



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Cotutelle internationale avec :

Présentée et soutenue par :

Quentin GASCUEL

Le mardi 16 décembre 2014

Titre :

Identification, variabilité, et connaissance in planta des effecteurs de pathogénicité de l'oomycète *Plasmopara halstedii*, l'agent du mildiou du tournesol.

ED SEVAB : Interactions plantes-microorganismes

Unité de recherche :

UMR CNRS 2594 INRA 441

Directeur(s) de Thèse :

Laurence GODIARD (directeur), Patrick VINCOURT (co-directeur)

Rapporteurs :

Rapporteurs proposés:

Sébastien DUPLESSIS, Isabelle GROLIER-FUDAL, Franck PANABIERES

Autre(s) membre(s) du jury :

Christophe ROUX, Sylvain RAFFAELE

Table des abreviations.....	7
Introduction générale.....	11
I. Préambule.....	11
II. Le tournesol, une culture stratégique.....	11
II.A. Historique de la domestication du tournesol (Figure 1).....	11
II.B. Biologie du tournesol.....	13
II.C. Atouts agronomiques et économiques du tournesol.....	17
II.C.1. Atouts agronomiques : Une culture résistante aux stress environnementaux.	17
II.C.2. Atouts économiques : Le tournesol offre de nombreux débouchés.	18
II.D. Production, enjeux et problématiques actuelles.....	22
III. Principales maladies du tournesol, leur impact et les moyens de lutte.	24
III.A. Les maladies du tournesol.....	24
III.A.1. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	24
III.A.2. <i>Phomopsis helianthi</i>	25
III.A.3. <i>Phoma macdonaldii</i>	25
III.A.4. <i>Plasmopara halstedii</i>	28
III.A.5. <i>Orobanche cumana</i>	28
III.A.6. Autres agents pathogènes du tournesol.	28
III.B. Moyens de lutte.....	30
III.B.1. Lutte chimique.....	30
III.B.2. Résistance variétale.	30
III.B.3. Conduite de culture.	31
IV. Interactions plantes-agents pathogènes.....	34
IV.A. Défenses préformées et induites chez les plantes.....	34
IV.B. Modèle zig-zag.....	36
IV.B.1. Perception extracellulaire de l'agent pathogène par la plante.....	38
IV.B.1.1) PAMPs, MAMPs et DAMPs.	38

IV.B.1.2)	Reconnaissance des agents pathogènes et initiation du signal de danger.....	42
IV.B.1.3)	Transduction et intégration des signaux de danger.....	44
IV.B.2.	Les effecteurs, déterminants clés du pouvoir pathogène.....	47
IV.B.2.1)	Le rôle des effecteurs dans la virulence des agents pathogènes.....	48
IV.B.2.2)	Localisation subcellulaire des effecteurs.....	52
IV.B.3.	Perception intracellulaire des effecteurs cytoplasmiques de l'agent pathogène.....	54
IV.B.3.1)	Gènes de résistance de la plante.....	54
IV.B.3.2)	Intégration des signaux de danger et mise en place des défenses de la plante.....	56
IV.C.	Co-évolution plantes-agents pathogènes : une course à l'armement.....	57
IV.C.1.	Côté agent pathogène.....	57
IV.C.2.	Côté plante.....	59
IV.D.	La durabilité des résistances chez les plantes.....	60
V.	Les oomycètes pathogènes des plantes.....	63
V.A.	Les oomycètes.....	63
V.B.	Les effecteurs cytoplasmiques des oomycètes : les CRN et les RxLR.....	66
V.B.1.	Les Crinklers (CRN).....	66
V.B.2.	Les RxLRs.....	66
V.B.3.	Domaine C-terminal des effecteurs cytoplasmiques d'oomycètes.....	67
V.B.4.	Autres effecteurs cytoplasmiques d'oomycètes.....	67
VI.	L'oomycète responsable du mildiou du tournesol, <i>Plasmopara halstedii</i> (voir aussi Chapitre I)....	70
VI.A.	Cycle de développement de <i>P. halstedii</i> (Cf Chapitre I).....	70
VI.A.1.	Infection racinaire (dite infection primaire).....	70
VI.A.2.	Progression dans la plante.....	71
VI.A.3.	Dissémination.....	71
VI.A.4.	Infection foliaire (dite infection secondaire).....	71
VI.A.5.	Systèmes de reproduction.....	71
VI.B.	Résistance génétique du tournesol aux pathotypes de <i>P. halstedii</i>	73

VI.B.1.	Les résistances qualitatives.....	73
VI.B.2.	Classification des isolats de <i>Plasmopara halstedii</i> en pathotypes.	73
VI.B.3.	Les résistances quantitatives.	75
VI.B.4.	Contournement des résistances génétiques et apparition de nouveaux pathotypes.....	75
VI.C.	Les effecteurs de <i>P. halstedii</i>	76
VII.	Objectifs et plan de la thèse	77
Chapitre I: Modes d'infection, de colonisation et de dissémination de <i>Plasmopara halstedii</i> , l'oomycète biotrophe obligatoire responsable du mildiou chez <i>H. annuus</i>		
		79
I.	Contexte.....	79
II.	Article 1: The sunflower downy mildew pathogen <i>Plasmopara halstedii</i>	81
III.	Lecture critique.....	95
IV.	Résultats complémentaires obtenus sur l'interaction en hydroponie entre TS/TSRM et le pathotype 710 de <i>Plasmopara halstedii</i>	100
IV.A.	Quantification de <i>P. halstedii</i> par Q-RT-PCR et localisation de régions clés dans la résistance chez TSRM.	100
IV.A.1.	Matériel et méthodes.	100
IV.A.1.1)	Principes expérimentaux utilisés pour la quantification de <i>P. halstedii</i>	101
IV.A.1.2)	Méthodes de quantification des données de Q-RT-PCR utilisant le calcul des ΔCt	103
IV.A.2.	Résultats de la quantification de <i>P. halstedii</i> dans le tournesol.	103
IV.B.	Quantification de l'expression de gènes de défense chez TS et TSRM en réponse au pathotype 710 de <i>P. halstedii</i>	106
V.	Conclusion.	108
Chapitre II: Étude du polymorphisme inter et intra pathotype des effecteurs de <i>P. halstedii</i> et définition de marqueurs de pathotypes basés sur des effecteurs polymorphes.		
		109
I.	Contexte.....	109
II.	Article 2: Polymorphic effectors of the sunflower downy mildew pathogen <i>Plasmopara halstedii</i> , used as tools for identification of field isolates, suggest a dynamic evolution of pathogen virulence.....	111
III.	Lecture critique:	151
IV.	Conclusion.....	154

Chapitre III: Identification et études fonctionnelles des effecteurs de pathogénicité de <i>P. halstedii</i> , l'agent pathogène responsable du mildiou chez le tournesol <i>H. annuus</i>	155
I. Contexte.....	155
II. Manuscrit: Inventory and functional analysis of RXLR and CRN pathogenicity effectors of <i>Plasmopara halstedii</i> , the obligate biotrophic oomycete responsible for downy mildew in Sunflower, <i>Helianthus annuus</i>	158
III. Lecture critique.....	195
IV. Résultats complémentaires : Expression des effecteurs de <i>P. halstedii</i>	196
Discussion et perspectives générales.	199
I. Biologie de l'interaction entre <i>P. halstedii</i> et <i>H. annuus</i>	199
I.A. Mise en place des mécanismes d'infection par <i>P. halstedii</i>	199
I.B. Distribution des noyaux au sein des hyphes de <i>P. halstedii</i>	200
II. Etude de l'évolution de la virulence de <i>P. halstedii</i>	201
II.A. Hypothèse générale.....	201
II.A.1. Relation hôte-agent pathogène.	201
II.A.2. Rôle de la variabilité génétique des effecteurs de <i>P. halstedii</i> dans la relation hôte-agent pathogène.....	202
III. Annotation des génomes de <i>P. halstedii</i> , et recherche d'effecteurs putatifs.	205
III.A. Séquençage génomique.....	205
III.B. Identification des effecteurs de <i>P. halstedii</i>	207
IV. Génomique comparative et étude du polymorphisme des effecteurs de <i>P. halstedii</i>	208
IV.A. Etude du polymorphisme des gènes d'effecteurs de <i>P. halstedii</i>	208
IV.A.1. Du polymorphisme génétique à la génomique comparative.	210
IV.A.2. Comparaison de la variabilité génomique de <i>P. halstedii</i> entre systèmes agricoles et systèmes naturels.....	212
IV.B. Impact de la plasticité génomique sur la variabilité génétique des effecteurs.....	212
I.A. Création d'un conservatoire de la diversité génétique des populations de <i>P. halstedii</i> en milieu naturel et cultivé.....	215
V. Etude fonctionnelle des effecteurs de <i>P. halstedii</i>	217

