycle de vie (comme pour *M. larici-populina*), les trajectoires évolutives sont beaucoup plus imprévisibles que chez les agents pathogènes haploïdes, avec des temps de fixation de la virulence retardés. Cependant, une fois la virulence fixée, les mécanismes bénéfiques et adaptatifs associés se propagent rapidement dans les populations, notamment en cas de fréquence élevée de l'hôte résistant. Cette étude est très intéressante dans le cas du contournement de la résistance RMIp7 car elle peut être exploitée pour comprendre la vitesse de propagation des individus virulents a7. Nous avons mis en évidence deux événements moléculaires non-exclusifs altérant le gène candidat *AvrMlp7* (cf. [Chapitre II](#)). Le nombre et la nature de ces mécanismes ou encore les coûts de fitness associés sont des paramètres ayant un très fort impact sur la durabilité des résistances (Fabre et al. 2009). Sans rappeler le statut dicaryotique et l'alternance d'hôtes de *M. larici-populina*, les cultivars résistants RMIp7 étaient omniprésents dans le paysage (Pinon and Frey 2005). Ainsi, conformément à la prédiction du modèle (Saubin et al. 2021), l'ensemble des paramètres biologiques étaient réunis pour conduire à un événement de contournement aléatoire et imprévisible, mais une fois déclenché qui se propage très rapidement sur tout le territoire. Nous avons donc pu identifier les paramètres clés et fournir un aperçu des conséquences de la stratégie de déploiement massif des cultivars résistants RMIp7, renforcé par le caractère pérenne de la populi-culture. Il y a donc un équilibre à trouver entre la proportion de cultivars résistants dans le paysage et l'impact associé de ces derniers sur les capacités d'adaptation de *M. larici-populina*.

Le modèle de Saubin et al. (2021) ne nous permet pas, toutefois, de lever les dernières interrogations que nous avons sur le scénario évolutif expliquant l'origine du groupe génétique Cultivé. Est-ce que ce groupe est originaire d'une population virulente a7 ayant migrée sur le territoire français ou encore est-ce qu'elle est issue d'un fort effet de fondation par quelques individus contournants ? Pour répondre à ces questions, il serait intéressant de développer un modèle de génétique des populations pour expliquer ce scénario évolutif. A l'heure actuelle, les modèles épidémiologiques sont majoritairement centrés sur les agents pathogènes haploïdes asexués et ne prennent en compte que les paramètres démographiques (Van Den Bosch and Gilligan 2003). Dans le but de construire un modèle plus précis, il est nécessaire d'ajouter la dimension génétique (au locus sélectionné, mais aussi aux loci neutres, témoins de variations démographiques). Ce modèle se doit également d'être plus contextualisé à l'égard de notre étude. Les données que nous avons générées, notamment la variabilité

génétique au locus candidat et aux loci neutres, et les données d'échantillonnage temporel, pourraient ainsi permettre de le calibrer voire d'inférer les paramètres démographiques du modèle déjà existant (Saubin et al. 2021). En effet, la structuration génétique des populations est très différente selon leur histoire évolutive (Barrett et al. 2008). Ainsi, en étudiant les structures des populations nous pouvons prédire les trajectoires évolutives. De plus, inclure les coûts associés à l'adaptation des agents pathogènes à une nouvelle résistance qualitative est d'autant plus pertinent lorsque l'on se trouve dans une relation de type gène-pour-gène (Rimbaud et al. 2021). Ainsi, ce modèle associant variations génétiques et démographiques pourrait nous permettre de déchiffrer les trajectoires évolutives responsables de l'émergence du groupe génétique Cultivé.

3. Etudier l’histoire évolutive des populations de la rouille du peuplier : élargir le prisme des précédentes études de sélection

Les signatures génomiques induites par la sélection naturelle peuvent être utilisées pour identifier des facteurs impliqués dans les interactions hôte-pathogène (Märkle et al. 2021). En effet, les gènes ou les loci soumis à une forte pression de sélection positive ou négative peuvent être identifiés par la distribution et la proportion des polymorphismes (sites variables au sein d'une même espèce) et par les substitutions (sites variables entre espèces) (Stukenbrock and Bataillon 2012; Oleksyk et al. 2010). Cette coévolution peut donner lieu à deux scénarios différents, que l'on distingue en tant que « guerre de tranchées » ou « course aux armements » (Figure 8 ; Brown and Tellier, 2011). Les deux types de sélection favorisent la variation génétique, mais les signatures génomiques sont nettement différentes. Plusieurs tests statistiques peuvent être appliqués pour rechercher dans les génomes les signatures de sélection (Stukenbrock and Bataillon 2012). Le gène candidat *AvrMlp7* codé par *M. larici-populina* a notamment été mis en évidence grâce à des analyses de scan génomique et de GWAS (Annexe 1 ; Persoons et al. 2021). Dans ce type d'analyse, un seul génome de référence est le plus souvent considéré. Cette démarche est compréhensible en raison des efforts qui sont nécessaires pour générer des séquences génomiques de bonne qualité – surtout chez les Pucciniales qui présentent de très grands génomes (Aime et al. 2017) – toutefois elle nous conduit à étudier un polymorphisme conditionné par un individu et son histoire évolutive spécifique. Pourtant, le niveau de variation génétique est nettement influencé par plusieurs facteurs tels que la domestication des populations, le taux de mutation, le mode de reproduction ou encore la taille effective de la population, facteurs qui sont magnifiés dans des cas d'évolution des populations d'agent pathogène. Par exemple, très récemment, il a été démontré que le changement temporel des schémas de virulence dans les populations de *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*, entre 1990 et 2015, était associé à des changements de fréquences alléliques dans des régions génomiques porteuses de gènes candidats d'avirulence (Miller et al. 2020). Ainsi, l'étude centrée sur un génome de référence peut, par essence, générer une vision biaisée de l'arsenal en effecteurs en les considérant conditionnellement à une entité donnée (population, individu, période). Tout ceci est d'autant plus vrai lorsque l'on s'intéresse à *M. larici-populina*, qui présente trois groupes génétiques distincts (Persoons et al. 2017) au sein des populations sexuées, ainsi que des lignées asexuées (Xhaard et al. 2011). D'après l'histoire évolutive de ces lignées, nous pourrions considérer plusieurs scénarios : un scénario de course aux armements ayant conduit au remplacement du groupe génétique Fossile par le groupe génétique Cultivé (Persoons et al. 2021 ; cf. Article 2) et un scénario de guerre des tranchées imputable au groupe génétique Sauvage. Par

définition, la course aux armements aboutit à la fixation récurrente d'allèles avantageux à un locus répondant à la pression de sélection positive tandis que la guerre des tranchées prédit une diversité constante dans un système hôte-pathogène, en raison du maintien de plusieurs allèles à un locus sous sélection positive (diversifiante ou équilibrante) (cf. [Chapitre I partie 2.4.1](#)). Ce dernier scénario est d'autant plus probable dans le cas d'une coévolution en système naturel avec un hôte pérenne ([Tellier and Brown 2009](#)), scénario qui s'applique parfaitement au groupe génétique Sauvage et notamment aux populations vivant en partie en conditions isolées dans l'amont de la vallée de la Durance ([Xhaard et al. 2012](#)). De ce fait, nous pouvons nous demander si les deux scénarios peuvent avoir généré des sets d'effecteurs différents entre les groupes génétiques ? Est-ce que l'organisation génique autour des effecteurs est identique ? D'autre part, est-ce que les populations asexuées ont perdu toute ou une partie de l'arsenal d'effecteurs exprimés spécifiquement sur l'hôte alternant ([Lorrain et al. 2018a](#)) ? Toutes ces questions sont aussi importantes fondamentalement que pertinentes dans un contexte appliqué, car elles pourraient contribuer au développement de stratégies de gestion durable dans un agroécosystème. Il serait donc intéressant de prendre en compte la diversité de l'agent pathogène dans le compartiment sauvage pour reconstruire les schémas de sélection dans le temps et dans l'espace. Ceci pourrait notamment nous permettre de mieux comprendre les processus de coévolution entre les agents pathogènes et les plantes dans les systèmes agroécologiques.

4. Les effecteurs chloroplastiques chez les agents pathogènes filamenteux

L'analyse fonctionnelle de l'effecteur candidat AvrMlp7 de *M. larici-populina* a permis de mettre en évidence une accumulation chloroplastique de ce dernier exprimé dans un système hétérologue (cf. [Chapitre II](#)). Le nombre de publications décrivant des effecteurs chloroplastiques et leur mode d'action a augmenté de manière exponentielle depuis les années 2000 ([Figure 32](#) ; [Littlejohn et al. 2021](#); [Lorrain et al. 2018b](#); [Sperschneider et al. 2017](#)). Outre leur rôle central dans la photosynthèse, les chloroplastes sont connus pour être des éléments clés dans la coordination des réponses immunitaires des plantes ([Kachroo et al. 2021](#); [Littlejohn et al. 2021](#)). L'importance de leur rôle dans l'immunité est connue depuis longtemps, notamment grâce aux études réalisées dans les interactions entre plantes et virus ([Banerjee and Zaitlin, 1992](#); [Kupeevicz, 1947](#)). En comparaison, les études portant sur la manière dont les agents pathogènes filamenteux et les bactéries ciblent les chloroplastes étaient limitées jusqu'à

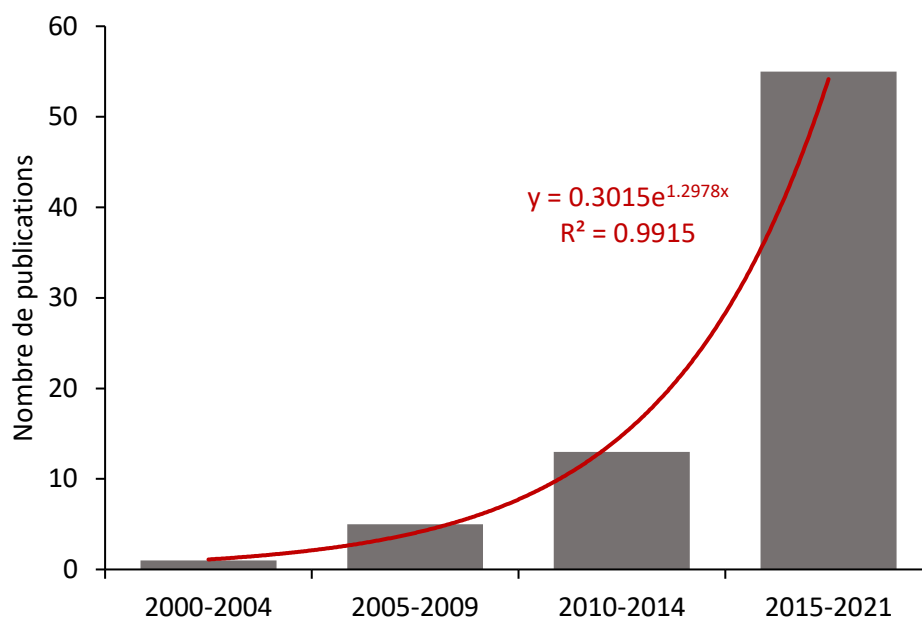


Figure 32. Le nombre de publications relatives aux effecteurs chloroplastiques augmente de façon exponentielle au cours du temps.

Pour évaluer la distribution temporelle des publications relatives aux effecteurs chloroplastiques, une recherche avec les mots clés 'chloroplast AND effector AND pathogen' a été réalisée sur le site internet Web of Science (<https://www.webofscience.com/>). Le nombre total de publications a été extrait (extraction en septembre 2021) et la quantification temporelle a été réalisée selon cinq périodes de temps : 2000-2004, 2005-2009, 2010-2014 et 2015-2021. Chaque période a été considérée selon cinq années 'pleines', exceptée pour la période 2015-2021 dont l'année 2021 n'est pas révolue. La courbe de tendance exponentielle, l'équation de la courbe et le R^2 sont indiqués sur le graphique en rouge.

l'émergence de la 'biologie des effecteurs' au début des années 2000 (Littlejohn et al. 2021). L'importance des travaux rapportant cet organite comme cible des effecteurs est particulièrement intéressante de par le caractère central qu'il joue à la fois dans la photosynthèse et dans l'immunité, et ouvre des perspectives stimulantes quant à la compréhension des mécanismes mis en jeu dans l'expression de la virulence (Littlejohn et al. 2021).

Actuellement, la majorité des connaissances sur les effecteurs chloroplastiques sont issues des modèles bactériens, notamment d'après les études faites sur les bactéries modèles *Pseudomonas syringae* et *Ralstonia solanacearum* (Littlejohn et al. 2021). Toutefois, des effecteurs chloroplastiques ont également été identifiées chez les agents pathogènes filamenteux (Figure 33; Tableau 4), ce qui indique une évolution conjointe chez les microorganismes pathogènes de plantes pour cibler ces organites. Chez les agents pathogènes filamenteux, les descriptions fonctionnelles font le plus souvent défaut. L'exemple le plus documenté provient sans doute du champignon pathogène *Pyrenophora tritici-repentis* qui produit les toxines ToxA. Ces toxines interagissent avec la protéine chloroplastique ToxA binding protein 1 (ToxABP1) et conduisent à de sévères nécroses tissulaires (Manning et al. 2007). Chez les Pucciniales, des études empiriques et *in silico* ont permis de mettre en évidence des effecteurs localisés dans les chloroplastes (Tableau 4) mais peu d'entre elles ont pu attribuer une fonction à ces effecteurs chloroplastiques (Ozketen et al. 2020; Xu et al. 2019). Les effecteurs PSTG_10917 et Pst-12806, codés par *P. striiformis* f. sp. *tritici*, ont la capacité de supprimer la mort cellulaire induite par INF1 chez le tabac (Ozketen et al. 2020) et moduler l'activité photosynthétique, la production de ROS et les réactions de défense (Xu et al. 2019), respectivement. Chez l'oomycète *P. infestans*, une accumulation spécifique des chloroplastes a été mise en évidence à l'interface de la zone d'infection, et plus précisément en association avec les haustoria de l'agent pathogène (Figure 34A; Savage et al. 2021a). Cette association serait renforcée par l'induction typique de stromules (tubules contenant du stroma), facilitant le contact chloroplaste-chloroplaste et permettant de former des groupes d'organites dynamiques autour des structures d'infection de l'agent pathogène (Figure 34B; Savage et al. 2021a). Les auteurs de cette étude n'étaient pas capables de conclure si l'association des chloroplastes avec les haustoria de l'oomycète est une stratégie de défense de la plante ou une stratégie d'infection de l'agent pathogène. Très récemment, des premiers éléments de réponses pencheraient plutôt en faveur d'une stratégie de défense de la plante avec la mise en évidence d'un dépôt de callose spécifiquement aux sites de pénétration de l'oomycète pendant l'infection intracellulaire (Savage et al. 2021b). Cependant, cette question reste d'autant plus pertinente que l'effecteur PhRXLR-C20 de l'oomycète *Plasmopara halstedii* a été identifié dans les chloroplastes mais également dans les stromules (Tableau 4; Pecrix et al. 2019). De ce fait, nous pouvons nous demander si les agents pathogènes biotrophes établissant des structures d'infection *in planta* ne manipuleraient

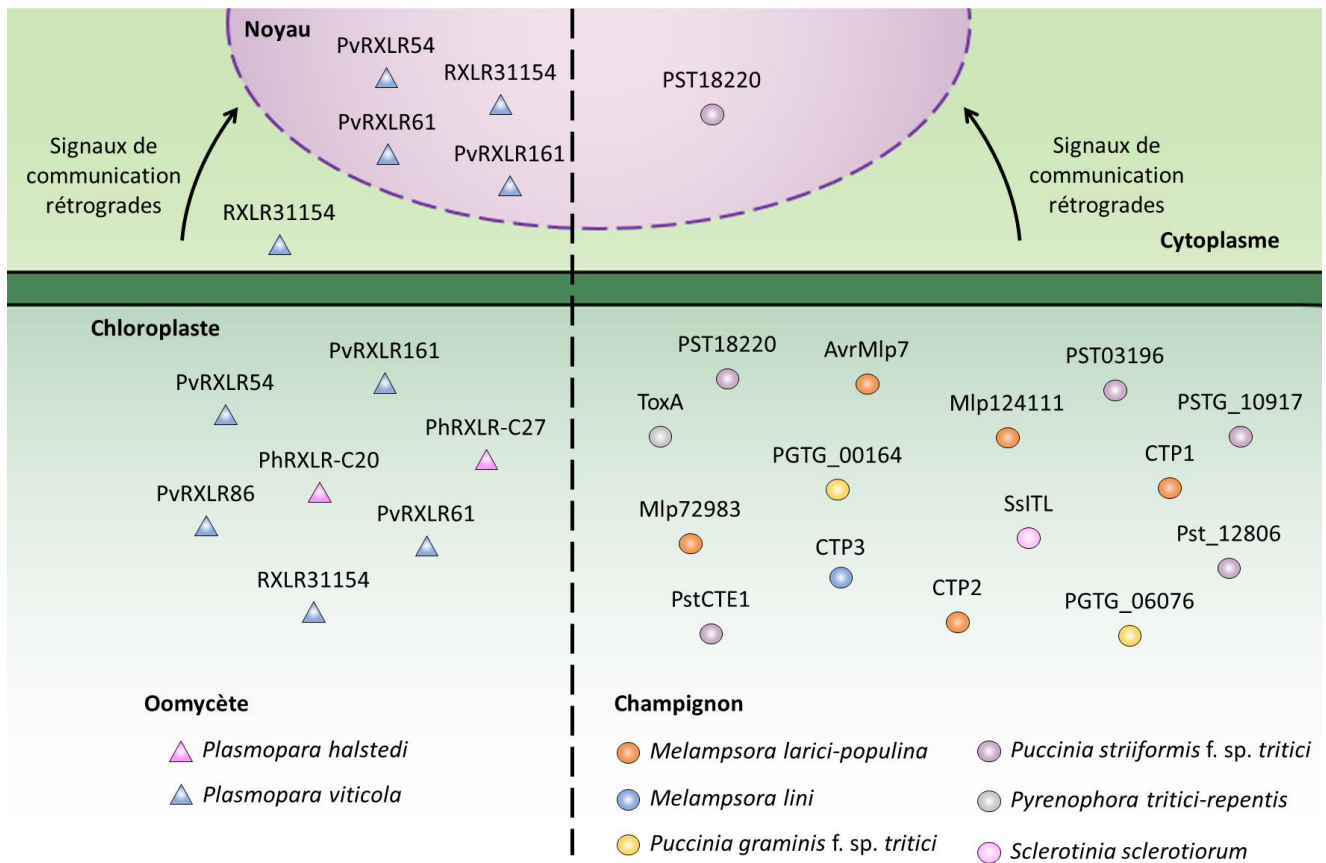


Figure 33. De nombreux effecteurs des agents pathogènes filamenteux s'accumulent dans les chloroplastes.