V.A. Quels sont les compartiments cellulaires de la plante ciblés par les effecteurs de <i>P. halstedii</i> ?	217
V.B. Avec quelles cibles les effecteurs de <i>P. halstedii</i> interagissent-ils?.....	218
V.C. De quelles manières (activité biochimique) les effecteurs de <i>P. halstedii</i> agissent-ils sur leurs cibles?	219
V.D. Quel est l'impact des effecteurs de <i>P. halstedii</i> sur l'immunité végétale?.....	219
Conclusion générale :.....	223
Références bibliographiques.	225

Table des abréviations

Abréviation	Nom entier	Commentaire
ADNc	ADN complémentaire	n.c.
CBEL	Cellulose Binding Elicitor Lectin	n.c.
CETIOM	Centre Technique Oléagineux Métropolitains Interprofessionnel	http://www.cetiom.fr/le-cetiom/presentation/missions-implantations/
ChxC	Cystéine-Histidine-x-Cystéine	Motif conservé chez les effecteurs du champignon <i>Albugo laibachii</i>
CRN	Crinkler	Nom d'une famille d'effecteurs d'oomycètes
CWDE	Cell Wall Degrading Enzymes	n.c.
DAMP	Danger-Associated-Molecular-Pattern	Motif moléculaire issu de la dégradation de tissus de l'agent pathogène ou de la plante et qui va induire la transduction d'un signal de danger chez la plante
dEER	Aspartate-Glutamate-Glutamate-Arginine	Motif de translocation conservé chez les effecteurs d'oomycètes
EF-Tu	Elongation Factor Tu	PAMP bactérien reconnu chez les Brassicacées par l'hétérodimère de récepteurs EFR/BAK1
EGF	Epidermal Growth Factor	Hormone protéique aux multiples actions. Provoque une activité mitotique rapide au niveau des tissus ciblés.
ETI	Effector Triggered Immunity	Ensemble des mécanismes immunitaires induits chez une plante à la suite de la perception d'un effecteur cytoplasmique.
ETS	Effector-Triggered-Susceptibility	n.c.
FAOSTAT	The Statistics Division of the Food and Agricultural Organization of united nations	http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/QC/E
flg22	Flagelline 22	PAMP bactérien
FLS2	Flagelline Sensitive 2	Récepteur de PAMP bactérien
FRET-FLIM	Fluorescence Resonance Energy Transfer-Fluorescence-Lifetime Imaging Microscopy	Technique de microscopie permettant de mesurer le transfert d'énergie entre deux protéines qui interagissent.
Gène AVR	Gène d'Avirulence	Gène d'un agent pathogène qui entraîne une perte de virulence chez ce micro-organisme.
Gène R	Gène de Résistance	Gène induisant des mécanismes de résistance permettant à une plante de résister contre un agent pathogène
GEVES	Groupe d'Étude et de contrôle des Variétés Et des Semences	n.c.
GO	Gene Ontology	Cette classification regroupe les gènes à partir de l'annotation utilisant un vocabulaire commun pour décrire ainsi les composants cellulaires auxquels ils s'appliquent, les fonctions moléculaires réalisées, et les processus biologiques associés à leurs produits.
HiGS	Host inducing Gene Silencing	Technique de biologie moléculaire qui permet d'induire le "silencing" d'un gène cible de l'agent pathogène en transformant l'hôte (transformation stable).

HR	Réaction Hypersensible	Réaction de défense de la plante qui se traduit par une mort cellulaire programmée restreinte aux zones de contact avec l'agent pathogène, stoppant ainsi son développement.
HVLVVP	Histidine-Valine-Leucine-Histidine(x3)-Proline	Motif conservé chez les effecteurs CRN de <i>P. halstedii</i> et <i>P. infestans</i> .
IFT	Indice de Fréquence de Traitement	Indice prenant en compte le nombre de traitements et la dose homologuée pour chaque traitement dans un système de culture donné. Cet indice permet de comparer l'utilisation des traitements phytosanitaires dans différents systèmes de culture en fonction de leurs dépendances aux traitements. Ne prend en compte ni la toxicité des produits ni les traitements des semences.
INF1	Infestine 1	PAMP de <i>P. infestans</i>
INRA	Institut National de Recherche Agronomique	n.c.
KASP	Kompetitive Allele Specific PCR	Méthode de génotypage basée sur la compétition entre amorces spécifiques de différents allèles au cours d'une PCR quantitative.
LG	Groupe de Liaison	Ensemble des locus (marqueurs) qui apparaissent liés par analyse de leur transmission héréditaire. Sur une carte génétique on les apparente alors à un chromosome.
LRR	Leucine Riche Repeat	Domaine protéique de 20 à 30 acides aminés riche en leucine qui intervient dans les interactions protéines-protéines
LxLFLAK	Leucine-x-Leucine-Phenylalanine-Leucine-Alanine-Lysine	Motif de translocation conservé chez les effecteurs d'oomycètes. Ce motif a donné son nom à la famille des effecteurs de type CRN.
LysM	Lysine Motif	Domaine protéique d'une quarantaine d'acides aminés retrouvé dans des enzymes intervenant dans la dégradation des parois bactériennes.
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases	n.c.
MEB	Microscope Électronique à Balayage	Technique de microscopie permettant de visualiser le relief à la surface d'un individu.
MET	Microscope Électronique à Transmission.	Technique de microscopie permettant de visualiser avec précision les structures cellulaires sur des coupes ultra fines.
miRNA	micro RNA	n.c.
NBS	Nucleotide Binding Site	Motif protéique impliqué dans la liaison aux molécules nucléotidiques.
NILs	Near Isogenic Lines	Lignées dont le fonds génétique est très proche sauf pour certains loci contrôlant des caractères d'intérêt.
NLP	Necrosis and Ethylen inducing Peptide 1 (Nep1)-like proteins	n.c.
NPR1	Non-Expressor of Pathogenesis-Related Genes 1	Gène de la plante impliqué dans la transduction du signal SA de danger induisant l'expression des gènes de défense PR (Pieterse et Van Loon, 2004)
PAMP	Pathogen-Associated-Molecular-Pattern	Motif protéique dont la reconnaissance par la plante entraîne la mise en place de mécanismes de défenses
Patscan		Algorithme permettant la recherche de motifs conservés au sein de protéines.
PCD	Programme Cell Death	Voir HR
PR	Pathogenesis-Related	Gènes de défense de la plante