L'ensemble des effecteurs chloroplastiques (localisation décrite ou prédite à ce jour) sécrétés par les oomycètes (à gauche) et les champignons pathogènes (à droite) sont représentés dans cette figure. Toutes les localisations subcellulaires ont été déterminées par l'expression de ces derniers dans le système hétérologue *Nicotiana benthamiana*, excepté pour Mlp72983 dont la localisation a été déterminée chez *Arabidopsis thaliana*. Au cours de l'infection, des signaux de communication rétrograde relaient l'état cellulaire des chloroplastes vers le noyau.

pas ce processus d'accumulation et d'échanges moléculaires à leur bénéfice. Dans le cadre de l'interaction de *M. larici-populina* avec le peuplier, le champignon forme un réseau très dense d'hyphes et d'haustoria dans le parenchyme palissadique, une zone de cellules enrichies en chloroplastes, afin de détourner les nutriments des cellules de l'hôte (Lorrain et al. 2019). Les effecteurs de *M. larici-populina* de la famille des Chloroplast-targeted proteins (CTP) ciblent les chloroplastes des systèmes hétérologues dans lesquels ils sont exprimés (*N. benthamiana* et *A. thaliana*). De plus, CTP1 au moins cible les chloroplastes chez le clone de peuplier 717-1-B4 qui l'exprime de manière stable (non publié, thèse de Cécile Lorrain, 2018). La présence de nombreux stromules a aussi été rapportée pour CTP1 (Petre et al. 2016a). Enfin, des travaux récents conduits dans le laboratoire du Prof. Hugo Germain (Université du Québec à Trois Rivières), centrés sur des familles d'effecteurs candidats de *M. larici-*

populina s'exprimant chez les deux plantes-hôtes, peuplier et mélèze, montrent aussi l'accumulation de certains effecteurs dans les chloroplastes et leur capacité à former des stromules (non publié, thèse en cours de Claire Letanneur). Ce faisceau d'observations renforce l'hypothèse des chloroplastes comme cible privilégiée des effecteurs de *M. larici-populina*.

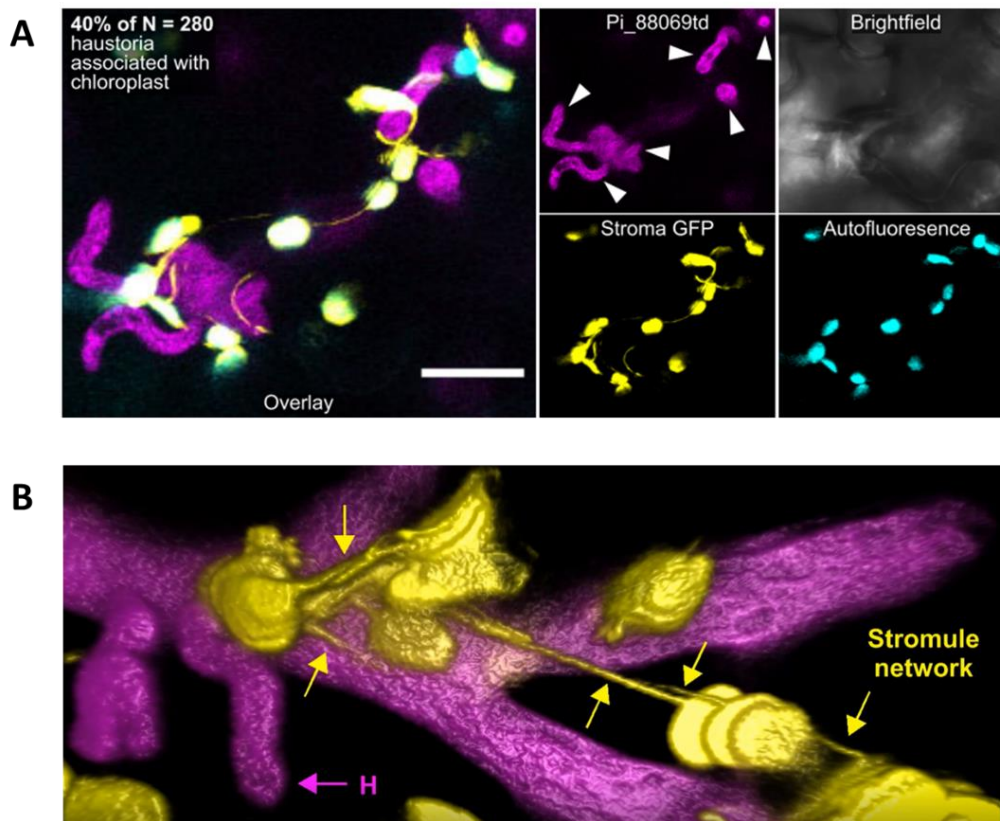


Figure 34. Durant l'infection, les chloroplastes s'accumulent autour des haustoria de *Phytophthora infestans* via la formation de stromules durant l'infection.

(A) Imagerie par microscopie confocale à projection maximale de cellules vivantes de *Nicotiana benthamiana* exprimant la GFP dans le stroma des chloroplastes (jaune), infectées par la souche 88069td de *Phytophthora infestans* (violet). Les chloroplastes s'accumulent autour des haustoria de l'oomycète (flèches blanches). Barre d'échelle : 10 μ m. Modifié d'après [Savage et al. 2021a](#).

(B) Image 3D montrant que les chloroplastes (jaune) modifient leur morphologie et forment des interactions stromulaires à longue distance autour des haustoria de *P. infestans* (violet). H : haustoria. Image issue de la vidéo S10 d'après [Savage et al. 2021a](#).

Tableau 4. Effecteurs des agents pathogènes filamenteux prédits comme étant chloroplastiques en système hétérologue et investigation sur la présence d'un peptide de transit.

Effecteur	Espèce	Localisation subcellulaire	Méthode expérimentale pour la localisation ^a	Présence d'un peptide de transit ^b	Méthode d'identification du peptide de transit ^c	Référence
Champignon						
AvrMlp7	<i>Melampsora larici-populina</i>	Chloroplaste	Fusion mCherry transitoire dans Nb	Putatif	Fusion mCherry en Nter dans Nb + Western Blot	Chapitre III
CTP1		Chloroplaste	Fusion GFP transitoire dans Nb	Oui	Clivage de la partie Nter + Fusion GFP transitoire dans Nb	Petre et al. 2016a
CTP2		Chloroplaste	Fusion GFP transitoire dans Nb	Oui	Clivage de la partie Nter + Fusion GFP transitoire dans Nb	Petre et al. 2016a
Mlp124111		Chloroplaste, agrégat cytosolique	Fusion GFP transitoire dans Nb	nd	-	Petre et al. 2015
Mlp72983		Chloroplaste	Fusion GFP transitoire dans At	nd	-	Germain et al. 2018
CTP3	<i>Melampsora lini</i>	Chloroplaste	Fusion GFP transitoire dans Nb	Oui	Clivage de la partie Nter + Fusion GFP transitoire dans Nb	Petre et al. 2016a
PstCTE1	<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i>	Chloroplaste	Fusion GFP transitoire dans Nb	Oui	Clivage de la partie Nter + Fusion GFP transitoire dans Nb	Andac et al. 2020
PST03196		Chloroplaste	Fusion GFP transitoire dans Nb	Putatif	Western Blot	Petre et al. 2016b

PST18220		Chloroplaste, noyau	Fusion GFP transitoire dans Nb	Putatif	Western Blot	Petre et al. 2016b
Pst_12806		Chloroplaste	Fusion GFP transitoire dans Nb	Putatif	Fusion GFP en Nter dans Nb + Western Blot	Xu et al. 2019
PSTG_10917		Chloroplaste	Fusion GFP transitoire dans Nb	Putatif	<i>in silico</i>	Ozketen et al. 2020
PGTG_00164	<i>Puccinia graminis f. sp. tritici</i>	Chloroplaste (thylakoïde ou plastoglobule)	Fusion YFP transitoire dans Nb	nd	-	Sperschneider et al. 2017
PGTG_06076		Chloroplaste (thylakoïde ou plastoglobule)	Fusion YFP transitoire dans Nb	nd	-	Sperschneider et al. 2017
ToxA	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	Chloroplaste	Fusion GFP transitoire dans Nb	Oui	Clivage de la partie Nter + Fusion GFP transitoire dans Nb	Manning et al. 2007; Sperschneider et al. 2017
SsITL	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Chloroplaste	Fusion GFP transitoire dans Nb	nd	-	Tang et al. 2020

Oomycète

PhRXLR-C20	<i>Plasmopara halstedii</i>	Chloroplaste, stromule	Fusion YFP transitoire dans Nb	nd	-	Pecrix et al. 2019
PhRXLR-C27		Chloroplaste*	Fusion YFP transitoire dans Nb	-	-	Pecrix et al. 2019
PvRXLR54	<i>Plasmopara viticola</i>	Chloroplaste, noyau, mitochondrie	Fusion GFP transitoire dans Nb	nd	Western Blot	Liu et al. 2018
PvRXLR61		Chloroplaste, noyau	Fusion GFP transitoire dans Nb	nd	Western Blot	Liu et al. 2018
PvRXLR86		Chloroplaste	Fusion GFP transitoire dans Nb	Putatif	Western Blot	Liu et al. 2018

PvRXLR161	Chloroplaste, noyau	Fusion GFP transitoire dans Nb	nd	Western Blot	Liu et al. 2018
RXLR31154	Chloroplaste, noyau, cytosol	Fusion GFP transitoire dans Nb	Non prédit	<i>in silico</i>	Liu et al. 2021

*associé aux chloroplastes

^aNb : *Nicotiana benthamiana* ; At : *Arabidopsis thaliana*

^bnd : non déterminé

^cNter : N-terminale ; Nb : *Nicotiana benthamiana*

Par ailleurs, la description de la présence de stromules très dynamiques pourrait souligner l'importance d'échange de matériel au sein de réseaux formés par ces organites lors de l'infection. Autant d'éléments qu'il reste encore à déterminer avec la fonction précise que ces effecteurs peuvent jouer dans ces organites et les cibles qui sont visées (Lorrain et al. 2018b).

Comme chez plusieurs effecteurs chloroplastiques prédits chez les agents pathogènes filamenteux ([Tableau 4](#)), l'effecteur candidat présente probablement une signature de séquence similaire aux peptides de transit de l'hôte pour la translocation dans les chloroplastes (cf. [Chapitre III](#)). Peu de peptides de transit chloroplastique ont été caractérisés chez les effecteurs d'agents pathogènes filamenteux ([Tableau 4](#) ; Andac et al., 2020; Manning et al., 2007; Petre et al., 2016a; Sperschneider et al., 2017). Très souvent, la présence de ces derniers reste putative, non étudiée voire non prédite. En ce qui concerne le dernier cas, aucun peptide de transit chloroplastique n'a été prédits de manière *in silico* chez les Pucciniales chez près de 30% des effecteurs chloroplastiques (Sperschneider et al. 2017), comme c'est le cas pour l'effecteur candidat AvrMlp7. Il pourrait donc être intéressant de déterminer par quel moyen ces effecteurs sont transloqués dans les chloroplastes, ce qui pourrait par exemple aider à déterminer de nouveaux peptides de transit dont les signatures ne sont pas encore définies, voire de nouvelles voies de translocation.

Dans l'ensemble, la recherche sur ces effecteurs permettra d'approfondir notre compréhension de l'importance des chloroplastes dans les interactions plantes-microorganismes pathogènes. Même si la caractérisation de leur interaction sera en soi un défi chez les agents pathogènes biotrophes obligatoires comme les Pucciniales, ces connaissances nous permettront de déterminer s'il existe une convergence évolutive d'un point de vue fonctionnel et/ou s'il existe une stratégie d'infection partagée chez les Pucciniales.

5. Comprendre les processus infectieux des champignons pathogènes en étudiant leur mode de vie

L'analyse des données transcriptomiques générées sur l'ensemble du cycle de vie de *M. larici-populina* ([Article 4](#)) a permis d'identifier des familles de facteurs de transcription (TF) liées à des transitions biologiques fondamentales pour le pathogène ([Article 3](#)). Par exemple, nous avons caractérisé et validé la fonction en système hétérologue des trois membres de la famille protéique cold-shock (CSP) codés par l'agent pathogène. Ces TF jouent vraisemblablement un rôle majeur dans la levée de dormance des télies vers la production de basidiospores, après une période d'hivernage et lorsque les conditions climatiques redeviennent favorables ([Duplessis et al. 2021](#)). Nous avons donc déterminé des acteurs clés pouvant orchestrer la transition entre l'infection de l'hôte télien (peuplier) et l'infection de l'hôte écidien (mélèze) chez l'agent de la rouille du peuplier ([Figure 15](#)). Plusieurs autres familles ont également été mises en évidence notamment des familles dont l'expression est spécifiquement associée à la colonisation précoce, à la croissance biotrophe ou à la sporulation sur l'hôte peuplier. Ce résultat est particulièrement intéressant car des études antérieures ont démontré des profils similaires en vagues d'expression pour certains effecteurs de *M. larici-populina* ([Duplessis et al. 2011b](#); [Hacquard et al. 2012](#)). Il serait donc approprié d'évaluer leur implication dans l'expression de ces effecteurs.

De nombreuses familles de TF ont déjà été identifiées comme des acteurs nécessaires à la virulence ([John et al. 2021](#); [van der Does and Rep 2017](#)). Cependant, le terme de virulence est trop souvent associé à la sécrétion d'effecteurs protéiques. Or, la sécrétion d'enzymes, l'acquisition de nutriments ou encore les processus de détoxification sont des déterminants majeurs dans la colonisation des plantes pour de nombreux champignons phytopathogènes ([van der Does and Rep 2017](#)). De ce fait, aucune stratégie unique d'infection n'existe. Le seul élément commun aux agents pathogènes semblent être la capacité de réponse et d'adaptation aux signaux développementaux et environnementaux ([Engering et al. 2013](#)), suggérant de vastes programmations transcriptionnelles. Les Pucciniales en sont les exemples parfaits avec, en général, une alternance entre deux hôtes et la production de plusieurs types de spores ([Aime et al. 2018](#)). L'identification des éléments de régulation offre donc une autre dimension pour comprendre les interactions plantes-microorganismes. Malheureusement, seules quelques étapes d'infection sont étudiées dans la majorité des cas chez les Pucciniales, centrées sur l'infection de l'hôte chez lequel les dégâts et les épidémies sont les plus importants ([Duplessis et al. 2021](#)), limitant de fait la compréhension globale de ces organismes. Ainsi, étendre nos efforts sur l'ensemble du cycle de vie des Pucciniales permettrait de découvrir de nouveaux aspects de la biologie de ces agents pathogènes, surtout les aspects relatifs aux transitions

développementales chez l'hôte où se produit la reproduction sexuée. Nous pourrions donc envisager d'utiliser, à titre d'exemple, de petits ARN interférents pour inhiber l'expression de ces gènes majeurs (dont les TF) orchestrant les processus fins de régulation ([Wang et al. 2016](#); [Weiberg and Jin 2015](#); [Hua et al. 2018](#)). De ce fait, outre les avantages théoriques, comprendre et décrypter les processus de régulation du cycle de vie des pathogènes représentent des voies très prometteuses pour formuler de nouvelles stratégies de protection des plantes.

6. Contourner les limites des pathosystèmes non-modèles pour mieux comprendre leur biologie

Ces vingt dernières années, déterminer la fonction des effecteurs a été au centre de l'attention de la communauté étudiant les interactions moléculaires entre plantes et microorganismes ([Article 1](#)). Ces efforts accrus ont permis de faire évoluer nos connaissances de la définition d'une protéine ayant pour rôle de perturber le système immunitaire, à une vision plus large de molécules opérationnelles qui promeuvent la colonisation du parasite à travers la manipulation des cellules végétales infectées ([Hogenhout et al. 2009](#); [Win et al. 2012](#)). Chez les Pucciniales, plusieurs effecteurs ont été caractérisés notamment pour des espèces constituant des menaces très sérieuses pour l'agriculture, comme par exemple chez les agents de la rouille du blé ou de la rouille du soja ([Lorrain et al. 2019, 2018b](#)). Toutefois, du fait du caractère biotrophe obligatoire des Pucciniales et des difficultés associées pour les maîtriser en laboratoire, peu d'études décrivent la fonction primaire de virulence de ces effecteurs ([Lorrain et al. 2019](#)).

Pour remédier à des conceptions longues et fastidieuses de protocoles d'analyse fonctionnelle chez ces organismes biotrophes, les chercheurs se tournent vers l'utilisation de systèmes hétérologues (pour revue [Lorrain et al. 2018b](#)) tels qu'*A. thaliana* pour tester les fonctions des effecteurs ([Germain et al. 2018](#)) ou *N. benthamiana* pour étudier leur localisation et prédire leurs fonctions potentielles ([Petre et al. 2015, 2016a](#)). De plus, les systèmes hétérologues sont également d'important outils pour caractériser tous types de molécules exprimées par les Pucciniales comme nous avons pu le démontrer avec la caractérisation fonctionnelle de la famille des CSP exprimée par *M. larici-populina* (cf. [Chapitre IV ; Article 3](#)). Ils nous permettent ainsi d'aller au-delà de l'étude stricte des effecteurs. Dans l'UMR IAM et au-delà des travaux centrés sur *M. larici-populina*, ces approches nous ont permis de générer un ensemble de résultats. Cependant, ces derniers sont généralement fragmentaires et ne conduisent pas nécessairement à une publication de résultats. Malheureusement, et à l'image de cette thèse, ce constat a souvent été similaire lors des travaux de mes prédécesseurs ([Petre 2012](#); [Hacquard 2011](#); [Lorrain 2018](#); [Persoons 2015](#)). En ce qui concerne les effecteurs (les plus étudiés dans l'UMR IAM), comme illustré par de Guillen et al. ([2019](#)), une poignée seulement réussissent à passer de la prédiction *in silico* à la résolution structurale, voire à l'analyse fonctionnelle. Ainsi, cette difficulté expérimentale devrait être au cœur des préoccupations à venir. Il devient indispensable d'établir des outils appropriés et reproductibles pour l'étude des effecteurs chez les Pucciniales, et plus largement pour l'étude des molécules exprimées par ces agents pathogènes. Dans cette idée, nous avons commencé à développer des outils de transformation génétique de cultivars de peuplier (cf. [Chapitre III](#)) mais les protocoles nécessitent encore des ajustements pour atteindre un niveau de

reproductibilité indispensable. Nous avons également illustré notre difficulté, voire notre incapacité, à produire et à purifier les protéines effectrices avec les outils que nous avons à disposition. Or, générer ces protéines recombinantes est indispensable pour le processus de caractérisation fonctionnelle. Des méthodes différentes doivent ainsi être envisagées pour la suite. Certains auteurs proposent d'améliorer nos techniques existantes en production de protéines, par exemple, en ajoutant des étiquettes de solubilités dans nos clonages (Bentham et al. 2021). Cette approche semble être la plus séduisante en raison de sa faisabilité immédiate. En effet, après obtention de ce nouveau matériel, des tests à court terme pourraient être envisagés sur les différents effecteurs de *M. larici-populina*. De manière tout aussi séduisante, la caractérisation fonctionnelle des effecteurs AvrSr27 et AvrSr50 chez *P. graminis* f. sp. *tritici* a été rendue possible via l'utilisation du virus recombinant BSMV exprimant les candidats dans les tissus du blé (Upadhyaya et al. 2021; Chen et al. 2017). A plus long terme, nous pourrions donc envisager de développer au sein de l'UMR IAM l'utilisation de systèmes d'expression naturellement pathogènes pour les feuilles de peuplier tels que le virus de la mosaïque du peuplier ou le champignon responsable des brunissures des feuilles *Drepanopeziza brunnea* (dont la culture va être développée très prochainement par l'UMR IAM).

Pour conclure, nous devons très rapidement nous pencher sur le champ des possibles en termes de techniques d'analyse fonctionnelle. Ceci nous permettrait de contourner les obstacles qu'entraînent la caractérisation des molécules clés pour l'infection, comme les éléments régulateurs du cycle de vie mais également les effecteurs. La maîtrise de tels outils relèverait d'une avancée majeure pour l'identification directe des fonctions moléculaires à large échelle et/ou dans leurs pathosystèmes natifs.

Références bibliographiques

- Adachi, H., Białas, A., and Kamoun, S. 2020. How to trick a plant pathogen? Zenodo.
- Adachi, H., Derevnina, L., and Kamoun, S. 2019. NLR singletons, pairs, and networks: evolution, assembly, and regulation of the intracellular immunoreceptor circuitry of plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 50:121–131
- Aime, M. C., Bell, C. D., and Wilson, A. W. 2018. Deconstructing the evolutionary complexity between rust fungi (Pucciniales) and their plant hosts. *Studies in Mycology*. 89:143–152
- Aime, M. C., and McTaggart, A. R. 2021. A higher-rank classification for rust fungi, with notes on genera. *Fungal Systematics and Evolution*. 7:21–47
- Aime, M. C., McTaggart, A. R., Mondo, S. J., and Duplessis, S. 2017. Phylogenetics and phylogenomics of rust fungi. *Advances in Genetics*. 100:267–307
- Allen, R. L., Bittner-Eddy, P. D., Grenville-Briggs, L. J., Meitz, J. C., Rehmany, A. P., Rose, L. E., and Beynon, J. L. 2004. Host-parasite coevolutionary conflict between *Arabidopsis* and downy mildew. *Science*. 306:1957–1960
- Andac, A., Ozketen, A. C., Dagvadorj, B., and Akkaya, M. S. 2020. An effector of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* targets chloroplasts with a novel and robust targeting signal. *European Journal of Plant Pathology*. 157:751–765
- Anderson, P. K., Cunningham, A. A., Patel, N. G., Morales, F. J., Epstein, P. R., and Daszak, P. 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology and Evolution*. 19:535–544
- Armstrong, M. R., Whisson, S. C., Pritchard, L., Bos, J. I. B., Venter, E., Avrova, A. O., Rehmany, A. P., Böhme, U., Brooks, K., Cherevach, I., Hamlin, N., White, B., Fraser, A., Lord, A., Quail, M. A., Churcher, C., Hall, N., Berriman, M., Huang, S., Kamoun, S., Beynon, J. L., and Birch, P. R. J. 2005. An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene *Avr3a*, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. *PNAS*. 102:7766–7771
- Bakkeren, G., and Szabo, L. J. 2020. Progress on molecular genetics and manipulation of rust fungi. *Phytopathology*. 110:532–543
- Balesdent, M., Fudal, I., Ollivier, B., Bally, P., Grandaubert, J., Eber, F., Chèvre, A.-M., Leflon, M., and Rouxel, T. 2013. The dispensable chromosome of *Leptosphaeria maculans* shelters an effector gene conferring avirulence towards *Brassica rapa*. *New Phytologist*. 198:887–898
- Banerjee, N., and Zaitlin, M. 1992. Import of tobacco mosaic virus coat protein into intact chloroplasts in vitro. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 5:466–471
- Barrett, L. G., and Schluter, D. 2008. Adaptation from standing genetic variation. *Trends in Ecology and Evolution*. 23:38–44
- Bayless, A. M., and Nishimura, M. T. 2020. Enzymatic functions for Toll/Interleukin-1 Receptor domain proteins in the plant immune system. *Frontiers in Genetics*. 11:539

- Bendtsen, J. D., Jensen, L. J., Blom, N., von Heijne, G., and Brunak, S. 2004. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Engineering, Design and Selection*. 17:349–356
- Bentham, A. R., De la Concepcion, J. C., Mukhi, N., Zdrzałek, R., Draeger, M., Gorenkin, D., Hughes, R. K., and Banfield, M. J. 2020. A molecular roadmap to the plant immune system. *Journal of Biological Chemistry*. 295:14916–14935
- Bentham, A. R., Youles, M., Mendel, M. N., Varden, F. A., De la Concepcion, J. C., and Banfield, M. J. 2021. pOPIN-GG: a resource for modular assembly in protein expression vectors. *BioRxiv*. 2021.08.10.455798.
- Bi, G., Su, M., Li, N., Liang, Y., Dang, S., Xu, J., Hu, M., Wang, J., Zou, M., Deng, Y., Li, Q., Huang, S., Li, J., Chai, J., He, K., Chen, Y. H., and Zhou, J. M. 2021. The ZAR1 resistosome is a calcium-permeable channel triggering plant immune signaling. *Cell*. 184:3528–3541
- Białas, A., Zess, E. K., De La Concepcion, J. C., Franceschetti, M., Pennington, H. G., Yoshida, K., Upson, J. L., Chanclud, E., Wu, C. H., Langner, T., Maqbool, A., Varden, F. A., Derevnina, L., Belhaj, K., Fujisaki, K., Saitoh, H., Terauchi, R., Banfield, M. J., and Kamoun, S. 2018. Lessons in effector and NLR biology of plant-microbe systems. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 31:34–45
- Bigeard, J., Colcombet, J., and Hirt, H. 2015. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular Plant*. 8:521–539
- Blondeau, K., Blaise, F., Graille, M., Kale, S. D., Linglin, J., Ollivier, B., Labarde, A., Lazar, N., Daverdin, G., Balesdent, M. H., Choi, D. H. Y., Tyler, B. M., Rouxel, T., Van Tilbeurgh, H., and Fudal, I. 2015. Crystal structure of the effector AvrLm4-7 of *Leptosphaeria maculans* reveals insights into its translocation into plant cells and recognition by resistance proteins. *Plant Journal*. 83:610–624
- Boevink, P. C., Birch, P. R. J., Turnbull, D., and Whisson, S. C. 2020. Devastating intimacy: the cell biology of plant–Phytophthora interactions. *New Phytologist*. 228:445–458
- Boutrot, F., and Zipfel, C. 2017. Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 55:257–286
- Brown, J. K. M., and Tellier, A. 2011. Plant-parasite coevolution: bridging the gap between genetics and ecology. *Annual Review of Phytopathology*. 49:345–367
- Caplan, J. L., Kumar, A. S., Park, E., Padmanabhan, M. S., Hoban, K., Modla, S., Czymmek, K., and Dinesh-Kumar, S. P. 2015. Chloroplast stromules function during innate immunity. *Developmental Cell*. 34:45–57
- Catanzariti, A. M. 2006. Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *The Plant Cell*. 18:243–256
- Cesari, S. 2018. Multiple strategies for pathogen perception by plant immune receptors. *New Phytologist*. 219:17–24
- Charoensawan, V., Wilson, D., and Teichmann, S. A. 2010. Genomic repertoires of DNA-binding transcription factors across the tree of life. *Nucleic Acids Research*. 38:7364–7377
- Chen, J., Upadhyaya, N. M., Ortiz, D., Sperschneider, J., Li, F., Bouton, C., Breen, S., Dong, C., Xu, B., Zhang, X., Mago, R., Newell, K., Xia, X., Bernoux, M., Taylor, J. M., Steffenson, B., Jin, Y., Zhang, P., Kanyuka, K., Figueroa, M., Ellis, J. G., Park, R. F., and Dodds, P. N. 2017. Loss of *AvrSr50* by somatic exchange in stem rust leads to virulence for *Sr50* resistance in wheat. *Science*. 358:1607–1610

- Chen, L. Q., Hou, B. H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M. L., Qu, X. Q., Guo, W. J., Kim, J. G., Underwood, W., Chaudhuri, B., Chermak, D., Antony, G., White, F. F., Somerville, S. C., Mudgett, M. B., and Frommer, W. B. 2010. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*. 468:527–532
- Collemare, J., O’Connell, R., and Lebrun, M. H. 2019. Nonproteinaceous effectors: the terra incognita of plant–fungal interactions. *New Phytologist*. 223:590–596
- Collmer, A., Badel, J. L., Charkowski, A. O., Deng, W.-L., Fouts, D. E., Ramos, A. R., Rehm, A. H., Anderson, D. M., Schneewind, O., van Dijk, K., and Alfano, J. R. 2000. *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. *PNAS*. 97:8770–8777
- Cook, D. E., Mesarich, C. H., and Thomma, B. P. H. J. 2015. Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion. *Annual Review of Phytopathology*. 53:541–563
- Cornelis, G. R., and Van Gijsegem, F. 2000. Assembly and function of type III secretory systems. *Annual Review of Microbiology*. 54:735–774
- Dagvadorj, B., and Solomon, P. S. 2021. Simple and efficient heterologous expression of necrosis-inducing effectors using the model plant *Nicotiana benthamiana*. *Plant Direct*. 5:1–7
- Dangl, J. L., Horvath, D. M., and Staskawicz, B. J. 2013. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science*. 341:746–751
- Daverdin, G., Rouxel, T., Gout, L., Aubertot, J.-N., Fudal, I., Meyer, M., Parlange, F., Carpezat, J., and Balesdent, M.-H. 2012. Genome structure and reproductive behaviour influence the evolutionary potential of a fungal phytopathogen. *PLoS Pathogens*. 8:e1003020
- Dawkins, R., and Krebs, J. R. 1979. Arms races between and within species. *PNAS*. 205:489–511
- de Guillen, K., Lorrain, C., Tsan, P., Barthe, P., Petre, B., Saveleva, N., Rouhier, N., Duplessis, S., Padilla, A., and Hecker, A. 2019. Structural genomics applied to the rust fungus *Melampsora larici-populina* reveals two candidate effector proteins adopting cystine knot and NTF2-like protein folds. *Scientific Reports*. 9:18084
- de Guillen, K., Ortiz-Vallejo, D., Gracy, J., Fournier, E., Kroj, T., and Padilla, A. 2015. Structure analysis uncovers a highly diverse but structurally conserved effector family in phytopathogenic fungi. *PLoS Pathogens*. 11:e1005228
- de Jonge, R., Bolton, M. D., Kombrink, A., Van Den Berg, G. C. M., Yadeta, K. A., and Thomma, B. P. H. J. 2013. Extensive chromosomal reshuffling drives evolution of virulence in an asexual pathogen. *Genome Research*. 23:1271–1282
- Deslandes, L., and Rivas, S. 2012. Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends in Plant Science*. 17:644–655
- de Souza, A., Wang, J.-Z., and Dehesh, K. 2017. Retrograde signals: integrators of interorganellar communication and orchestrators of plant development. *Annual Review of Plant Biology*. 68:85–108
- de Torres Zabala, M., Littlejohn, G., Jayaraman, S., Studholme, D., Bailey, T., Lawson, T., Tillich, M., Licht, D., Bölter, B., Delfino, L., Truman, W., Mansfield, J., Smirnov, N., and Grant, M. 2015. Chloroplasts play a central role in plant defence and are targeted by pathogen effectors. *Nature Plants*. 1:15074
- de Vries, S., Stukenbrock, E. H., and Rose, L. E. 2020. Rapid evolution in plant–microbe interactions – an evolutionary genomics perspective. *New Phytologist*. 226:1256–1262