PRR	Pattern-Recognition-Receptors	Récepteur extracellulaire qui permet à la plante de percevoir les PAMPs et DAMPs
PSI-TBLASTN	Position Specific Iterated-Basic Local Alignment Search Tool	Recherche d'homologie entre des séquences protéiques et des séquences nucléiques transcrites dans les 3 phases de lecture.
PTI	PAMPs-Triggered-Immunity	Ensemble des mécanismes immunitaires induits chez une plante à la suite de la perception d'un PAMP
PVY	<i>Potato Virus Y</i>	n.c.
QRM1	Quantitative Resistance to Mildew	n.c.
Q-RT-PCR	Quantitative-Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction	Technique de biologie moléculaire qui permet de mesurer le niveau d'expression d'un gène
RIL	Recombinant Inbred Lines	Les lignées recombinantes sont des lignées issues du croisement entre deux parents homozygotes lui-même rendu homozygote par une série d'autofécondations. Ces plantes présentent un patchwork de régions génomiques homozygotes provenant de l'un ou l'autre des parents.
RING finger	Really Interesting New Gene finger	n.c.
RLK	Receptor-Like Kinase	Famille de PRR qui présente un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine kinase intracellulaire.
RLP	Receptor-Like Protein	Famille de PRR qui présente un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire, mais pas de domaine kinase intracellulaire.
RxLR	Arginine-x-Leucine-Arginine	Motif de translocation conservé chez les effecteurs d'oomycètes. Ce motif a donné le nom à la famille des effecteurs de type RxLR.
SA	Salicilique Acid	Hormone végétale qui intervient dans la régulation des défenses de la plante.
SAR	Systemic Acquired Resistance	Mécanismes de défense mis en place dans l'ensemble de la plante suite à un événement d'infection localisé (Qing Fu et Dong, 2013).
SCD1		n.c.
siRNA	<i>small interfering RNA</i>	Petite molécule d'ARN de 21 à 24 nucléotides intervenant dans la régulation génique en ciblant des ARNm qui seront clivés par un complexe protéique (RISC).
SNP	Single Nucleotide Polymorphism	n.c.
TAL	Transcription Activator-Like	Effecteur capable d'activer la transcription de gènes de l'hôte.
TAP-TAG	Tandem Affinity Purification-Tag	Technique de biologie moléculaire qui permet d'identifier les interactants d'une protéine.
TS	Totalement Sensible	Nom d'une variété de tournesol sensible à tous les pathotypes de <i>P. halstedii</i>
TSRM	TS Résistant Mildiou	Nom d'une variété de tournesol issue de l'introgession des allèles de résistance <i>PI5</i> et <i>QRM1-R</i> dans le fond génétique sensible du génotype TS.
UE	Union Européenne	n.c.
ΔCt	delta Ct= $\Delta Ct_{target} - \Delta Ct_{ref}$ gene	Mesure du niveau d'expression d'un gène cible après normalisation par rapport au niveau d'expression d'un gène de référence.



Figure 1 : Histoire de l'évolution et de la domestication du tournesol

Introduction générale.

I. Préambule.

Les plantes ont de tout temps été utilisées par l'Homme dans des domaines aussi divers que l'alimentation, la médecine ou la fabrication de vêtements et d'objets. Cependant, c'est l'avènement de l'agriculture à travers la domestication de quelques espèces végétales, il y a près de 13 000 ans, qui est à l'origine de la civilisation humaine telle qu'on la connaît aujourd'hui (Diamond, 2002). Cette domestication s'est faite simultanément, à partir d'un petit nombre d'espèces végétales sauvages, dans 24 régions réparties sur l'ensemble de la planète présentant des conditions climatiques et écologiques favorables (Purugganan and Fuller, 2009). Depuis cette période, l'Homme n'a cessé de sélectionner, avec des méthodes de moins en moins empiriques, de nouveaux idéotypes végétaux plus productifs, plus faciles à récolter, répondant mieux à ses attentes en terme de qualité nutritionnelle, et surtout plus résistants aux stress biotiques et abiotiques.

II. Le tournesol, une culture stratégique.

II.A. Historique de la domestication du tournesol (Figure 1).

Le tournesol aurait été domestiqué dans le Sud-est des États-Unis, il y a environ 6 300 ans, par les Indiens qui l'utilisaient alors dans l'alimentation, pour ses vertus médicinales ou pour teindre les textiles (Diamond, 2002; Purugganan and Fuller, 2009). En 1510, les Espagnols ramenèrent le tournesol en Europe où il fut principalement utilisé comme plante ornementale. Puis, en 1700, le tournesol fut introduit en Hollande et en Russie.

Cependant ce n'est que très récemment, à partir du 19^{ième} siècle, que les Russes ont cultivé le tournesol à grande échelle pour son huile. Durant la même période, des graines ont été envoyées de Russie vers le Canada (1830). Depuis, la découverte en France de systèmes de stérilité mâle

CAPITULE DES PLANTES DE TYPE TOURNESOL

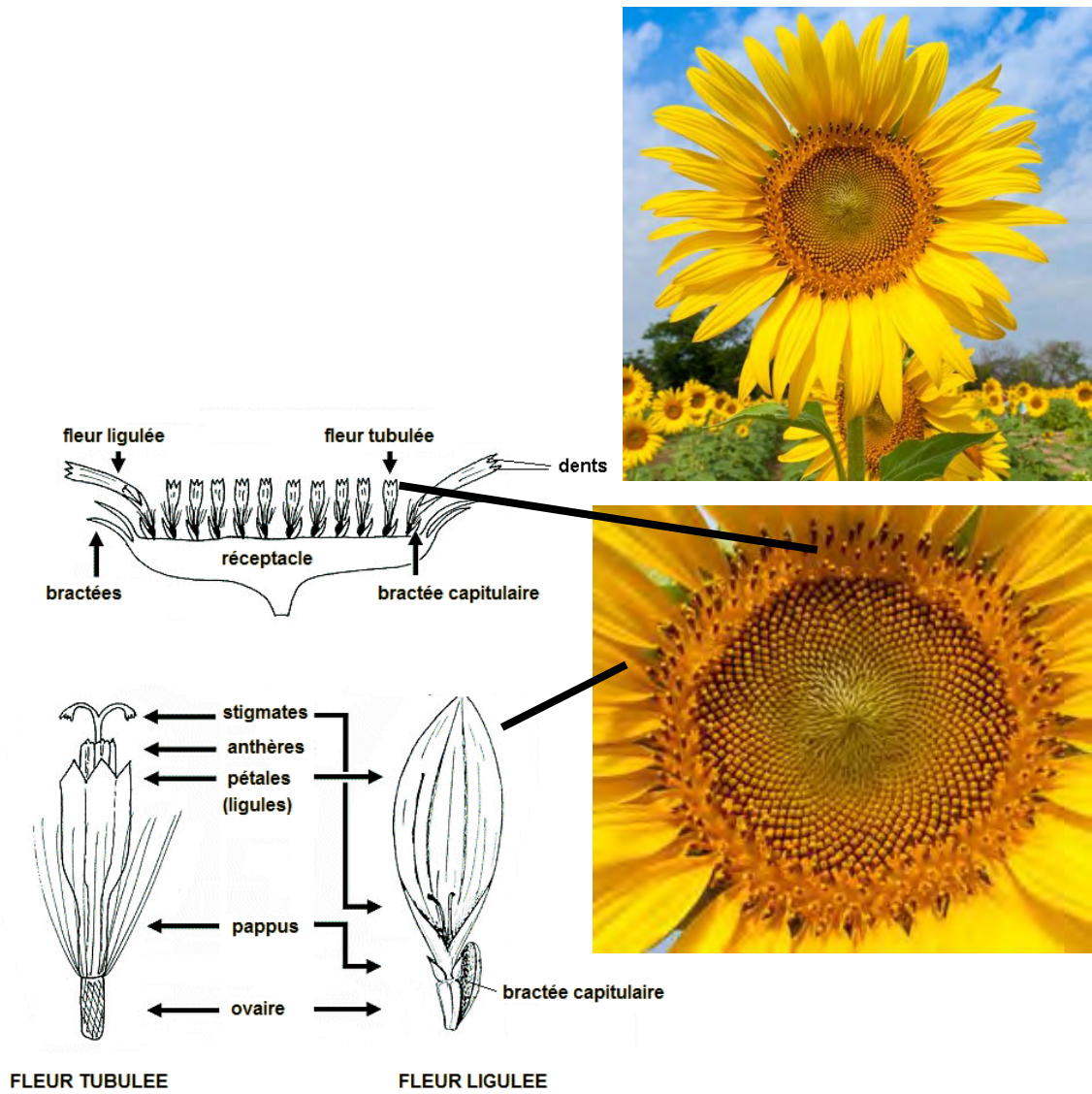


Figure 2 : Schéma interprétatif du capitule des plantes de type tournesol qui peuvent porter de 300 à 1000 fleurs (tubulées ou ligulées).

cytoplasmique à partir de l'espèce *Helianthus petiolaris* (Leclercq, 1969), combinée à celle des gènes de restauration de la fertilité (Kinman, 1970), ont participé à l'augmentation de la popularité de la culture du tournesol hybride en Europe et à travers le monde jusqu'à en faire le deuxième hybride cultivé après le maïs.

II.B. Biologie du tournesol.