- Dodds, P. N., and Rathjen, J. P. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*. 11:539–548
- Dong, S., Raffaele, S., and Kamoun, S. 2015. The two-speed genomes of filamentous pathogens: waltz with plants. *Current Opinion in Genetics and Development*. 35:57–65
- Dou, D., Kale, S. D., Wang, X., Chen, Y., Wang, Q., Wang, X., Jiang, R. H. Y., Arredondo, F. D., Anderson, R. G., Thakur, P. B., McDowell, J. M., Wang, Y., and Tyler, B. M. 2008. Conserved C-terminal motifs required for avirulence and suppression of cell death by *Phytophthora sojae* effector Avr1b. *The Plant Cell*. 20:1118–1133
- Dracatos, P. M., Haghdoost, R., Singh, D., and Park, R. F. 2018. Exploring and exploiting the boundaries of host specificity using the cereal rust and mildew models. *New Phytologist*. 218:453–462
- Duplessis, S., Bakkeren, G., and Hamelin, R. 2014. Advancing knowledge on biology of rust fungi through genomics. Pages 173–209 in: *Advances in Botanical Research*, Elsevier Ltd.
- Duplessis, S., Cuomo, C. A., Lin, Y. C., Aerts, A., Tisserant, E., Veneault-Fourrey, C., Joly, D. L., Hacquard, S., Amselem, J., Cantarel, B. L., Chiu, R., Coutinho, P. M., Feaue, N., Field, M., Frey, P., Gelhaye, E., Goldberg, J., Grabherr, M. G., Kodira, C. D., Kohler, A., Kües, U., Lindquist, E. A., Lucas, S. M., Mago, R., Mauceli, E., Morin, E., Murat, C., Pangilinan, J. L., Park, R., Pearson, M., Quesneville, H., Rouhier, N., Sakthikumar, S., Salamov, A. A., Schmutz, J., Selles, B., Shapiro, H., Tanguay, P., Tuskan, G. A., Henrissat, B., Van De Peer, Y., Rouzé, P., Ellis, J. G., Dodds, P. N., Schein, J. E., Zhong, S., Hamelin, R. C., Grigoriev, I. V., Szabo, L. J., and Martin, F. 2011a. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *PNAS*. 108:9166–9171
- Duplessis, S., Hacquard, S., Delaruelle, C., Tisserant, E., Frey, P., Martin, F., and Kohler, A. 2011b. *Melampsora larici-populina* transcript profiling during germination and timecourse infection of poplar leaves reveals dynamic expression patterns associated with virulence and biotrophy. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 24:808–818
- Duplessis, S., Lorrain, C., Petre, B., Figueroa, M., Dodds, P. N., and Aime, M. C. 2021. Host adaptation and virulence in heteroecious rust fungi. *Annual Review of Phytopathology*. 59:17.1-17.20
- Ellis, J. G., Dodds, P. N., and Lawrence, G. J. 2007. Flax rust resistance gene specificity is based on direct resistance-avirulence protein interactions. *Annual Review of Phytopathology*. 45:289–306
- Ellis, J. G., Lagudah, E. S., Spielmeier, W., and Dodds, P. N. 2014. The past, present and future of breeding rust resistant wheat. *Frontiers in Plant Science*. 5:641
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nature Protocols*. 2:953–971
- Engering, A., Hogerwerf, L., and Slingenbergh, J. 2013. Pathogen-host-environment interplay and disease emergence. *Emerging Microbes and Infections*. 2:e5
- Engler, C., Youles, M., Gruetzner, R., Ehnert, T., Werner, S., Jones, J. D. G., Patron, N. J., and Marillonnet, S. 2014. A golden gate modular cloning toolbox for plants. *ACS Synthetic Biology*. 3:839–843
- Fabre, B., Bastien, C., Husson, C., Marçais, B., Frey, P., and Halkett, F. 2021. Un effet papillon dans les peupleraies françaises : les répercussions d'un contournement de résistance sur les méthodes de sélection variétale. Pages 329–339 in: *L'immunité des plantes*, C. Lannou, D. Roby, V. Ravigné, M. Hannachi, and B. Moury, eds. Editions Quae, Versailles.

- Fabre, F., Bruchou, C., Palloix, A., and Moury, B. 2009. Key determinants of resistance durability to plant viruses: insights from a model linking within- and between-host dynamics. *Virus Research*. 141:140–149
- Fabre, F., Montarry, J., Coville, J., Senoussi, R., Simon, V., and Moury, B. 2012a. Modelling the evolutionary dynamics of viruses within their hosts: a case study using high-throughput sequencing. *PLoS Pathogens*. 8:e1002654
- Fabre, F., Rousseau, E., Mailleret, L., and Moury, B. 2012b. Durable strategies to deploy plant resistance in agricultural landscapes. *New Phytologist*. 193:1064–1075
- Figuroa, M., Dodds, P. N., and Henningsen, E. C. 2020. Evolution of virulence in rust fungi — multiple solutions to one problem. *Current Opinion in Plant Biology*. 56:20–27
- Figuroa, M., Hammond-Kosack, K. E., and Solomon, P. S. 2018. A review of wheat diseases—a field perspective. *Molecular Plant Pathology*. 19:1523–1536
- Fisher, M. C., Hawkins, N. J., Sanglard, D., and Gurr, S. J. 2018. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science*. 360:739–742
- Flor, H. H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*. 9:275–296
- Flor, H. H. 1956. Mutations in flax rust induced by ultraviolet radiation. *Science*. 124:888–889
- Fouché, S., Plissonneau, C., and Croll, D. 2018. The birth and death of effectors in rapidly evolving filamentous pathogen genomes. *Current Opinion in Microbiology*. 46:34–42
- Frantzeskakis, L., Kusch, S., and Panstruga, R. 2019. The need for speed: compartmentalized genome evolution in filamentous phytopathogens. *Molecular Plant Pathology*. 20:3–7
- Frantzeskakis, L., Di Pietro, A., Rep, M., Schirawski, J., Wu, C. H., and Panstruga, R. 2020. Rapid evolution in plant–microbe interactions – a molecular genomics perspective. *New Phytologist*. 225:1134–1142
- Fry, W. 2008. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology*. 9:385–402
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. O., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L. J., Smirnov, S., Purcell, S., Rehman, B., Elkins, T., Engels, R., Wang, S., Nielsen, C. B., Butler, J., Endrizzi, M., Qui, D., Ianakiev, P., Bell-Pedersen, D., Nelson, M. A., Werner-Washburne, M., Selitrennikoff, C. P., Kinsey, J. A., Braun, E. L., Zelter, A., Schulte, U., Kothe, G. O., Jedd, G., Mewes, W., Staben, C., Marcotte, E., Greenberg, D., Roy, A., Foley, K., Naylor, J., Stange-Thomann, N., Barrett, R., Gnerre, S., Kamal, M., Kamvysselis, M., Mauceli, E., Bielke, C., Rudd, S., Frishman, D., Krystofova, S., Rasmussen, C., Metzenberg, R. L., Perkins, D. D., Kroken, S., Cogoni, C., Macino, G., Catchside, D., Li, W., Pratt, R. J., Osmani, S. A., DeSouza, C. P. C., Glass, L., Orbach, M. J., Berglund, J. A., Voelker, R., Yarden, O., Plamann, M., Seiler, S., Dunlap, J., Radford, A., Aramayo, R., Natvig, D. O., Alex, L. A., Mannhaupt, G., Ebbole, D. J., Freitag, M., Paulsen, I., Sachs, M. S., Lander, E. S., Nusbaum, C., and Birren, B. 2003. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*. 422:859–868
- Gérard, P. R., Husson, C., Pinon, J., and Frey, P. 2006. Comparison of genetic and virulence diversity of *Melampsora larici-populina* populations on wild and cultivated poplar and influence of the alternate host. *Phytopathology*. 96:1027–1036
- Germain, H., Joly, D. L., Mireault, C., Plourde, M. B., Letanneur, C., Stewart, D., Morency, M. J., Petre, B., Duplessis, S., and Séguin, A. 2018. Infection assays in *Arabidopsis* reveal candidate effectors from the

- poplar rust fungus that promote susceptibility to bacteria and oomycete pathogens. *Molecular Plant Pathology*. 19:191–200
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 43:205–227
- Godfrey, D., Böhlenius, H., Pedersen, C., Zhang, Z., Emmersen, J., and Thordal-Christensen, H. 2010. Powdery mildew fungal effector candidates share N-terminal Y/F/WxC-motif. *BMC Genomics*. 11:317
- Godoy, C. V., Seixas, C. D. S., Soares, R. M., Marcelino-Guimarães, F. C., Meyer, M. C., and Costamilan, L. M. 2016. Asian soybean rust in Brazil: past, present, and future. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 51:407–421
- Göhre, V., and Robatzek, S. 2008. Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual Review of Phytopathology*. 46:189–215
- Gómez-Gómez, L., and Boller, T. 2000. FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*. 5:1003–1011
- Gout, L., Kuhn, M. L., Vincenot, L., Bernard-Samain, S., Cattolico, L., Barbetti, M., Moreno-Rico, O., Balesdent, M.-H., and Rouxel, T. 2007. Genome structure impacts molecular evolution at the *AvrLm1* avirulence locus of the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Environmental Microbiology*. 9:2978–2992
- Goyeau, H., Halkett, F., Le Cam, B., Montarry, J., and Le May, C. 2021. Les contournements de résistance : mécanismes, dynamiques et conséquences. Pages 135–145 in: *L'immunité des plantes*, C. Lannou, D. Roby, V. Ravigné, M. Hannachi, and B. Moury, eds. Editions Quae, Versailles.
- Goyeau, H., Halkett, F., Le Cam, B., Montarry, J., and Le May, C. 2020. Les contournements de résistance : mécanismes, dynamiques et conséquences.
- Grandaubert, J., Lowe, R. G. T., Soyer, J. L., Schoch, C. L., Van De Wouw, A. P., Fudal, I., Robbertse, B., Lapalu, N., Links, M. G., Ollivier, B., Linglin, J., Barbe, V., Mangenot, S., Cruaud, C., Borhan, H., Howlett, B. J., Balesdent, M. H., and Rouxel, T. 2014. Transposable element-assisted evolution and adaptation to host plant within the *Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa* species complex of fungal pathogens. *BMC Genomics*. 15:891
- Grigoriev, I. V., Nikitin, R., Haridas, S., Kuo, A., Ohm, R., Otilar, R., Riley, R., Salamov, A., Zhao, X., Korzeniewski, F., Smirnova, T., Nordberg, H., Dubchak, I., and Shabalov, I. 2014. MycoCosm portal: Gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Research*. 42
- Gross, A., Holdenrieder, O., Pautasso, M., Queloz, V., and Sieber, T. N. 2014. *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the causal agent of European ash dieback. *Molecular Plant Pathology*. 15:5–21
- Grund, E., Tremousaygue, D., and Deslandes, L. 2019. Plant NLRs with integrated domains: unity makes strength. *Plant Physiology*. 179:1227–1235
- Guiguet, A., Dubreuil, G., Harris, M. O., Appel, H. M., Schultz, J. C., Pereira, M. H., and Giron, D. 2016. Shared weapons of blood-and plant-feeding insects: surprising commonalities for manipulating hosts. *Journal of Insect Physiology*. 84:4–21
- Gururani, M. A., Venkatesh, J., Upadhyaya, C. P., Nookaraju, A., Pandey, S. K., and Park, S. W. 2012. Plant disease resistance genes: current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 78:51–65

- Guttman, D. S., McHardy, A. C., and Schulze-Lefert, P. 2014. Microbial genome-enabled insights into plant-microorganism interactions. *Nature Reviews Genetics*. 15:797–813
- Hacquard, S., Delaruelle, C., Frey, P., Tisserant, E., Kohler, A., and Duplessis, S. 2013. Transcriptome analysis of poplar rust telia reveals overwintering adaptation and tightly coordinated karyogamy and meiosis processes. *Frontiers in Plant Science*. 4:456
- Hacquard, S., Joly, D. L., Lin, Y.-C., Tisserant, E., Feau, N., Delaruelle, C., Legué, V., Kohler, A., Tanguay, P., Petre, B., Frey, P., Van De Peer, Y., Rouzé, P., Martin, F., Hamelin, R. C., and Duplessis, S. 2012. A comprehensive analysis of genes encoding small secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-populina* (poplar leaf rust). *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 25:279–293
- Hacquard, S., Petre, B., Frey, P., Hecker, A., Rouhier, N., and Duplessis, S. 2011a. The poplar-poplar rust interaction: insights from genomics and transcriptomics. *Journal of Pathogens*. 2011
- Hacquard, S., Veneault-Fourrey, C., Delaruelle, C., Frey, P., Martin, F., and Duplessis, S. 2011b. Validation of *Melampsora larici-populina* reference genes for in planta RT-quantitative PCR expression profiling during time-course infection of poplar leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 75:106–112
- Hacquard, T. S. 2011. Contribution à l'étude des déterminants génétiques impliqués dans le processus infectieux de *Melampsora larici-populina*, l'agent de la rouille foliaire du peuplier.
- Halkett, F., Lannou, C., LE May, C., Montarry, J., Papaix, J., and Ravigné, V. 2021. L'adaptation des agents pathogènes de plantes aux systèmes cultivés : une évolution sous contraintes anthropiques. Pages 125–134 in: *L'immunité des plantes*, C. Lannou, D. Roby, V. Ravigné, M. Hannachi, and B. Moury, eds. Editions Quae, Versailles.
- Hartmann, F. E., Sánchez-Vallet, A., McDonald, B. A., and Croll, D. 2017. A fungal wheat pathogen evolved host specialization by extensive chromosomal rearrangements. *The ISME Journal*. 11:1189–1204
- Heil, M. 2009. Damaged-self recognition in plant herbivore defence. *Trends in Plant Science*. 14:356–363
- Hogenhout, S. A., and Bos, J. I. B. 2011. Effector proteins that modulate plant-insect interactions. *Current Opinion in Plant Biology*. 14:422–428
- Hogenhout, S. A., Van Der Hoorn, R. A. L., Terauchi, R., and Kamoun, S. 2009. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 22:115–122
- Hua, C., Zhao, J.-H., and Guo, H.-S. 2018. Trans-kingdom RNA silencing in plant-fungal pathogen interactions. *Molecular Plant*. 11:235–244
- IGN. 2019. Mémento - Edition 2019. Le mémento de l'inventaire forestier.
- Illergård, K., Ardell, D. H., and 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*. 77:499–508
- Jacob, F., Vernaldi, S., and Maekawa, T. 2013. Evolution and conservation of plant NLR functions. *Frontiers in Immunology*. 4:297
- Jia, Y., McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P., and Valent, B. 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *The EMBO Journal*. 19:4004–4014

- John, E., Singh, K. B., Oliver, R. P., and Tan, K. C. 2021. Transcription factor control of virulence in phytopathogenic fungi. *Molecular Plant Pathology*.
- Johnson, R. 1979. The concept of durable resistance. *Phytopathology*. 69:198–199
- Jombart, T. 2008. ADEGENET: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*. 24:1403–1405
- Jombart, T., and Ahmed, I. 2011. adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*. 27:3070–3071
- Jombart, T., and Collins, C. 2015. A tutorial for discriminant analysis of principal components (DAPC) using adegenet 2.0.0.
- Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature*. 444:323–329
- Jones, J. D. G., Vance, R. E., and Dangl, J. L. 2016. Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Science*. 354:aaf6395
- Jubic, L. M., Saile, S., Furzer, O. J., El Kasmi, F., and Dangl, J. L. 2019. Help wanted: helper NLRs and plant immune responses. *Current Opinion in Plant Biology*. 50:82–94
- Kachroo, P., Burch-smith, T. M., and Grant, M. 2021. An emerging role for chloroplasts in disease and defense. *Annual Review of Phytopathology*. 59:423–435
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiya, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., and Shibuya, N. 2006. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *PNAS*. 103:11086–11091
- Kale, S. D., Gu, B., Capelluto, D. G. S., Dou, D., Feldman, E., Rumore, A., Arredondo, F. D., Hanlon, R., Fudal, I., Rouxel, T., Lawrence, C. B., Shan, W., and Tyler, B. M. 2010. External lipid PI3P mediates entry of eukaryotic pathogen effectors into plant and animal host cells. *Cell*. 142:284–295
- Kangara, N., Kurowski, T. J., Radhakrishnan, G. V, Ghosh, S., Cook, N. M., Yu, G., Arora, S., Steffenson, B. J., Figueroa, M., Mohareb, F., Saunders, D. G. O., and Wulff, B. B. H. 2020. Mutagenesis of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* and selection of gain-of-virulence mutants. *Frontiers in Plant Science*. 11:570180
- Kanja, C., and Hammond-Kosack, K. E. 2020. Proteinaceous effector discovery and characterization in filamentous plant pathogens. *Molecular Plant Pathology*. 00:1–24
- Kemen, E., Kemen, A. C., Rafiqi, M., Hempel, U., Mendgen, K., Hahn, M., and Voegelé, R. T. 2005. Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 18:1130–1139
- Kemen, E., Kemen, A., Ehlers, A., Voegelé, R., and Mendgen, K. 2013. A novel structural effector from rust fungi is capable of fibril formation. *The Plant Journal*. 75:767–780
- Khan, M., Seto, D., Subramaniam, R., and Desveaux, D. 2018. Oh, the places they'll go! A survey of phytopathogen effectors and their host targets. *The Plant Journal*. 93:651–663
- Kourelis, J., and van der Hoorn, R. A. L. 2018. Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function. *The Plant Cell*. 30:285–299
- Kretschmer, M., Damoo, D., Djamei, A., and Kronstad, J. 2020. Chloroplasts and plant immunity: where are the fungal effectors? *Pathogens*. 9:19

- Kroj, T., Chanclud, E., Michel-Romiti, C., Grand, X., and Morel, J. B. 2016. Integration of decoy domains derived from protein targets of pathogen effectors into plant immune receptors is widespread. *New Phytologist*. 210:618–626
- Kubisiak, T. L., Anderson, C. L., Amerson, H. V., Smith, J. A., Davis, J. M., and Nelson, C. D. 2011. A genomic map enriched for markers linked to Avr1 in *Cronartium quercuum* f.sp. *fusiforme*. *Fungal Genetics and Biology*. 48:266–274
- Kumar, A. S., Park, E., Nedo, A., Alqarni, A., Ren, L., Hoban, K., Modla, S., McDonald, J. H., Kambhamettu, C., Dinesh-Kumar, S. P., and Caplan, J. L. 2018. Stromule extension along microtubules coordinated with actin-mediated anchoring guides perinuclear chloroplast movement during innate immunity. *eLife*. 7:1–33
- Kupeevicz, V. 1947. The physiology of the diseased plant in relation to the general questions of parasitism.
- Lannou, C., Roby, D., Ravigné, V., Hannachi, M., and Moury, B. 2021. L'immunité des plantes : Pour des cultures résistantes aux maladies. Quae. Versailles.
- Lawrence, G. J., Dodds, P. N., and Ellis, J. G. 2010. Transformation of the flax rust fungus, *Melampsora lini*: Selection via silencing of an avirulence gene. *The Plant Journal*. 61:364–369
- Lazar, N., Mesarich, C. H., Petit-Houdenot, Y., Talbi, N., de la Sierra-Gallay, I. L., Zélie, E., Blondeau, K., Gracy, J., Ollivier, B., Blaise, F., Rouxel, T., Balesdent, M. H., Idnurm, A., van Tilbeurgh, H., and Fudal, I. 2020. A new family of structurally conserved fungal effectors displays epistatic interactions with plant resistance proteins. *BioRxiv*. 2020.12.17.423041.
- Leach, J. E., Vera Cruz, C. M., Bai, J., and Leung, H. 2001. Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annual Review of Phytopathology*. 39:187–224
- Lee, S. W., Han, S. W., Sririyanum, M., Park, C. J., Seo, Y. S., and Ronald, P. C. 2009. A type I-secreted, sulfated peptide triggers XA21-mediated innate immunity. *Science*. 326:850–853
- Leple, J. C., Brasileiro, A. C. M., Michel, M. F., Delmotte, F., and Jouanin, L. 1992. Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. *Plant Cell Reports*. 11:137–141
- Li, F., Upadhyaya, N. M., Sperschneider, J., Matny, O., Nguyen-Phuc, H., Mago, R., Raley, C., Miller, M. E., Silverstein, K. A. T., Henningsen, E., Hirsch, C. D., Visser, B., Pretorius, Z. A., Steffenson, B. J., Schwessinger, B., Dodds, P. N., and Figueroa, M. 2019a. Emergence of the Ug99 lineage of the wheat stem rust pathogen through somatic hybridisation. *Nature Communications*. 10:5068
- Li, Y., Wang, M., See, D. R., and Chen, X. 2019b. Ethyl-methanesulfonate mutagenesis generated diverse isolates of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the wheat stripe rust pathogen. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 35:28
- Li, Y., Xia, C., Wang, M., Yin, C., and Chen, X. 2020. Whole-genome sequencing of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* mutant isolates identifies avirulence gene candidates. *BMC Genomics*. 21:247
- Lindeberg, M., Cunnac, S., and Collmer, A. 2012. *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in endless arguments. *Trends in Microbiology*. 20:199–208
- Lisboa, D. O., Evans, H. C., Araújo, J. P. M., Elias, S. G., and Barreto, R. W. 2020. *Moniliophthora perniciosa*, the mushroom causing witches' broom disease of cacao: insights into its taxonomy, ecology and host range in Brazil. *Fungal Biology*. 124:983–1003

- Littlejohn, G. R., Breen, S., Smirnoff, N., and Grant, M. 2021. Chloroplast immunity illuminated. *New Phytologist*. 229:3088–3107
- Liu, C., Pedersen, C., Schultz-Larsen, T., Aguilar, G. B., Madriz-Ordeñana, K., Hovmøller, M. S., and Thordal-Christensen, H. 2016. The stripe rust fungal effector PEC6 suppresses pattern-triggered immunity in a host species-independent manner and interacts with adenosine kinases. *New Phytologist*.
- Liu, R., Chen, T., Yin, X., Xiang, G., Peng, J., Fu, Q., Li, M., Shang, B., Ma, H., Liu, G., Wang, Y., and Xu, Y. 2021. A *Plasmopara viticola* RXLR effector targets a chloroplast protein PsbP to inhibit ROS production in grapevine. *The Plant Journal*. 106:1557–1570
- Liu, T., Song, T., Zhang, X., Yuan, H., Su, L., Li, W., Xu, J., Liu, S., Chen, L., Chen, T., Zhang, M., Gu, L., Zhang, B., and Dou, D. 2014. Unconventionally secreted effectors of two filamentous pathogens target plant salicylate biosynthesis. *Nature Communications*. 5:4686
- Liu, Y., Lan, X., Song, S., Yin, L., Dry, I. B., Qu, J., Xiang, J., and Lu, J. 2018. *In planta* functional analysis and subcellular localization of the oomycete pathogen *Plasmopara viticola* candidate RXLR effector repertoire. *Frontiers in Plant Science*. 9:286
- Lobstein, J., Emrich, C. A., Jeans, C., Faulkner, M., Riggs, P., and Berkmen, M. 2012. SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microbial Cell Factories*. 11:56
- Lo Presti, L., and Kahmann, R. 2017. How filamentous plant pathogen effectors are translocated to host cells. *Current Opinion in Plant Biology*. 38:19–24
- Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., Zuccaro, A., Reissmann, S., and Kahmann, R. 2015. Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual Review of Plant Biology*. 66:513–545
- Lorrain, C. 2018. Analyse moléculaire de l'interaction entre peupliers et *Melampsora* spp. par des approches génomiques et fonctionnelles.
- Lorrain, C., Gonçalves dos Santos, K. C., Germain, H., Hecker, A., and Duplessis, S. 2019. Advances in understanding obligate biotrophy in rust fungi. *New Phytologist*. 222:1190–1206
- Lorrain, C., Marchal, C., Hacquard, S., Delaruelle, C., Pétrowski, J., Petre, B., Hecker, A., Frey, P., and Duplessis, S. 2018a. The rust fungus *Melampsora larici-populina* expresses a conserved genetic program and distinct sets of secreted protein genes during infection of its two host plants, larch and poplar. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 31:695–706
- Lorrain, C., Petre, B., and Duplessis, S. 2018b. Show me the way: rust effector targets in heterologous plant systems. *Current Opinion in Microbiology*. 46:19–25
- Ludwig, N., Reissmann, S., Schipper, K., Gonzalez, C., Assmann, D., Glatter, T., Moretti, M., Ma, L.-S., Rexer, K.-H., Snetselaar, K., and Kahmann, R. 2021. A cell surface-exposed protein complex with an essential virulence function in *Ustilago maydis*. *Nature Microbiology*. 6:722–730
- Manning, V. A., Hardison, L. K., and Ciuffetti, L. M. 2007. Ptr ToxA interacts with a chloroplast-localized protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20:168–177
- Märkle, H., John, S., Cornille, A., Fields, P. D., and Tellier, A. 2021. Novel genomic approaches to study antagonistic coevolution between hosts and parasites. *Molecular Ecology*. 30:3660–3676

- Martin, R., Qi, T., Zhang, H., Liu, F., King, M., Toth, C., Nogales, E., and Staskawicz, B. J. 2020. Structure of the activated ROQ1 resistosome directly recognizing the pathogen effector XopQ. *Science*. 370:eabd9993
- Maupetit, A. 2018. Potentiel évolutif et déterminisme génétique de caractères d'agressivité et morphologiques de l'agent de la rouille du peuplier, *Melampsora larici-populina*.
- Maupetit, A., Larbat, R., Pernaci, M., Andrieux, A., Guinet, C., Boutigny, A. L., Fabre, B., Frey, P., and Halkett, F. 2018. Defense compounds rather than nutrient availability shape aggressiveness trait variation along a leaf maturity gradient in a biotrophic plant pathogen. *Frontiers in Plant Science*. 9:1396
- McDonald, B. A., and Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 40:349–379
- Mendgen, K. 1984. Development and physiology of teliospores. Pages 375–398 in: *The Cereal Rusts*, A.R. W Bushnell, ed. Cambridge.
- Miller, M. E., Nazareno, E. S., Rottschaefler, S. M., Riddle, J., Dos Santos Pereira, D., Li, F., Nguyen-Phuc, H., Henningsen, E., Persoons, A., Saunders, D. G. O., Stukenbrock, E., Dodds, P. N., Kianian, S. F., and Figueroa, M. 2020. Increased virulence of *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* populations through allele frequency changes at multiple putative Avr loci. *PLoS Genetics*. 16:e1009291
- Miller, M. E., Zhang, Y., Omidvar, V., Sperschneider, J., Schwessinger, B., Raley, C., Palmer, J. M., Garnica, D., Upadhyaya, N., Rathjen, J., Taylor, J. M., Park, R. F., Dodds, P. N., Hirsch, C. D., Kianian, S. F., and Figueroa, M. 2018. *De novo* assembly and phasing of dikaryotic genomes from two isolates of *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*, the causal agent of oat crown rust. *mBio*. 9:e01650-17
- Mitchum, M. G., Hussey, R. S., Baum, T. J., Wang, X., Elling, A. A., Wubben, M., and Davis, E. L. 2013. Nematode effector proteins: an emerging paradigm of parasitism. *New Phytologist*. 199:879–894
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., and Shibuya, N. 2007. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *PNAS*. 104:19613–19618
- Möller, M., and Stukenbrock, E. H. 2017. Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens. *Nature Reviews Microbiology*. 15:756–771
- Morris, C. E., and Moury, B. 2019. Revisiting the concept of host range of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 57:63–90
- Mueller, A. N., Ziemann, S., Treitschke, S., Aßmann, D., and Doehlemann, G. 2013. Compatibility in the *Ustilago maydis*-maize interaction requires inhibition of host cysteine proteases by the fungal effector Pit2. *PLoS Pathogens*. 9:e1003177
- Ngou, B. P. M., Ahn, H. K., Ding, P., and Jones, J. D. G. 2021. Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. *Nature*. 592:110–115
- Nirmala, J., Drader, T., Lawrence, P. K., Yin, C., Hulbert, S., Steber, C. M., Steffenson, B. J., Szabo, L. J., Von Wettstein, D., and Kleinhofs, A. 2011. Concerted action of two avirulent spore effectors activates Reaction to *Puccinia graminis* 1 (Rpg1)-mediated cereal stem rust resistance. *PNAS*. 108:14676–14681
- Noël, N., Lepé, J. C., and Pilate, G. 2002. Optimization of in vitro micropropagation and regeneration for *Populus x interamericana* and *Populus x euramericana* hybrids (*P. deltoides*, *P. trichocarpa*, and *P. nigra*). *Plant Cell Reports*. 20:1150–1155

- Nøhr, J., and Kristiansen, K. 2003. Site-directed mutagenesis. Pages 127–131 in: Protein misfolding and disease: Principles and protocols, P. Bross and N. Gregersen, eds. Totowa, New Jersey.
- Nürnberg, T., and Lipka, V. 2005. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology*. 6:335–345
- Oerke, E. C. 2006. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*. 144:31–43
- Oleksyk, T. K., Smith, M. W., and O'Brien, S. J. 2010. Genome-wide scans for footprints of natural selection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 365:185–205
- Ozketen, A. C., Andac-Ozketen, A., Dagvadorj, B., Demiralay, B., and Akkaya, M. S. 2020. In-depth secretome analysis of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in infected wheat uncovers effector functions. *Bioscience Reports*. 40:BSR20201188
- Panstruga, R., and Moscou, M. J. 2020. What is the molecular basis of nonhost resistance? *Molecular Plant-Microbe Interactions*.
- Park, E., Nedo, A., Caplan, J. L., and Dinesh-Kumar, S. P. 2018. Plant-microbe interactions: organelles and the cytoskeleton in action. *New Phytologist*. 217:1012–1028
- Pecrix, Y., Buendia, L., Penouilh-Suzette, C., Maréchaux, M., Legrand, L., Bouchez, O., Rengel, D., Gouzy, J., Cottret, L., Vear, F., and Godiard, L. 2019. Sunflower resistance to multiple downy mildew pathotypes revealed by recognition of conserved effectors of the oomycete *Plasmopara halstedii*. *The Plant Journal*. 97:730–748
- Pernaci, M. 2015. Etude des traits d'histoire de vie de *Melampsora larici-populina*, agent de la rouille du peuplier : De leur déterminisme génétique à leurs conséquences évolutives.
- Persoos, A. 2015. Les contournements de résistance par *Melampsora larici-populina*, l'agent de la rouille du peuplier : Impact démographique et déterminisme génétique.
- Persoos, A., Hayden, K. J., Fabre, B., Frey, P., De Mita, S., Tellier, A., and Halkett, F. 2017. The escalatory Red Queen: population extinction and replacement following arms race dynamics in poplar rust. *Molecular Ecology*. 26:1902–1918
- Persoos, A., Maupetit, A., Louet, C., Andrieux, A., Lipzen, A., Barry, K. W., Na, H., Adam, C., Grigoriev, I. V., Segura, V., Duplessis, S., Frey, P., Halkett, F., and De Mita, S. 2021. Genomic signatures of a major adaptive event in the pathogenic fungus *Melampsora larici-populina*. *BioRxiv*. 2021.04.09.439223.
- Persoos, A., Morin, E., Delaruelle, C., Payen, T., Halkett, F., Frey, P., De Mita, S., and Duplessis, S. 2014. Patterns of genomic variation in the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina* identify pathogenesis-related factors. *Frontiers in plant science*. 5:450
- Petre, B. 2012. Contribution à l'analyse post-génomique de l'interaction entre le peuplier et *Melampsora larici-populina*, le champignon biotrophe responsable de la maladie de la rouille foliaire.
- Petre, B., Contreras, M. P., Bozkurt, T. O., Schattat, M. H., Sklenar, J., Schornack, S., Abd-El-Haliem, A., Castells-Graells, R., Lozano-Durán, R., Dagdas, Y. F., Menke, F. L. H., Jones, A. M. E., Vossen, J. H., Robatzek, S., Kamoun, S., and Win, J. 2021. Host-interactor screens of *Phytophthora infestans* RXLR proteins reveal vesicle trafficking as a major effector-targeted process. *The Plant Cell*. 33:1447–1471
- Petre, B., Joly, D. L., and Duplessis, S. 2014. Effector proteins of rust fungi. *Frontiers in Plant Science*. 5:416

- Petre, B., and Kamoun, S. 2014. How do filamentous pathogens deliver effector proteins into plant cells? *PLoS Biology*. 12:e1001801
- Petre, B., Lorrain, C., Saunders, D. G. O., Win, J., Sklenar, J., Duplessis, S., and Kamoun, S. 2016a. Rust fungal effectors mimic host transit peptides to translocate into chloroplasts. *Cellular Microbiology*. 18:453–465
- Petre, B., Saunders, D. G. O., Sklenar, J., Lorrain, C., Krasileva, K. V., Win, J., Duplessis, S., and Kamoun, S. 2016b. Heterologous expression screens in *Nicotiana benthamiana* identify a candidate effector of the wheat yellow rust pathogen that associates with processing bodies. *PLoS ONE*. 11:e0149035
- Petre, B., Saunders, D. G. O., Sklenar, J., Lorrain, C., Win, J., Duplessis, S., and Kamoun, S. 2015. Candidate effector proteins of the rust pathogen *Melampsora larici-populina* target diverse plant cell compartments. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 28:689–700
- Petre, B., Win, J., Menke, F. L. H., and Kamoun, S. 2017. Protein–protein interaction assays with effector–GFP fusions in *Nicotiana benthamiana*. *Methods in Molecular Biology*. 1659: 85–98
- Pinon, J., and Frey, P. 2005. Interactions between poplar clones and *Melampsora* populations and their implications for breeding for durable resistance. Pages 139–154 in: *Rust diseases of willow and poplar*, M.H. Pei and A.R. McCracken, eds. CABI Publishing.
- Pinon, J., Frey, P., Husson, C., and Schipfer, A. 1998. Poplar rust (*Melampsora larici-populina*): the development of E4 pathotypes in France since 1994. *First IUFRO Rusts of Forest Trees*. 712:57–64
- Pusztahelyi, T., Holb, I. J., and 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., Pedley, K. F., Voegelé, R. T., Baum, T. J., and Whitham, S. A. 2018. Suppression or activation of immune responses by predicted secreted proteins of the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 31:163–174
- Qi, M., Link, T. I., Müller, M., Hirschburger, D., Pudake, R. N., Pedley, K. F., Braun, E., Voegelé, R. T., Baum, T. J., and Whitham, S. A. 2016. A small cysteine-rich protein from the asian soybean rust fungus, *Phakopsora pachyrhizi*, suppresses plant immunity. *PLoS Pathogens*. 12:e1005827
- Qutob, D., Kamoun, S., and Gijzen, M. 2002. Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy. *The Plant Journal*. 32:361–373
- Raffaele, S., and Kamoun, S. 2012. Genome evolution in filamentous plant pathogens: Why bigger can be better. *Nature Reviews Microbiology*. 10:417–430
- Rafiqi, M., Gan, P. H. P., Ravensdale, M., Lawrence, G. J., Ellis, J. G., Jones, D. A., Hardham, A. R., and Dodds, P. N. 2010. Internalization of flax rust avirulence proteins into flax and tobacco cells can occur in the absence of the pathogen. *The Plant Cell*. 22:2017–2032
- Ramachandran, S. R., Yin, C., Kud, J., Tanaka, K., Mahoney, A. K., Xiao, F., and Hulbert, S. H. 2017. Effectors from wheat rust fungi suppress multiple plant defense responses. *Phytopathology*. 107:75–83
- Rehmany, A. P., Gordon, A., Rose, L. E., Allen, R. L., Armstrong, M. R., Whisson, S. C., Kamoun, S., Tyler, B. M., Birch, P. R. J., and Beynon, J. L. 2005. Differential recognition of highly divergent downy mildew avirulence gene alleles by RPP1 resistance genes from two *Arabidopsis* lines. *The Plant Cell*. 17:1839–1850