Le tournesol appartient à la famille des Astéracées au même titre que d'autres plantes comestibles telles que la laitue, la chicorée, l'artichaut et le salsifis. Cette plante possède une inflorescence de type capitule, comportant de 300 à 1 000 fleurs, caractéristique de cette famille (Figure 2). Au sein du capitule, on retrouve des fleurs stériles à l'extérieur (fleurs ligulées) et fertiles (hermaphrodites) à l'intérieur (fleurs tubulées). Le tournesol est une plante entomophile qui nécessite donc la présence d'insectes pollinisateurs durant sa floraison. Une fois pollinisées, les fleurs fertiles donneront des fruits ou akènes communément appelés « graines » et munis d'un péricarpe membraneux (coque) qui entoure une amande contenant 55 à 70% d'huile (Figure 3).

Cinquante-et-une espèces annuelles ou pérennes sont regroupées sous le genre *Helianthus*. Les tournesols cultivés appartiennent à l'espèce *Helianthus annuus* proche de l'espèce sauvage *Helianthus petiolaris* (Figure 4). Le tournesol cultivé est issu du tournesol sauvage qui est allogame obligatoire. Contrairement aux tournesols cultivés, les tournesols sauvages présentent des ramifications avec plusieurs capitules à leurs extrémités. De plus, les variétés sauvages de tournesol portant des akènes de petites tailles se dispersant à maturité (Burck et al., 2005), l'Homme a sélectionné au cours de la domestication des variétés produisant des graines plus grosses et qui restent fixées sur le capitule à maturité.

On peut distinguer deux types de lignées cultivées : (i) La première et la plus nombreuse a été sélectionnée pour avoir perdu son auto-incompatibilité sporophytique, ce qui permet aussi bien une autofécondation qu'une fécondation croisée (Liu et al., 2006). Cette caractéristique est aussi utilisée pour la création de lignées homozygotes par autofécondation (mise en place d'une « poche » ou sac en papier sur le capitule). Ces lignées sont largement utilisées par les sélectionneurs et dans les activités de recherche. (ii) La deuxième lignée, les tournesols hybrides, est créée en deux étapes : Premièrement le croisement de plantes mâles stériles à cytoplasme stérilisant (pas de production de pollen) avec des plantes mâles fertiles de bonne valeur

agronomique (lignées B) qui permet d'obtenir des lignées A, mâles stériles et isogéniques des lignées B (génome nucléaire). Deuxièmement, les lignées A mâles stériles sont croisées avec des lignées R, restauratrices de fertilité mâle, donnant ainsi des hybrides fertiles et de bonne valeur agronomique (Figure 5).

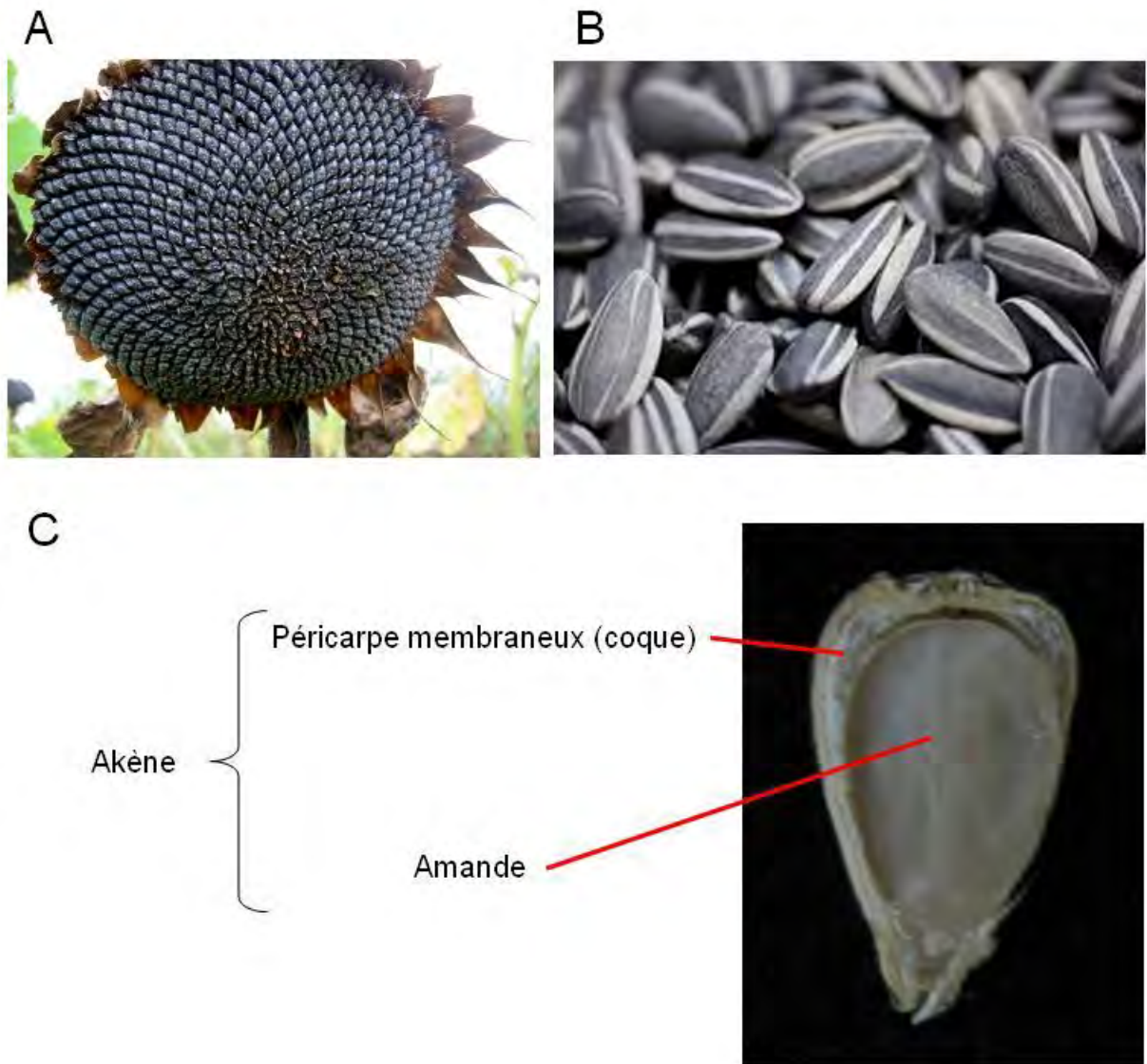


Figure 3: (A) Photo de capitule à maturité. (B) Photo du fruit du tournesol appelé akène (communément appelé « graine ») à maturité. (C) Photo d'une coupe longitudinale d'akène.



Figure 4 : Photos d'un tournesol cultivé Helianthus annuus et de l'espèce sauvage la plus proche Helianthus petiolaris.