- Rep, M., Van Der Does, H. C., Meijer, M., Van Wijk, R., Houterman, P. M., Dekker, H. L., De Koster, C. G., and Cornelissen, B. J. C. 2004. A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Molecular Microbiology*. 53:1373–1383
- Ridout, C. J., Skamnioti, P., Porritt, O., Sacristan, S., Jones, J. D. G., and Brown, J. K. M. 2006. Multiple avirulence paralogues in cereal powdery mildew fungi may contribute to parasite fitness and defeat of plant resistance. *The Plant Cell*. 18:2402–2414
- Rimbaud, L., Fabre, F., Papaix, J., Moury, B., Lannou, C., Barrett, L. G., and Thrall, P. H. 2021. Models of plant resistance deployment. *Annual Review of Phytopathology*. 59:125–152
- Rinaldi, C., Kohler, A., Frey, P., Duchaussoy, F., Ningre, N., Couloux, A., Wincker, P., Thiec, L., Fluch, S., Martin, F., and Duplessis, S. 2007. Transcript profiling of poplar leaves upon infection with compatible and incompatible strains of the foliar rust *Melampsora larici-populina*. *Plant Physiology*. 144:347–366
- Rooney, H. C. E. 2005. *Cladosporium* Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science*. 308:1783–1786
- Rouxel, T., and 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
- Salcedo, A., Rutter, W., Wang, S., Akhunova, A., Bolus, S., Chao, S., Anderson, N., De Soto, M. F., Rouse, M., Szabo, L., Bowden, R. L., Dubcovsky, J., and Akhunov, E. 2017. Variation in the *AvrSr35* gene determines *Sr35* resistance against wheat stem rust race Ug99. *Science*. 358:1604–1606
- Sánchez-Vallet, A., Fouché, S., Fudal, I., Hartmann, F. E., Soyer, J. L., Tellier, A., and Croll, D. 2018. The genome biology of effector gene evolution in filamentous plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 56:2.1-2.10
- Sánchez-Vallet, A., Hartmann, F. E., Marcel, T. C., and Croll, D. 2018. Nature's genetic screens: using genome-wide association studies for effector discovery. *Molecular Plant Pathology*. 19:3–6
- Saubin, M., De Mita, S., Zhu, X., Sudret, B., and Halkett, F. 2021. Impact of ploidy and pathogen life cycle on resistance durability. *BioRxiv*. 2021.05.28.446112
- Saunders, D. G. O., Win, J., Cano, L. M., Szabo, L. J., Kamoun, S., and Raffaele, S. 2012. Using hierarchical clustering of secreted protein families to classify and rank candidate effectors of rust fungi. *PLoS ONE*. 7
- Saur, I. M. L., Bauer, S., Kracher, B., Lu, X., Franzeskakis, L., Müller, M. C., Sabelleck, B., Kümmel, F., Panstruga, R., Maekawa, T., and Schulze-Lefert, P. 2019. Multiple pairs of allelic MLA immune receptor-powdery mildew AVRa effectors argue for a direct recognition mechanism. *eLife*. 8:e44471
- Savage, Z., Duggan, C., Toufexi, A., Pandey, P., Liang, Y., Segretin, M. E., Yuen, L. H., Gaboriau, D. C. A., Leary, A. Y., Tumtas, Y., Khandare, V., Ward, A. D., Botchway, S. W., Bateman, B. C., Pan, I., Schattat, M., Sparkes, I., and Bozkurt, T. O. 2021a. Chloroplasts alter their morphology and accumulate at the pathogen interface during infection by *Phytophthora infestans*. *The Plant Journal*. 10.1111/tpj.15416.
- Savage, Z., Erickson, J. L., Prautsch, J., Balmez, A. I., Tumtas, Y., Lok, E., Yuen, H., Stuttmann, J., Fantino, E., Duggan, C., Molinari, C., Schattat, M., and Bozkurt, T. O. 2021b. Chloroplast movement and positioning protein CHUP1 is required for focal immunity against *Phytophthora infestans*. *BioRxiv*. 2021.10.08.463641.

- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., and Nelson, A. 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology and Evolution*. 3:430–439
- Schorneck, S., Huitema, E., Cano, L. M., Bozkurt, T. O., Oliva, R., Van Damme, M., Schwizer, S., Raffaele, S., Chaparro-Garcia, A., Farrer, R., Segretin, M. E., Bos, J., Haas, B. J., Zody, M. C., Nusbaum, C., Win, J., Thines, M., and Kamoun, S. 2009. Ten things to know about oomycete effectors. *Molecular Plant Pathology*. 10:795–803
- Schürch, S., Linde, C. C., Knogge, W., Jackson, L. F., and McDonald, B. A. 2004. Molecular population genetic analysis differentiates two virulence mechanisms of the fungal avirulence gene *NIP1*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 17:1114–1125
- Schwessinger, B., Chen, Y.-J., Tien, R., Vogt, J. K., Sperschneider, J., Nagar, R., McMullan, M., Sicheritz-Ponten, T., Sørensen, C. K., Hovmøller, M. S., Rathjen, J. P., and Justesen, A. F. 2020. Distinct life histories impact dikaryotic genome evolution in the rust fungus *Puccinia striiformis* causing stripe rust in wheat. *Genome Biology and Evolution*. 12:597–617
- Schwessinger, B., Sperschneider, J., Cuddy, W. S., Garnica, D. P., Miller, M. E., Taylor, J. M., Dodds, P. N., Figueroa, M., Park, R. F., and Rathjen, J. P. 2018. A near-complete haplotype-phased genome of the dikaryotic wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* reveals high interhaplotype diversity. *mBio*. 9:e02275-17
- Segovia, V., Bruce, M., Shoup Rupp, J. L., Huang, L., Bakkeren, G., Trick, H. N., and Fellers, J. P. 2016. Two small secreted proteins from *Puccinia triticina* induce reduction of β -glucuronidase transient expression in wheat isolines containing Lr9, Lr24 and Lr26. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 38:91–102
- Shan, L., He, P., Li, J., Heese, A., Peck, S. C., Nürnberger, T., Martin, G. B., and Sheen, J. 2008. Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. *Cell Host and Microbe*. 4:17–27
- Sicard, A., Zeilinger, A. R., Vanhove, M., Schartel, T. E., Beal, D. J., Daugherty, M. P., and Almeida, R. P. P. 2018. *Xylella fastidiosa*: Insights into an emerging plant pathogen. *Annual Review of Phytopathology*. 56:181–202
- Singh, R. P., Hodson, D. P., Jin, Y., Lagudah, E. S., Ayliffe, M. A., Bhavani, S., Rouse, M. N., Pretorius, Z. A., Szabo, L. J., Huerta-Espino, J., Basnet, B. R., Lan, C., and Hovmøller, M. S. 2015. Emergence and spread of new races of wheat stem rust fungus: continued threat to food security and prospects of genetic control. *Phytopathology*. 105:872–884
- Slaminko, T. L., Miles, M. R., Frederick, R. D., Bonde, M. R., and Hartman, G. L. 2008. New legume hosts of *Phakopsora pachyrhizi* based on greenhouse evaluations. *Plant Disease*. 92:767–771
- Spanu, P. D. 2012. The genomics of obligate (and nonobligate) biotrophs. *Annual Review of Phytopathology*. 50:91–109
- Sperschneider, J., Catanzariti, A. M., Deboer, K., Petre, B., Gardiner, D. M., Singh, K. B., Dodds, P. N., and Taylor, J. M. 2017. LOCALIZER: subcellular localization prediction of both plant and effector proteins in the plant cell. *Scientific Reports*. 7:44598
- Sperschneider, J., Dodds, P. N., Gardiner, D. M., Singh, K. B., and Taylor, J. M. 2018a. Improved prediction of fungal effector proteins from secretomes with EffectorP 2.0. *Molecular Plant Pathology*. 19:2094–2110

- Sperschneider, J., Dodds, P. N., Singh, K. B., and Taylor, J. M. 2018b. ApoplastP: prediction of effectors and plant proteins in the apoplast using machine learning. *New Phytologist*. 217:1764–1778
- Sperschneider, J., Gardiner, D. M., Dodds, P. N., Tini, F., Covarelli, L., Singh, K. B., Manners, J. M., and Taylor, J. M. 2016. EffectorP: predicting fungal effector proteins from secretomes using machine learning. *New Phytologist*. 210:743–761
- Sperschneider, J., Williams, A. H., Hane, J. K., Singh, K. B., and Taylor, J. M. 2015. Evaluation of Secretion Prediction Highlights Differing Approaches Needed for Oomycete and Fungal Effectors. *Frontiers in Plant Science*. 6:1168
- Stahl, E. A., Dwyer, G., Mauricio, R., Kreitman, M., and Bergelson, J. 1999. Dynamics of disease resistance polymorphism at the *Rpm1* locus of *Arabidopsis*. *Nature*. 400:667–671
- Staples, R. C. 2000. Research on the rust fungi during the twentieth century. *Annual Review of Phytopathology*. 38:49–69
- Stergiopoulos, I., and De Wit, P. J. G. M. 2009. Fungal effector proteins. *Annual Review of Phytopathology*. 47:233–263
- Stukenbrock, E. H., Banke, S., Javan-Nikkhah, M., and McDonald, B. A. 2007. Origin and domestication of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* via sympatric speciation. *Molecular Biology and Evolution*. 24:398–411
- Stukenbrock, E. H., and Bataillon, T. 2012. A population genomics perspective on the emergence and adaptation of new plant pathogens in agro-ecosystems. *PLoS Pathogens*. 8:e1002893
- Stukenbrock, E. H., and McDonald, B. A. 2008. The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. *Annual Review of Phytopathology*. 46:75–100
- Takken, F. L. W., and Govere, A. 2012. How to build a pathogen detector: structural basis of NB-LRR function. *Current Opinion in Plant Biology*. 15:375–384
- Talhinhas, P., Batista, D., Diniz, I., Vieira, A., Silva, D. N., Loureiro, A., Tavares, S., Pereira, A. P., Azinheira, H. G., Guerra-Guimarães, L., Várzea, V., and Silva, M. D. C. 2017. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular Plant Pathology*. 18:1039–1051
- Tanaka, K., Choi, J., Cao, Y., and Stacey, G. 2014. Extracellular ATP acts as a damage-associated molecular pattern (DAMP) signal in plants. *Frontiers in Plant Science*. 5:446
- Tang, L., Yang, G., Ma, M., Liu, X., Li, B., Xie, J., Fu, Y., Chen, T., Yu, Y., Chen, W., Jiang, D., and Cheng, J. 2020. An effector of a necrotrophic fungal pathogen targets the calcium-sensing receptor in chloroplasts to inhibit host resistance. *Molecular Plant Pathology*. 21:686–701
- Teixeira, P. F., and Glaser, E. 2013. Processing peptidases in mitochondria and chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1833:360–370
- Tellier, A., and Brown, J. K. M. 2009. The influence of perenniality and seed banks on polymorphism in plant-parasite interactions. *The American Naturalist*. 174:769–779
- Terpe, K. 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72:211–222

- Thines, M. 2019. An evolutionary framework for host shifts – jumping ships for survival. *New Phytologist*. 224:605–617
- Thomma, B. P. H. J., Nürnberger, T., and Joosten, M. H. A. J. 2011. Of PAMPs and effectors: The blurred PTI-ETI dichotomy. *The Plant Cell*. 23:4–15
- Toruño, T. Y., Stergiopoulos, I., and Coaker, G. 2016. Plant-pathogen effectors: cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners. *Annual Review of Phytopathology*. 54:419–441
- Tuskan, G. A., DiFazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., Schein, J., Sterck, L., Aerts, A., Bhalerao, R. R., Bhalerao, R. P., Blaudez, D., Boerjan, W., Brun, A., Brunner, A., Busov, V., Campbell, M., Carlson, J., Chalot, M., Chapman, J., Chen, G.-L., Cooper, D., Coutinho, P. M., Couturier, J., Covert, S., Cronk, Q., Cunningham, R., Davis, J., Degroeve, S., Dejardin, A., DePamphilis, C., Detter, J., Dirks, B., Dubchak, I., Duplessis, S., Ehlting, J., Ellis, B., Gendler, K., Goodstein, D., Gribskov, M., Grimwood, J., Groover, A., Gunter, L., Hamberger, B., Heinze, B., Helariutta, Y., Henrissat, B., Holligan, D., Holt, R., Huang, W., Islam-Faridi, N., Jones, S., Jones-Rhoades, M., Jorgensen, R., Joshi, C., Kangasjarvi, J., Karlsson, J., Kelleher, C., Kirkpatrick, R., Kirst, M., Kohler, A., Kalluri, U., Larimer, F., Leebens-Mack, J., Leple, J.-C., Locascio, P., Lou, Y., Lucas, S., Martin, F., Montanini, B., Napoli, C., Nelson, D. R., Nelson, C., Nieminen, K., Nilsson, O., Pereda, V., Peter, G., Philippe, R., Pilate, G., Poliakov, A., Razumovskaya, J., Richardson, P., Rinaldi, C., Ritland, K., Rouze, P., Ryaboy, D., Schmutz, J., Schrader, J., Segerman, B., Shin, H., Siddiqui, A., Sterky, F., Terry, A., Tsai, C.-J., Uberbacher, E., Unneberg, P., Vahala, J., Wall, K., Wessler, S., Yang, G., Yin, T., Douglas, C., Marra, M., Sandberg, G., Van de Peer, Y., and Rokhsar, D. 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa*. *Science*. 313:1596–1604
- Upadhyaya, N. M., Mago, R., Panwar, V., Hewitt, T., Luo, M., Chen, J., Sperschneider, J., Nguyen-Phuc, H., Wang, A., Ortiz, D., Hac, L., Bhatt, D., Li, F., Zhang, J., Ayliffe, M., Figueroa, M., Kanyuka, K., Ellis, J. G., and Dodds, P. N. 2021. Genomics accelerated isolation of a new stem rust avirulence gene-wheat resistance gene pair. *Nature plants*. 7:1220–1228
- Upadhyaya, N. M., Mago, R., Staskawicz, B. J., Ayliffe, M. A., Ellis, J. G., and Dodds, P. N. 2014. A bacterial type III secretion assay for delivery of fungal effector proteins into wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 27:255–264
- Van Den Bosch, F., and Gilligan, C. A. 2003. Measures of durability of resistance. *Phytopathology*. 93:616–625
- van der Does, H. C., and Rep, M. 2017. Adaptation to the host environment by plant-pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*. 55:427–450
- van Der Hoorn, R. A. L., and Kamoun, S. 2008. From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *The Plant Cell*. 20:2009–2017
- van Esse, H. P., Reuber, T. L., and van der Does, D. 2020. Genetic modification to improve disease resistance in crops. *New Phytologist*. 225:70–86
- van Esse, H. P., Bolton, M. D., Stergiopoulos, I., De Wit, P. J. G. M., and Thomma, B. P. H. J. 2007. The chitin-binding *Cladosporium fulvum* effector protein Avr4 is a virulence factor. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20:1092–1101
- Vialle, A., Frey, P., Hambleton, S., Bernier, L., and Hamelin, R. C. 2011. Poplar rust systematics and refinement of *Melampsora* species delineation. *Fungal Diversity*. 50:227–248

- Voegele, R. T., and Mendgen, K. 2003. Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. *New Phytologist*. 159:93–100
- Voegele, R. T., and Mendgen, K. W. 2011. Nutrient uptake in rust fungi: how sweet is parasitic life? *Euphytica*. 179:41–55
- Wainberg, M., Sinnott-Armstrong, N., Mancuso, N., Barbeira, A. N., Knowles, D. A., Golan, D., Ermel, R., Ruusalepp, A., Quertermous, T., Hao, K., Björkegren, J. L. M., Im, H. K., Pasaniuc, B., Rivas, M. A., and Kundaje, A. 2019. Opportunities and challenges for transcriptome-wide association studies. *Nature Genetics*. 51:592–599
- Wan, J., Zhang, X. C., Neece, D., Ramonell, K. M., Clough, S., Kim, S. Y., Stacey, M. G., and Stacey, G. 2008. A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 20:471–481
- Wang, J., Hu, M., Wang, J., Qi, J., Han, Z., Wang, G., Qi, Y., Wang, H.-W., Zhou, J.-M., and Chai, J. 2019a. Reconstitution and structure of a plant NLR resistosome conferring immunity. *Science*. 364:eaav5870
- Wang, J., Wang, J., Hu, M., Wu, S., Qi, J., Wang, G., Han, Z., Qi, Y., Gao, N., Wang, H. W., Zhou, J. M., and Chai, J. 2019b. Ligand-triggered allosteric ADP release primes a plant NLR complex. *Science*. 364
- Wang, L., Zheng, D., Zuo, S., Chen, X., Zhuang, H., Huang, L., Kang, Z., and Zhao, J. 2018. Inheritance and linkage of virulence genes in chinese predominant race CYR32 of the wheat stripe rust pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Frontiers in Plant Science*. 9:120
- Wang, M., Weiberg, A., Lin, F. M., Thomma, B. P. H. J., Huang, H. Da, and Jin, H. 2016. Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature Plants*. 2:16151
- Wang, S., Boevink, P. C., Welsh, L., Zhang, R., Whisson, S. C., and Birch, P. R. J. 2017. Delivery of cytoplasmic and apoplastic effectors from *Phytophthora infestans* haustoria by distinct secretion pathways. *New Phytologist*. 216:205–215
- Wawra, S., Trusch, F., Matena, A., Apostolakis, K., Linne, U., Zhukov, I., Stanek, J., Koźmiński, W., Davidson, I., Secombes, C. J., Bayer, P., and van West, P. 2017. The RxLR motif of the host targeting effector AVR3a of *Phytophthora infestans* is cleaved before secretion. *The Plant Cell*. 29:1184–1195
- Weiberg, A., and Jin, H. 2015. Small RNAs—the secret agents in the plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology*. 26:87–94
- Weiberg, A., Wang, M., Lin, F.-M., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., Huang, H.-D., and Jin, H. 2013. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science*. 342:118–123
- Weirauch, M. T., and Hughes, T. R. 2011. A catalogue of eukaryotic transcription factor types, their evolutionary origin, and species distribution. Pages 25–73 in: *A handbook of transcription factors*, Springer, Dordrecht.
- Whisson, S. C., Boevink, P. C., Moleleki, L., Avrova, A. O., Morales, J. G., Gilroy, E. M., Armstrong, M. R., Grouffaud, S., van West, P., Chapman, S., Hein, I., Toth, I. K., Pritchard, L., and Birch, P. R. J. 2007. A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature*. 450:115–118
- Win, J., Chaparro-Garcia, A., Belhaj, K., and Yoshida, K. 2012. Effector biology of plant-associated organisms: Concepts and perspectives. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 77:235–247

- Wirthmueller, L., Maqbool, A., and Banfield, M. J. 2013. On the front line: structural insights into plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Microbiology*. 11:761–776
- Wu, C. H., Abd-El-Halim, A., Bozkurt, T. O., Belhaj, K., Terauchi, R., Vossen, J. H., and Kamoun, S. 2017. NLR network mediates immunity to diverse plant pathogens. *PNAS*. 114:8113–8118
- Xhaard, C., Barres, B., Andrieux, A., Bousset-Vaslin, L., Halkett, F., and Frey, P. 2012. Disentangling the genetic origins of a plant pathogen during disease spread using an original molecular epidemiology approach. *Molecular Ecology*. 21:2383–2398
- Xhaard, C., Fabre, B., Andrieux, A., Gladieux, P., Barrès, B., Frey, P., and Halkett, F. 2011. The genetic structure of the plant pathogenic fungus *Melampsora larici-populina* on its wild host is extensively impacted by host domestication. *Molecular Ecology*. 20:2739–2755
- Xiang, T., Zong, N., Zou, Y., Wu, Y., Zhang, J., Xing, W., Li, Y., Tang, X., Zhu, L., Chai, J., and Zhou, J. M. 2008. *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Current Biology*. 18:74–80
- Xin, X. F., and He, S. Y. 2013. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annual Review of Phytopathology*. 51:473–498
- Xin, X. F., Kvitko, B., and He, S. Y. 2018. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*. 16:316–328
- Xu, Q., Tang, C., Wang, X., Sun, S., Zhao, J., Kang, Z., and Wang, X. 2019. An effector protein of the wheat stripe rust fungus targets chloroplasts and suppresses chloroplast function. *Nature Communications*. 10:5571
- Yarwood, C. E. 1970. Man-made plant diseases. *Science*. 169:218–220
- Yuan, M., Jiang, Z., Bi, G., Nomura, K., Liu, M., Wang, Y., Cai, B., Zhou, J. M., He, S. Y., and Xin, X. F. 2021. Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity. *Nature*. 592:105–109
- Zambino, P. J., Kubelik, A. R., and Szabo, L. J. 2000. Gene action and linkage of avirulence genes to DNA markers in the rust fungus *Puccinia graminis*. *Phytopathology*. 90:819–826
- Zhang, X., Nguyen, N., Breen, S., Outram, M. A., Dodds, P. N., Kobe, B., Solomon, P. S., and Williams, S. J. 2017. Production of small cysteine-rich effector proteins in *Escherichia coli* for structural and functional studies. *Molecular Plant Pathology*. 18:141–151
- Zhong, Z., Marcel, T. C., Hartmann, F. E., Ma, X., Plissonneau, C., Zala, M., Ducasse, A., Confais, J., Compain, J., Lapalu, N., Amselem, J., McDonald, B. A., Croll, D., and Palma-Guerrero, J. 2017. A small secreted protein in *Zymoseptoria tritici* is responsible for avirulence on wheat cultivars carrying the *Stb6* resistance gene. *New Phytologist*. 214:619–631
- Zhou, E., Jia, Y., Singh, P., Correll, J. C., and Lee, F. N. 2007. Instability of the *Magnaporthe oryzae* avirulence gene *AVR-Pita* alters virulence. *Fungal Genetics and Biology*. 44:1024–1034
- Zipfel, C. 2009. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology*. 12:414–420
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E. J., Jones, J. D. G., Felix, G., and Boller, T. 2004. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*. 428:764–767

Zurbriggen, M. D., Carrillo, N., Tognetti, V. B., Melzer, M., Peisker, M., Hause, B., and Hajirezaei, M. R. 2009. Chloroplast-generated reactive oxygen species play a major role in localized cell death during the non-host interaction between tobacco and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *The Plant Journal*. 60:962–973

Annexes

LISTE DES ANNEXES

- Annexe 1 Article n°5 – Genomic signatures of a major adaptive event in the pathogenic fungus *Melampsora larici-populina*
- Annexe 2 Article n°6 – 2000-2019: twenty years of highly influential publications in plant immunity

Annexe 1

Article n°5 – Genomic signatures of a major adaptive event in the pathogenic fungus *Melampsora larici-populina*

Antoine Persoons, Agathe Maupetit, **Clémentine Louet**, Axelle Andrieux, Anna Lipzen, Kerrie W. Barry, Hyunsoo Na, Catherine Adam, Igor V. Grigoriev, Vincent Segura, Sébastien Duplessis, Pascal Frey, Fabien Halkett and Stéphane De Mita

Article de recherche soumis dans la revue *Genome Biology and Evolution* et en libre accès depuis le 11 avril 2021 sur le serveur BioRxiv (<https://www.BioRxiv.org/content/10.1101/2021.04.09.439223v1>) pour la version affichée ici.

Genomic signatures of a major adaptive event in the pathogenic fungus *Melampsora larici-populina*

Antoine Persoons¹, Agathe Maupetit^{1,2}, **Clémentine Louet**¹, Axelle Andrieux¹, Anna Lipzen³, Kerrie W. Barry³, Hyunsoo Na³, Catherine Adam³, Igor V. Grigoriev^{3,4}, Vincent Segura^{5,6}, Sébastien Duplessis¹, Pascal Frey¹, Fabien Halkett¹⁺ and Stéphane De Mita^{1,7§}

¹Université de Lorraine, INRAE, IAM, Nancy, France.

²Physiology and Biotechnology of Algae Laboratory, IFREMER, Nantes, France.

³US Department of Energy Joint Genome Institute, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, California, USA.

⁴Department of Plant and Microbial Biology, University of California Berkeley, Berkeley, California, USA.

⁵BioForA, INRAE, ONF, Orléans, France.

⁶UMR AGAP Institut, Univ Montpellier, CIRAD, INRAE, Institut Agro, F-34398 Montpellier, France.

⁷PHIM, Univ Montpellier, INRAE, CIRAD, Institut Agro, IRD, Montpellier, France.

⁺To whom general enquiries and correspondence regarding biological material should be addressed.

[§]To whom correspondence regarding analyses and data should be addressed.

Abstract

Background: The recent availability of genome-wide sequencing techniques has allowed systematic screening for molecular signatures of adaptation, including in non-model organisms. Host-pathogen interactions constitute good models due to the strong selective pressures that they entail. We focused on an adaptive event which affected the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina* when it overcame a resistance gene borne by its host, cultivated poplar. Based on 76 virulent and avirulent isolates framing narrowly the estimated date of the adaptive event, we examined the molecular signatures of selection.

Results: Using an array of genome scan methods, we detected a single locus exhibiting a consistent pattern suggestive of a selective sweep in virulent individuals (excess of differentiation between virulent and avirulent samples, linkage disequilibrium, genotype-phenotype statistical association and long-range haplotypes). Our study pinpoints a single gene and further a single amino acid replacement which may have allowed the adaptive event. Although the selective sweep occurred only four years earlier, it does not seem to have affected genome diversity further than the immediate vicinity of the causal locus.

Conclusions: Our results suggest that *M. larici-populina* under-went a soft selective sweep and possibly a prominent effect of outbreeding and recombination, which we speculate have increased the efficiency of selection.

Keywords: Population genomics, plant-pathogen interactions, co- evolution, genome-wide association studies, genome scan

Annexe 2

Article n°6 – 2000-2019: twenty years of highly influential publications in plant immunity

Benjamin Petre, **Clémentine Louet**, Julie Lintz, Sébastien Duplessis

Article de recherche soumis dans la revue *Nature Plants* et en libre accès depuis le 25 août 2021 sur le serveur HAL (<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03325099v2>) pour la version affichée ici.

2000-2019: twenty years of highly influential publications in plant immunity

Benjamin Petre*, **Clémentine Louet**, Julie Lintz, Sébastien Duplessis

Université de Lorraine, INRAE, IAM, F-54000 Nancy, France.

*Corresponding author: Benjamin Petre – Université de Lorraine, INRAE, UMR 1136 IAM Interactions Arbres-Microorganismes 54000 Nancy, France – benjamin.petre@univ-lorraine.fr

Abstract

Molecular plant immunity is a dynamic research field that broadly addresses how plants interact with their associated organisms and defend themselves against pests and pathogens. Here, we aimed at providing readers with a snap-shot of top-tiers molecular plant immunity research, by identifying and analyzing the 170 most highly-cited publications (aka Highly-Influential Publications in Plant Immunity; hereafter HIPPYs) published in this field between 2000 and 2019. Our analysis draws a broad analytical knowledge of the most influential scientific advances in the field, as well as the research community that made them. We notably show that HIPPYs are shared by a small, structured, and connected research community. The HIPPYs address coherent research questions using a handful of key model objects (i.e. organisms or molecules), and report findings and concepts that collectively shape our integrated understanding on the molecular interactions between plants and their associated organisms. Our 'HIP in' method is easily transposable to other large research areas, and may help early-career researchers to gain a broader knowledge of their field of interest.

Keywords: plant defense, bibliometric pipeline, Web of Science, *Arabidopsis thaliana*, plant pathology, symbiont, microbe

Bilan des activités doctorales

Publications

Louet C., Saubin M., Andrieux A., Persoons A., Gorse M., Petrowski J., De Mita S., Fabre B., Duplessis S., Frey P. and Halkett F. A point mutation and a large deletion at the *AvrMlp7* avirulence locus in the poplar rust correlate with the *RMlp7* resistance breakdown. *Accepté en octobre 2021 pour publication dans la revue Molecular Ecology*.

Persoons A., Maupetit A., **Louet C.**, Segura V., Lipzen A., Andrieux A., Barry K., Grigoriev I., Duplessis S., Frey P., Halkett F. and De Mita S. (2021) Genomic signatures of a major adaptive event in the pathogenic fungus *Melampsora larici-populina*. *Soumis à Genome Biology and Evolution et en libre accès sur BioRxiv* (<https://www.BioRxiv.org/content/10.1101/2021.04.09.439223v1>).

Petre B., **Louet C.**, Lintz J. and Duplessis S. (2021). 2000-2019: twenty years of influential papers in plant immunity. *Soumis à Nature Plants et en libre accès sur HAL de l'INRAE* (<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03325099v2>).

Louet C., Blot C., Shelest E., Guerillot P., Pétrowski J., Frey P. and Duplessis S. Expert annotation and life-cycle transcriptomics of transcription factors in rust fungi (Pucciniales) highlight the role of cold shock proteins in dormancy exit. *Soumis à Fungal Genetics and Biology et en libre accès sur BioRxiv* (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.10.19.465044v1>).

Louet C., Duplessis S., Halkett F., Frey P. and Petre B. 2000-2020 - A survey of highly influential studies on plant pathogen effectors during the last two decades (2000-2020). *En préparation pour une soumission à Molecular Plant Pathology et en libre accès sur HAL de l'INRAE* (<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03388325>).

Guerillot P., Morin E., Kohler A., **Louet C.** and Duplessis S. (2021) A comprehensive collection of transcriptome data to support life cycle transcriptomics analysis of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*. *En libre accès sur BioRxiv* (<https://www.BioRxiv.org/content/10.1101/2021.07.25.453710v1>).

Communications

Présentations orales (incluant les séminaires internes à l'UMR IAM)

2021, 22 mai – Webinaire – Séminaire sur la durabilité de la résistance, *RMlp7 resistance breakdown in the pathosystem poplar-poplar rust: from molecular to modelling approaches*.

2021, 18 février – Webinaire – Séminaire interne à l'UMR IAM, *From population genomics to molecular approaches to identify and analyze the first avirulence gene in the poplar rust fungus Melampsora larici-populina*.

2020, 27 novembre – Webinaire – Conférence REID, *From population genomics to molecular approaches to identify and analyze the first avirulence gene in the poplar rust fungus Melampsora larici-populina.*

2019, 24 novembre – Montpellier, France – Effectome meeting XII, *First avirulence gene in the poplar rust fungus Melampsora larici-populina, from genetic characterization towards functional validation.*

2019, 03 juin – Nancy, France – Séminaire interne à l'UMR IAM, *Functional analysis of salivary effectors in the apple-tree leaf-miner Phyllonorycter sp.*

Communications sous forme de poster

2021, 15 septembre – Webinaire – Conférence IS-MPMI, eSymposia, Pathogen-Host Coevolution, *A point mutation and a large deletion at the AvrMlp7 avirulence locus in the poplar rust correlate with the RMIp7 resistance breakdown.*

2020, 13 février – Nancy, France – Séminaire annuel de l'École Doctorale SIRENa, *Genetic characterization of the first avirulence gene described in the poplar rust fungus Melampsora larici-populina.*

Formation scientifique

Participation à des congrès scientifiques

2021, 15-16 septembre – Webinaire – Conférence IS-MPMI, eSymposia, Pathogen-Host Coevolution

2021, 21-22 mai – Webinaire – Séminaire sur la durabilité de la résistance

2020, 26-27 novembre – Webinaire – Conférence REID

2019, 23-25 novembre – Montpellier, France – Effectome meeting XII

2019, 20 juin – Nancy, France – Journée des Docs/Post-Docs de l'UMR IAM

Formations doctorales

- Formations disciplinaires
 - Utilisation de R en biostatistiques / 20 heures
 - Initiation au logiciel R / 35 heures
 - Décision statistique / 14 heures
 - Expression de protéines recombinantes dans *E. coli* et purification / 20 heures
- Ethique et intégrité scientifique
 - Culture de l'intégrité scientifique / 8 heures

- Compétences transverses
 - Papyrus (trouver et organiser sa documentation ; rédiger, valoriser, publier son travail de recherche) / 35 heures
 - Sauveteur Secouriste du Travail (SST) / 21 heures
- Langues
 - Cours d'anglais / 40 heures
- Aide à l'insertion professionnelle
 - Les métiers de la recherche académique / 12 heures
- Médiation scientifique
 - Découvrir la médiation scientifique / 6 heures
 - Zététique et auto-défense intellectuelle / 12 heures

Enseignement & Encadrement d'étudiants

Vacations

Année universitaire 2020-2021 : 12 heures (Travaux dirigés) en 'Génétique et Microbiologie' et 36 heures (Travaux pratiques) en 'Microbiologie appliquée' pour des étudiants en Licence 1

Année universitaire 2019-2020 : 48 heures (Travaux dirigés et travaux pratiques) en 'Génétique et Microbiologie' pour des étudiants en Licence 1

Encadrements d'étudiants

(co-encadrant, S. Duplessis DR INRAE)

2021, avril-mai – Carla Blot, stage de Master 1, Université de Lorraine

2021, avril-mai – Pamela Guerillot, stage de Master 1, Université de Lorraine

2019, avril-mai – Théo Deremarque, stage de Master 1, Université de Lorraine

Autres informations

- Représentante élue des doctorants au Conseil Scientifique de l'UMR IAM (2020-2021)
- Co-organisatrice d'un webinaire sur la durabilité de la résistance regroupant 40 à 50 personnes (2021, 21-22 mai)
- Membre de la Société Française en Phytopathologie (2018-2021)
- Médiation scientifique au Salon International de L'Agriculture, Paris, France (2019, 23-26 février)
- Co-organisatrice de la journée des Docs/Post-Docs de l'UMR (2019)



Genetic characterization of the first avirulence gene described in the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*



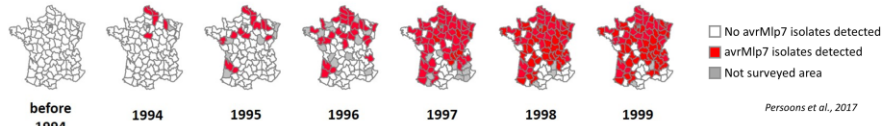
C. Louet, M. Saubin, A. Persoons, S. De Mita, A. Andrieux, B. Fabre, J. Pétrowski, S. Duplessis, P. Frey, F. Halkett
INRAE, Lorraine University, UMR IAM, 54000 Nancy, France



Spread of virulent *avrMlp7* isolates after the *RMlp7* resistance gene breakdown carried by poplar cultivars

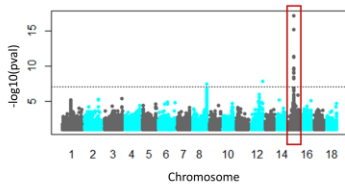


***Melampsora larici-populina* (Mlp)**
Obligate biotroph, diploid on poplar leaves



What is the genetic event responsible for this major breakdown and the complete replacement of avirulent by virulent populations in France?