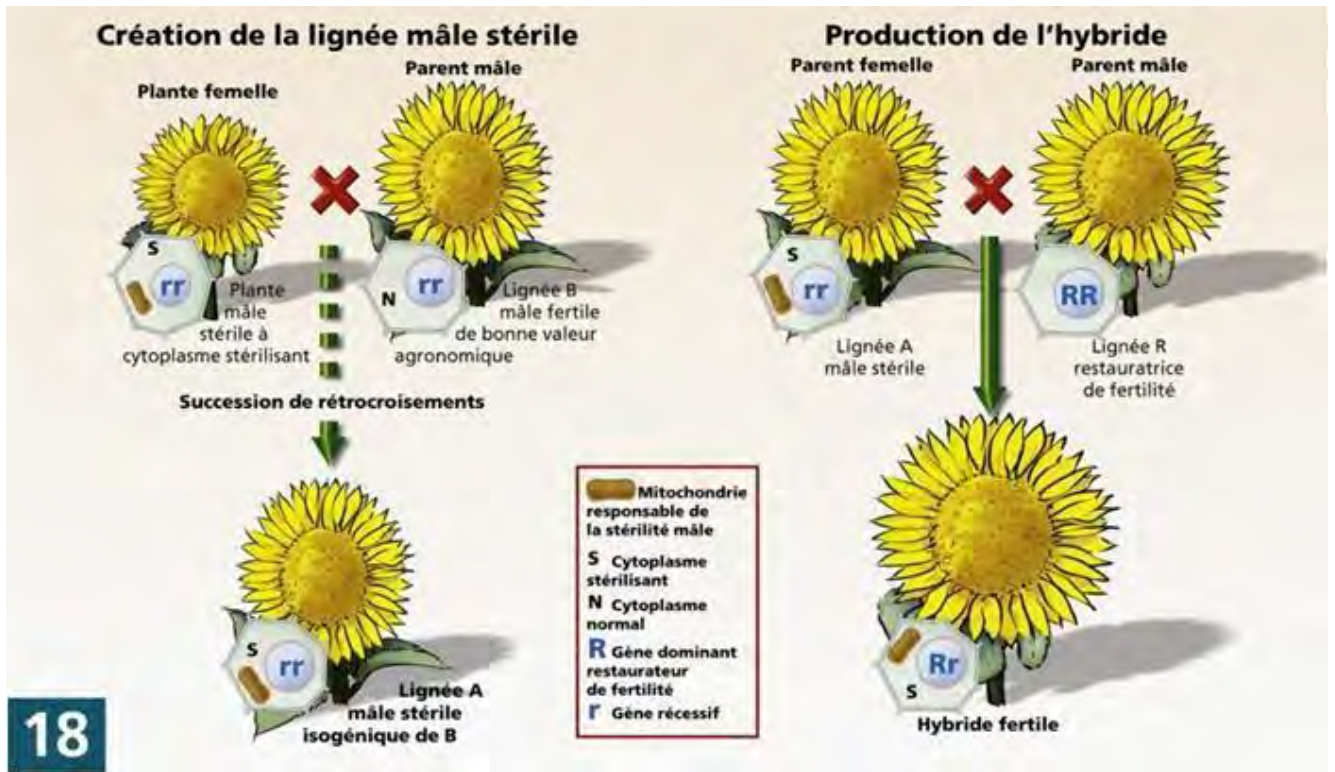


Figure 5 : Stratégie de création d'hybrides fertiles (<http://www.gnis-pedagogie.org/biotechnologie-amelioration-reproduction-male-cytoplasmique.html>).

II.C. Atouts agronomiques et économiques du tournesol.

Le tournesol cultivé (*H. annuus*) est une espèce « stratégique » grâce : (i) à ses atouts agronomiques, et (ii) aux nombreuses applications que l'on peut tirer de ses akènes qui font de cette plante une culture attractive sur le plan économique, notamment dans le contexte de la demande croissante en huile associée au développement des pays émergents (Source : SOFIPROTEOL).

II.C.1. Atouts agronomiques: Une culture résistante aux stress environnementaux.

Le tournesol présente de nombreux avantages en termes de conduite de culture puisqu'il est peu demandeur en eau, en intrants azotés (engrais) et en traitements phytosanitaires par rapport aux autres cultures oléagineuses annuelles que sont le colza et le soja.

Résistance au stress hydrique : Le système racinaire du tournesol est constitué: (i) d'une racine principale pivotante qui s'enfonce profondément dans la terre pour ancrer la plante ; (ii) de racines secondaires partant de cette racine principale et permettant d'exploiter les réserves disponibles dans chaque horizon du sol. Ainsi, les besoins en eau optimum pour le tournesol sont couverts par 420 mm sur l'ensemble de son cycle (pluie et réserve en eau du sol), contre 600 mm pour le colza (Centre Technique Oléagineux Métropolitains interprofessionnel <http://www.cetiom.fr> CETIOM) et 500 mm pour le soja.

Faible demande en intrants azotés : Les besoins du tournesol en azote sont faibles, autour de 4,5 kg d'azote par quintal de graines produites contre 6,5 kg pour le colza. En outre, son enracinement profond en pivot permet au tournesol une exploitation optimale des réserves en azote du sol qui couvre au moins 50 % de ses besoins (reliquat et minéralisation). La fertilisation azotée vise à compléter, si nécessaire, l'apport du sol pour répondre aux besoins de la plante (CETIOM). Par rapport au tournesol, le soja demande très peu d'azote et ne nécessite pas de fertilisation supplémentaire. Cette différence s'explique en partie grâce à la mise en place chez le soja d'une symbiose rhizobienne avec des bactéries fixatrices d'azote atmosphérique.

Résistance aux maladies: Grâce aux résistances génétiques sélectionnées, les applications phytosanitaires requises pour une conduite optimale du tournesol restent modérées, de bonnes pratiques de culture permettant de limiter les traitements herbicides et phytosanitaires (dirigés principalement contre les champignons et oomycètes). Afin d'accompagner les agriculteurs dans leurs traitements phytosanitaires, des bulletins de santé du végétal (BSV) sont mis en place par le CETIOM (<http://www.cetiom.fr/tournesol/cultiver-du-tournesol/ravageurs/pucerons/lutte/>). L'Indice de Fréquence des Traitements (IFT) est un indicateur qui rend compte du nombre de traitements phytosanitaires utilisés au cours d'une culture pondérée en fonction de la dépendance au produit (dose homologuée) (Butault et al., 2010). Cet indicateur permet donc de comparer les systèmes de culture en fonction de leur dépendance aux produits phytosanitaires. Ainsi parmi les plantes de grandes cultures, le tournesol présente un IFT de seulement 2,1 alors qu'il est de 6,1 pour le colza, 16,7 pour la pomme de terre et jusqu'à 36,5 pour la pomme de table (Butault et al., 2010). Néanmoins, cet indicateur ne prend en compte ni le traitement des semences utilisé chez le tournesol, ni la toxicité des produits.

Intégration du tournesol aux pratiques de cultures : La culture du tournesol s'étale d'avril à mai pour les semis et jusqu'en septembre pour la récolte. Ainsi elle s'intègre très bien dans les cycles de rotations en association avec l'ensemble des grandes cultures. En effet, le tournesol permet une rupture des cycles de maladies tout en libérant le sol rapidement, offrant de bonnes conditions pour l'implantation des céréales d'hiver. Par exemple, en comparaison avec une rotation de type blé sur blé, l'insertion du tournesol permet un gain de 15 % du rendement sur la récolte suivante de blé d'hiver (CETIOM).

II.C.2. Atouts économiques : Le tournesol offre de nombreux débouchés.

Les principaux produits (huiles et tourteaux) issus de la culture du tournesol proviennent de ses akènes (Figure 6). **L'huile de tournesol** est principalement utilisée dans l'alimentation humaine pour la qualité de son huile aux profils variés en acide gras (variétés classiques riches en acide linoléique, et variétés plus récentes, riches en acide oléique permettant notamment des utilisations en lipochimie industrielle), en vitamine E aux propriétés anti-oxydantes, et en

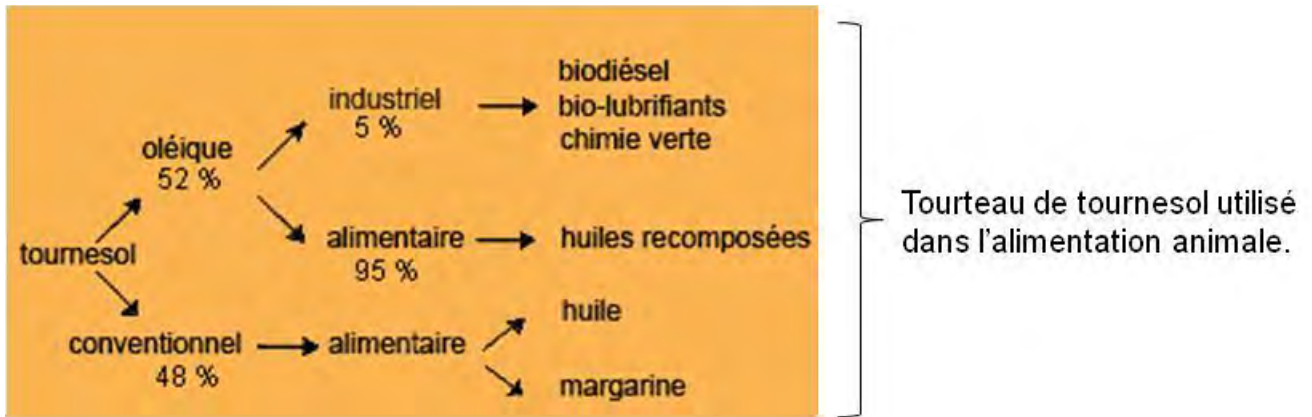


Figure 6 : Organigramme des différents domaines de valorisation du tournesol (CETIOM).

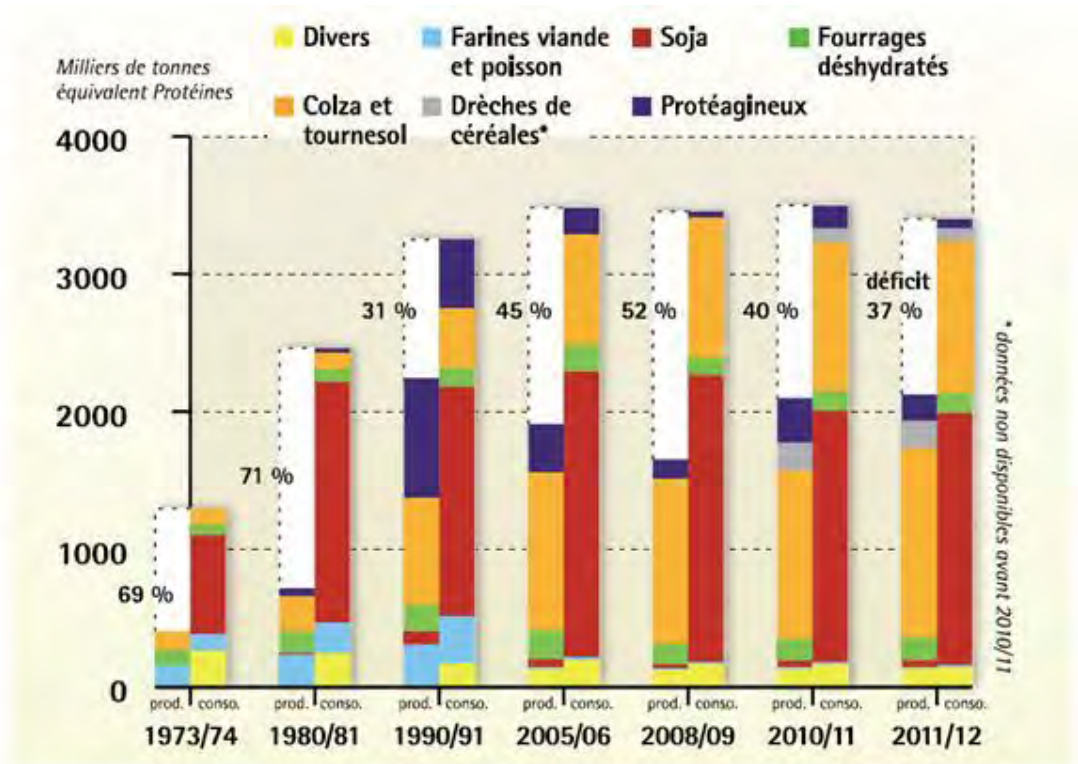
phytostérols dont les effets anti-cholestérol sont reconnus.

Le tourteau de tournesol Produit à partir des résidus des graines après extraction de l'huile), constitue la deuxième utilisation des graines de tournesol pour l'alimentation animale (en particulier pour les ruminants). Celle-ci a été encouragée pour diminuer la dépendance face aux importations de soja américain. Néanmoins, la réduction du déficit français en matières riches en protéines utilisées en alimentation animale, qui est passé de 69 % en 1993 à 40 % en 2010 (Figure 7A), est majoritairement due à l'utilisation des tourteaux de colza (Figure 7B). Cette stagnation de l'utilisation des tourteaux de tournesol est probablement liée aux difficultés de décorticage de son akène. Aujourd'hui, le développement de tourteau de tournesol semi-décortiqué avec une meilleure valeur protéique vient remplacer l'utilisation du tourteau de tournesol (Borredon et al., 2011).

Utilisant moins de 10% de la production annuelle de tournesol, la troisième place en matière de débouchés revient aux secteurs non alimentaires comme **l'oléo chimie** qui permet de valoriser l'huile de tournesol dans des secteurs aussi divers que la cosmétique, la pharmacie, l'industrie automobile, la métallurgie ou encore la production d'encres et de revêtements.

L'acide oléique ou Acide cis-9-octadécamonoénoïque ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$) se retrouve à hauteur de 15 à 25% de l'huile totale dans les variétés classiques de tournesol cultivé. C'est l'acide gras mono-insaturé (une seule double liaison dans la chaîne carbonée) le plus abondant dans notre organisme. De plus, l'acide oléique présente la particularité d'être moins sensible à l'oxydation et peut être porté à haute température ce qui fait de cette molécule un composant de choix pour l'alimentation (friture) et l'industrie. En ce sens, le développement récent de variétés oléiques contenant de 60% (variétés « mid oleic ») à 85% (variétés « high oleic ») d'acide oléique, offre de nouveaux débouchés alimentaires et industriels. En France, depuis plusieurs années déjà, la culture des variétés de tournesol oléique représente environ 50% de la production ce qui en fait une spécificité française. Ces variétés ont été obtenues il y a une dizaine d'années par mutagenèse chimique sur la variété VNIIMK8931. D'un point de vue génétique, on sait maintenant que le fort taux d'acide oléique dans les variétés « Mid oleic » et « High oleic » est principalement dû à une mutation dans une $\Delta 12$ désaturase, associée à d'autres loci qui ne sont pas encore identifiés (Lacombe et al., 2001).

A



B

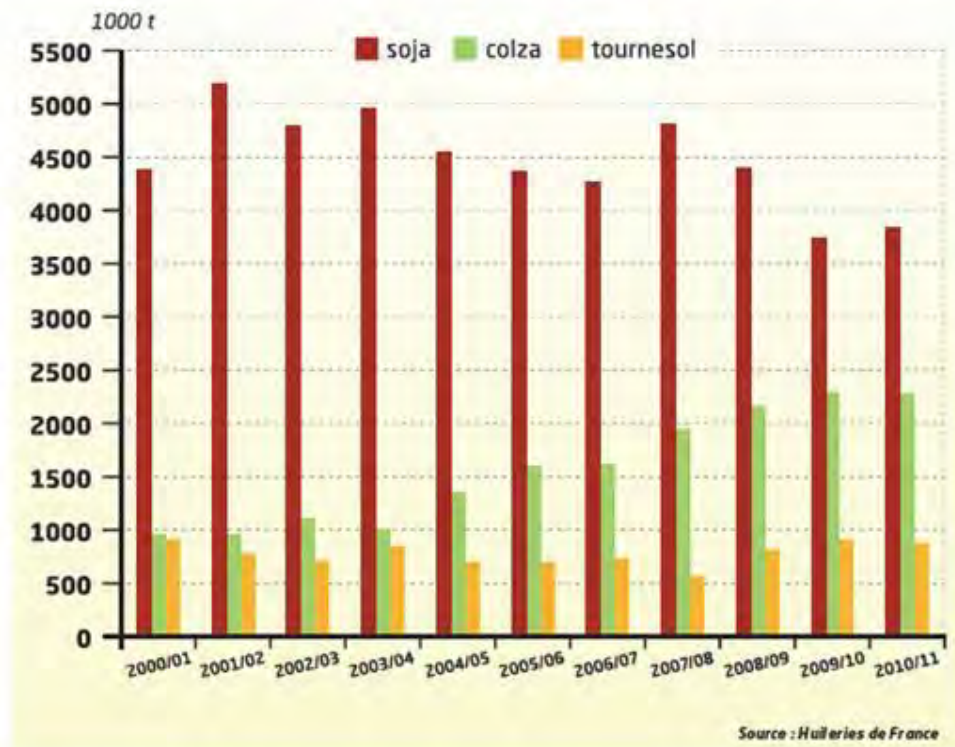


Figure 7 : Évolution du bilan français des matières riches en protéines utilisées en alimentation animale. Cet histogramme représente pour chaque saison de 1973/74 à 2011/12 la production (barre de gauche) et la consommation (barre de droite) française en tonne équivalent protéine. La proportion de chaque aliment est représentée par une couleur différente dans l'histogramme. Le déficit entre production et consommation est indiqué en pourcentage. (B) Évolution des utilisations de tourteaux en France.