Identification of *AvrMlp7*, an avirulence candidate gene



GWAS on *AvrMlp7/avrMlp7* isolates:
One gene specifically highlighted on the chromosome 15
Maupetit, 2018

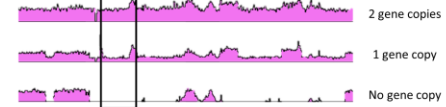
The candidate avirulence gene possesses some characteristics of canonical effectors (coding a cysteine rich protein, specific to *M. larici-populina*, early expressed and of unknown function), but lacks a classical secretion signal.

One gene, two variations

Non-synonymous SNP
(Single Nucleotide Polymorphism)

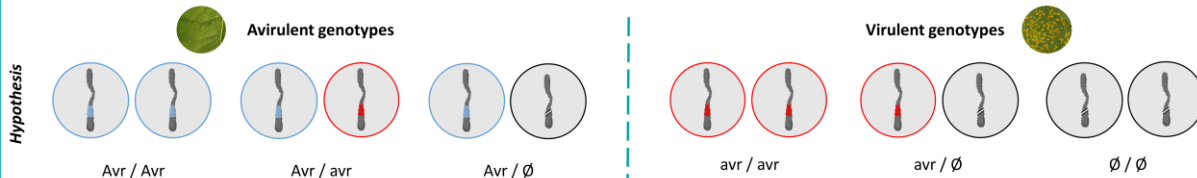


Partial or complete deletion



Six genotypes at the *AvrMlp7* candidate locus

Following Flor's Gene-for-Gene model, the avirulent allele *Avr* is dominant and the virulent allele *avr* is recessive. Thus, the occurrence of *Avr* allele in a heterozygous state should be enough to trigger plant resistance. Therefore, to become virulent, a diploid pathogen must associate two recessive virulent alleles.



Method: SNP (allelic discrimination) and deletion (copy number variation) detected by qPCR

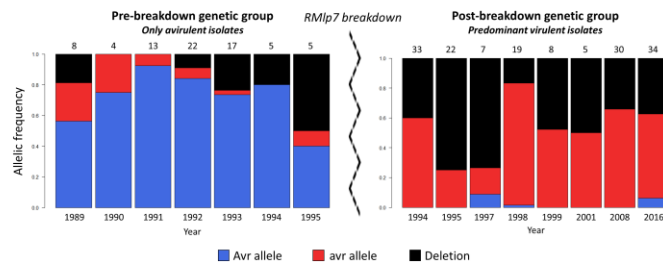
		Phenotype		Σ	
		Avirulent (<i>AvrMlp7</i>)	Virulent (<i>avrMlp7</i>)		
Results	Genotype	<i>Avr / Avr</i>	57		57
		<i>Avr / avr</i>	25	1	26
		<i>Avr / ∅</i>	33	1	34
		<i>avr / avr</i>	1	45	46
		<i>avr / ∅</i>	5	52	57
		<i>∅ / ∅</i>	2	47	49
Σ		123	146	269	

≈4% errors

The genotype/phenotype concordance consolidates the hypothesis that this candidate is the *AvrMlp7* avirulence gene.

Temporal evolution of the *AvrMlp7* candidate gene

The replacement of the ancestral pathogen population is in agreement with the combination of these two independent variations in natural pathogen populations.



Conclusion

The association of these two independent variations at the *AvrMlp7* candidate locus is in accordance with the expected link between genotype and phenotype. Moreover, the combined analysis of genetic, genotypic and phenotypic data shed light on a relevant temporal evolution of the candidate gene according to the resistance gene breakdown. The next step involves functional validation to characterize further the first avirulence gene identified in this biotrophic fungal species.

Flor, H. H. 1956. The complementary genetic systems in flax and flax rust. *Adv. Genet.* 8:29-54
Maupetit, A. 2018. Potentiel évolutif et déterminisme génétique de caractères d'agressivité et morphologiques de l'agent de la rouille du peuplier, *Melampsora larici-populina* (Thèse de doctorat, Université de Lorraine).
Persoons, A., Hayden, K. J., Fabre, B., Frey, P., De Mita, S., Teller, A., and Halkett, F. 2017. The escalatory Red Queen: Population extinction and replacement following arms race dynamics in poplar rust. *Mol. Ecol.* 26:1902-1918



A point mutation and a large deletion at the *AvrMlp7* avirulence locus in the poplar rust correlate with the *RMlp7* resistance breakdown



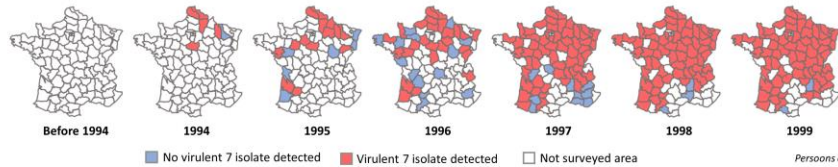
C. Louet, M. Saubin, A. Persoons, S. De Mita, A. Andrieux, B. Fabre, J. Pétrowski, S. Duplessis, P. Frey, F. Halkett
INRAE, Lorraine University, UMR IAM, 54000 Nancy, France



1. Virulent population of *Melampsora larici-populina* towards *RMlp7* poplar cultivars spread in four years



***Melampsora larici-populina* (*Mlp*)**
Obligate biotroph, dikaryotic (n+n)
on poplar leaves

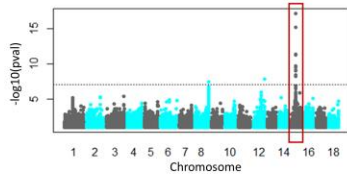


Persoons et al., 2017

What is the genetic event responsible for this major breakdown and the complete replacement of avirulent by virulent populations in France?

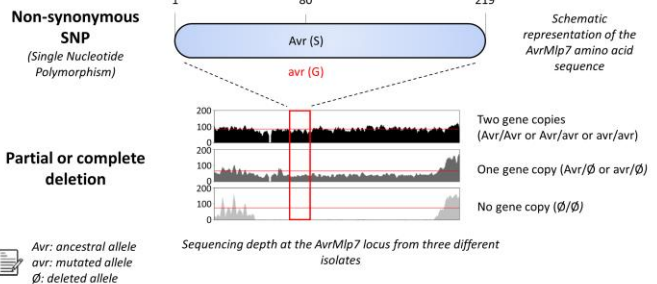
2. GWAS identifies the *AvrMlp7* candidate locus on chromosome 15

Method: GWAS on avirulent/virulent isolates (Persoons et al., 2021)



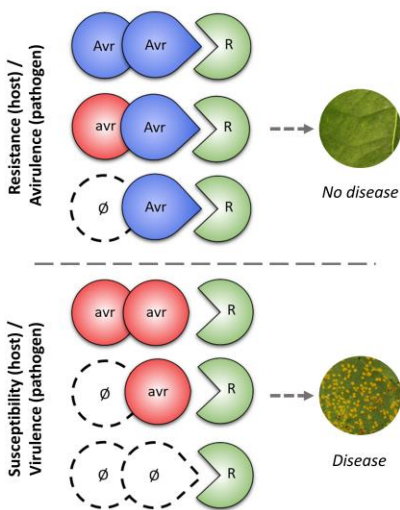
The candidate avirulence gene possesses some characteristics of canonical effectors (coding a cysteine rich protein, specific to *M. larici-populina* early expressed and of unknown function), but lacks a classical secretion signal.

3. Two types of alterations co-occur at the *AvrMlp7* candidate locus



4. Two variations at the *AvrMlp7* locus results in six genotypes

Following Flor's Gene-for-Gene model, the avirulent allele *Avr* is dominant and the virulent allele *avr* is recessive. Thus, the occurrence of *Avr* allele in a heterozygous state should be enough to trigger plant resistance. Therefore, to become virulent, a diploid pathogen must associate two recessive virulent alleles.



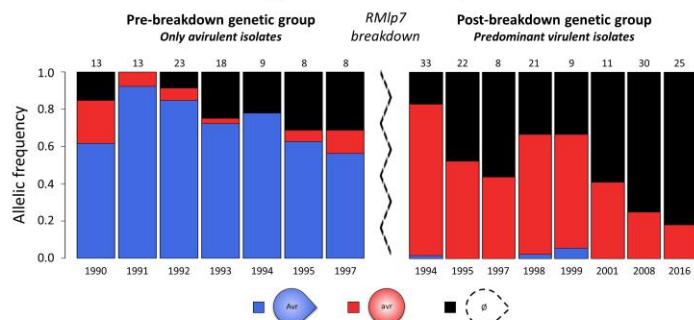
5. Polymorphisms at the *AvrMlp7* candidate locus correlate with phenotype

Method: SNP (allelic discrimination) and deletion (copy number variation) detected by qPCR

		Genotype						
		Avr/Avr	Avr/avr	∅/Avr	avr/avr	∅/avr	∅/∅	Total
Phenotype	A7	64	27	33	-	1	3	128
	a7	-	1	-	44	58	50	153
	Total	64	28	33	44	59	53	281

Only five discrepancies according to the gene-for-gene model (2.14% of tested isolates).

6. Avirulence allele disappears after the *RMlp7* resistance breakdown



7. *AvrMlp7* is an excellent avirulent effector candidate

The association of these two independent variations at the *AvrMlp7* candidate locus is in accordance with the expected link between genotype and phenotype. Moreover, the combined analysis of genetic, genotypic and phenotypic data shed light on a temporal evolution of the candidate gene consistent with the resistance breakdown. The next step involves functional validation to characterize further the first avirulence gene identified in this biotrophic fungal species.

Flor, H. H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. Annual Review of Phytopathology 9:275-296
Persoons, A., Hayden, K. J., Fabre, B., Frey, P., De Mita, S., Teller, A., and Halkett, F. 2017. The escalatory Red Queen: population extinction and replacement following arms race dynamics in poplar rust. Molecular Ecology, 26:1902-1918
Persoons, A., Maupetit, A., Louet, C., Andrieux, A., Lipzen, A., Barry, K. W., Na, H., Adam, C., Grigoriev, I. V., Segura, V., Duplessis, S., Frey, P., Halkett, F., and De Mita, S. 2021. Genomic signatures of a major adaptive event in the pathogenic fungus *Melampsora larici-populina*. bioRxiv.

Résumé : *Melampsora larici-populina* (Basidiomycète, Pucciniales) est un champignon biotrophe obligatoire qui infecte successivement deux hôtes, le peuplier et le mélèze, et qui produit cinq types de spores au cours de son cycle de vie. Ce dernier est l'agent causal de la rouille du peuplier, la principale contrainte sanitaire dans les peupleraies européennes. Un des objectifs de l'UMR Interactions Arbres/Microorganismes est de caractériser les déterminants moléculaires impliqués dans l'interaction entre le peuplier et *M. larici-populina* et d'étudier leur évolution. Cette thèse, reposant sur la mobilisation d'expertises diversifiées allant de la génétique des populations à la biochimie des protéines, a permis de mener à bien trois projets de recherche. Premièrement, une étude, alliant des approches moléculaires et la génétique des populations, a identifié une association significative entre l'évolution du gène d'avirulence candidat *AvrMlp7* et le contournement de la résistance qualitative *RMlp7* du peuplier. L'association et la coexistence de deux altérations au locus candidat confèrent la virulence, fournissant pour la première fois des déterminants génétiques expliquant un événement de contournement chez cet agent pathogène. Deuxièmement, un effort a porté sur le développement d'approches fonctionnelles sur ce pathosystème. L'expression de l'effecteur candidat *AvrMlp7* dans le système hétérologue *Nicotiana benthamiana* a notamment permis de mettre en évidence sa localisation chloroplastique, suggérant un rôle potentiel dans la modulation de fonctions associées à cet organelle. Le caractère d'avirulence de ce gène candidat reste néanmoins encore à démontrer fonctionnellement. Troisièmement, sur la base de données transcriptomiques, des familles de facteurs de transcription ont pu être associées à des transitions biologiques spécifiques du cycle de vie de *M. larici-populina*. Ainsi, la famille des cold-shock protéines (CSP) est plus particulièrement associée à la levée de dormance et à la production de basides et de basidiospores à partir de télies, à la sortie de l'hiver. Cette étude identifie pour la première fois des acteurs régulant des processus fondamentaux de la biologie des Pucciniales au-delà des seuls processus infectieux. De manière générale, les travaux réalisés dans cette thèse ouvrent de nouvelles perspectives quant à la plus-value d'associer plusieurs disciplines pour améliorer notre compréhension des interactions hôtes-pathogènes.

Mots-clés : phytopathologie, relation gène-pour-gène, Pucciniales, évolution, résistance qualitative, interactions moléculaires plante-microorganisme, facteurs de transcription, chloroplastes, protéines sécrétées

Evolutionary and molecular analyses of genetic determinants involved in the interaction between the poplar rust fungus and its host

Abstract: *Melampsora larici-populina* (Basidiomycete, Pucciniales) is an obligate biotrophic plant pathogen that successively infects two hosts, poplar and larch, and produces five spore types during its life cycle. This fungus is the causal agent of poplar rust, the main sanitary constraint in European poplar cultures. One of the objectives of the UMR Tree/Microorganism Interactions is to characterize the molecular determinants involved in the interaction between poplar and *M. larici-populina* and to study their evolution. This thesis which relied on diverse research fields, ranging from population genetics to protein biochemistry, led to the development of three projects. First, a study, combining molecular approaches and population genetics, identified a significant association between the evolution of the candidate avirulence gene *AvrMlp7* and the breakdown of the *RMlp7*-mediated resistance carried by some poplar cultivars. The association and coexistence of two alterations at the candidate locus confer virulence, providing for the first time insights on the genetic determinants responsible for a breakdown event in this pathogen. Second, an effort was made to develop functional approaches on this pathosystem. The expression of the candidate effector *AvrMlp7* in the heterologous system *Nicotiana benthamiana* highlighted its chloroplastic localization, suggesting its potential role in modulating functions associated with this organelle. However, despite extensive functional investigations, the avirulence function of this candidate gene has not yet been formally demonstrated. Third, based on transcriptomic data, families of transcription factors could be associated with specific biological transitions along the life cycle of *M. larici-populina*. The cold-shock protein (CSP) family was found to be tightly associated with the exit of dormancy and the production of basidia and basidiospores from telia following an overwintering period. This study identifies for the first time factors regulating fundamental biological processes in Pucciniales, beyond the predominantly studied infection processes. In perspective, thanks to the added-values of combining several research fields, this thesis work opens new avenues in our attempt to understanding host-pathogen interactions.

Keywords: phytopathology, gene-for-gene interaction, Pucciniales, evolution, qualitative resistance, molecular plant-microbe interactions, transcription factors, chloroplasts, secreted proteins