II.D. Production, enjeux et problématiques actuelles.

Entre 1980 et aujourd'hui, une forte augmentation des surfaces cultivées de tournesol a été observée en UE, en Russie et en Ukraine. De façon surprenante, cette augmentation des surfaces cultivées ne se traduit pas par une croissance proportionnelle de la production en graines (Figure 8A). En effet, du fait de la facilité de sa culture et de sa résistance aux stress de l'environnement, il est possible de cultiver le tournesol sur des terres pauvres et non irriguées sur lesquelles la culture d'autres plantes serait difficile. Dans ces conditions, les rendements observés sont loin de ceux affichés dans des conditions optimales (estimé entre 35 à 40 quintaux/ha (q/ha)), d'où les efforts mis en place au sein des projets de recherches pour minimiser cet écart. Les rendements sont cependant passés de 13,8 q/ha dans les années 1950 à près de 23,9 q/ha aujourd'hui (+ 57%), et la production globale a augmenté de 40% en 20 ans pour atteindre aujourd'hui 37 millions de tonnes pour 25 millions d'hectares en 2012 (FAOSTAT), ce qui en fait la quatrième oléagineuse cultivée dans le monde après le palmier à huile, le soja et le colza. Les principaux producteurs sont, pour moitié la Russie et l'Ukraine suivis de l'Argentine et des pays de la zone UE (Roumanie, Bulgarie, Espagne et France). De plus, avec la croissance de la Chine et de l'Inde, une augmentation de la demande en huiles végétales est attendue à l'horizon 2020.

La qualité nutritionnelle de l'huile de tournesol associée à la durabilité de sa production en fait une culture vouée à accroître sa place au sein du marché mondial. De ce fait, le tournesol constitue un enjeu majeur pour la France qui est le deuxième exportateur mondial de semences. En France, la culture du tournesol est principalement localisée dans le sud ouest et dans la région Poitou Charente (Figure 8B).

Comme l'ensemble des plantes de grandes cultures domestiquées par l'Homme, le tournesol a été la cible d'une sélection dirigée afin d'augmenter son rendement, sa teneur en huile (Pustovoit, 1964), ainsi que sa résistance aux stress abiotiques comme la sécheresse (Hall et al., 1990) et aux microorganismes phytopathogènes tels que *Plasmopara halstedii* (Morozov et al., 1947 ; Vranceanu et al., 1974). Au cours de cette domestication, le polymorphisme génétique du tournesol cultivé *Helianthus annuus* a été réduit de 40 à 50% en comparaison aux formes sauvages

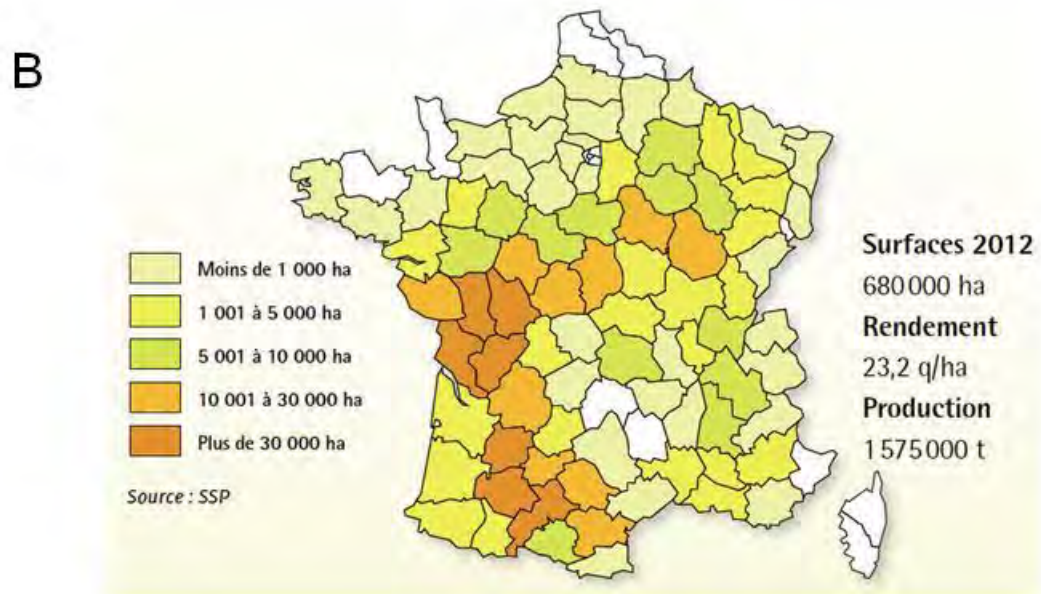
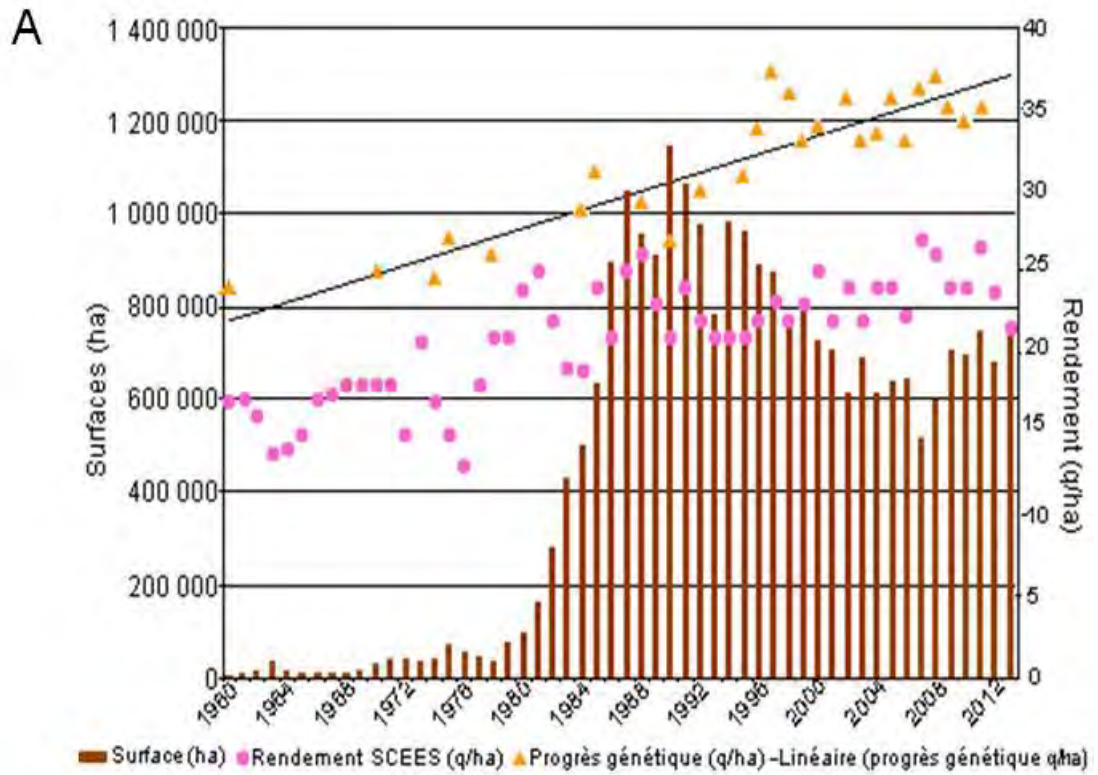


Figure 8 : (A) Graphique mettant en parallèle l'évolution dans le temps (abscisse) des surfaces de tournesol cultivées (histogramme) avec le rendement effectif (points roses) et le rendement théorique (triangles orange). (B) Surfaces de tournesols oléiques cultivées en France en hectares durant l'année 2012-2013

(Micic et al., 2005). Cette réduction de variabilité est observée chez de nombreuses espèces domestiquées (Glémin and Bataillon, 2009; Stukenbrock and Bataillon, 2012)). Les tournesols sauvages et cultivés appartiennent à la même espèce, ce qui permet de nombreuses introgressions d'allèles sauvages dans les formes cultivées apportant des caractères bénéfiques tels que la résistance au mildiou (Vear et al., 2008).

III. Principales maladies du tournesol, leur impact et les moyens de lutte.

Un des principaux freins à la culture du tournesol provient des maladies qui peuvent impacter son rendement. En effet, aujourd'hui on ne compte pas moins d'une douzaine de champignons ou oomycètes phytopathogènes présentant une menace potentielle pour la culture du tournesol en France. Quatre grandes maladies cryptogamiques, dont trois sont causées par des champignons (des genres *Phoma*, *Phomopsis*, et *Sclerotinia*), une par un oomycète (*Plasmopara halstedii* responsable du mildiou), ont été identifiées comme représentant les risques les plus élevés de perte de rendement moyen en France (Mestries et al., 2011 ; Aubertot et al., 2005). Une maladie également importante du tournesol et en recrudescence ces dernières années est causée par la plante parasite *Orobranche cumana*.

III.A. Les maladies du tournesol.

III.A.1. *Sclerotinia sclerotiorum*.

Les symptômes de la maladie causée par le champignon nécrotrophe *Sclerotinia sclerotiorum* sont principalement une pourriture humide et blanche des organes attaqués et le développement de petits nodules noirs appelés sclérotés (Figure 9A et 9D) pouvant aller de quelques millimètres à plusieurs centimètres de diamètre (Masirevic and Gulya, 1992 ; Davar et al., 2012). Les sclérotés, formes de conservation de l'inoculum, ont une durée de vie entre sept et dix ans dans les résidus et le sol (Figure 9C). Les formes d'attaques les plus nuisibles se font au niveau du collet (Figure 9A)

et du capitule et peuvent entraîner des pertes de rendements de plus de 50 % (Figure 9D). Ce champignon est aussi agent pathogène d'autres grandes cultures telles que le colza et le soja. Les moyens de lutte contre cette maladie résident essentiellement dans la conduite de culture (Mestries et al., 2011). Cependant, les agriculteurs disposent de variétés de tournesols tolérants issus de la sélection génétique. On peut noter que, s'il n'existe aucun traitement chimique pour faire face à cette maladie, on connaît des moyens de luttés dits « biologiques » utilisant un champignon pathogène de *Sclerotinia sclerotiorum* même si leur efficacité est faible.

III.A.2. *Phomopsis helianthi*.

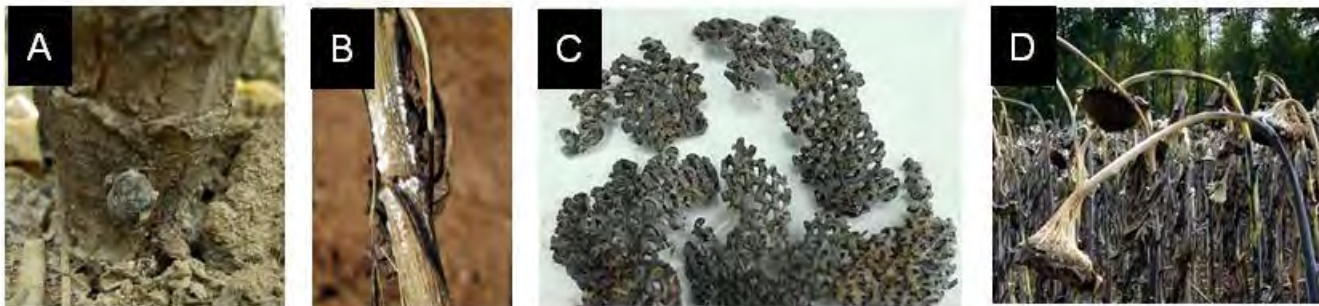
Le champignon nécrotrophe *Phomopsis helianthi* (Masirevic and Gulya, 1992) provoque l'apparition de tâches brunes/rouge-marron sur la tige du tournesol suite à l'infection des feuilles (forme d'attaque la plus nuisible) (Figure 9E) et des nécroses sur les feuilles et le capitule (Figure 9F). Les pertes induites par cette maladie sont évaluées entre 1 et 3 q/ha lorsque 10% des plantes présentent une tâche encerclante au niveau de la tige. L'inoculum est conservé sous forme de périthèces de courte durée de vie (un an) et qui se propage à partir des résidus de culture. *P. helianthi* peut aussi attaquer des plantes du genre *Xanthium*. Pour lutter contre cette maladie, des moyens de lutte chimique (préventivement) et génétique existent et sont efficaces.

III.A.3. *Phoma macdonaldii*.

Les symptômes de la maladie causée par le champignon nécrotrophe *Phoma macdonaldii* Boerema (teleomorph: *Leptosphaeria lindquistii*) sont l'apparition de tâches noires, jointives ou non (Figure 9G et Figure 9H), au niveau de la tige ou du collet. L'attaque la plus nuisible se situe au niveau du collet (Figure 9H) puisqu'elle peut entraîner le dessèchement précoce de la plante avec potentiellement des pertes de rendement allant de 30 à 50 % (Figure 9I). L'inoculum se conserve principalement dans les résidus de culture sous forme de mycélium d'une durée de vie d'au moins trois ans, permettant ainsi sa propagation lors de la culture suivante. Contre cette maladie, la lutte chimique est peu efficace et les sources de résistances génétiques identifiées n'ont pas encore été réellement mises en œuvre pour l'agriculture. Cependant, une conduite de culture adaptée permet de réduire l'apparition et l'impact de la maladie sur le tournesol (Seassau et al., 2012,

2010) ; Voir partie II-II-3. de l'introduction générale).

Sclerotinia (*Sclerotinia sclerotiorum*)



Phomopsis (*Phomopsis helianthi*)



Phoma (*Phoma macdonaldii*)



Figure 9 : Illustration des différents symptômes occasionnés par les agents pathogènes du tournesol. Le champignon nécrotrophe *Sclerotinia sclerotiorum* induit l'apparition de tâches encerclantes au collet (A), de la pourriture blanchâtre sur la tige (B) et l'apparition de sclérotés (A, C). L'ensemble de ces symptômes peut entraîner la pourriture du capitule (D); Le champignon nécrotrophe *Phomopsis helianthi* induit l'apparition de tâches encerclantes sur la tige (E) et des nécroses sur le capitule (F); Le champignon nécrotrophe *Phoma macdonaldii* induit l'apparition de tâches encerclantes sur la tige (G) ou le collet (H) pouvant entraîner un dessèchement précoce de la plante entière (I).

Mildiou (*Plasmopara halstedii*)



Nanisme de la plante



Capitule infertile

Décoloration des
feuilles



Sporulation



Figure 10 : Principaux symptômes induits par *Plasmopara halstedii* chez le tournesol.

III.A.4. *Plasmopara halstedii*.

Contrairement aux autres maladies décrites précédemment, le mildiou n'est pas causé par un champignon nécrotrophe mais par l'oomycète biotrophe obligatoire *Plasmopara halstedii*. La forme d'attaque la plus nuisible est l'infection précoce au niveau des racines pouvant entraîner un nanisme des plantes, une décoloration des feuilles, la production de capitules stériles, et la production de structure de dissémination (sporulation) (Figure 10). Cet agent pathogène qui fait l'objet de mon travail de thèse est décrit plus en détail dans la partie VI de l'introduction générale.

III.A.5. *Orobanche cumana*.

Le tournesol n'est pas seulement attaqué par des microorganismes filamenteux. En effet, depuis plus de 50 ans, l'orobanche (*Orobanche cumana*) (Figure 11A), une plante holoparasite (parasite obligatoire) provoque d'importants dégâts dans les principaux pays producteurs du bassin méditerranéen et autour de la Mer Noire (Parker, 2009). L'orobanche se connecte aux tissus vasculaires du tournesol par ses racines pour se nourrir de la sève présente dans le xylème et le phloème. Cette situation entraîne une compétition pour les ressources en eau et nutriments entre la plante hôte et la plante parasite. Le seul symptôme visible est un retard de croissance des plantes parasitées qui a un impact sur le rendement du tournesol (Figure 11B). Les moyens de lutte sont principalement génétiques, avec l'utilisation de variétés de tournesols résistantes à l'orobanche ou aux herbicides. Cependant des moyens de lutte « biologique » existent tels que l'utilisation de champignons symbiotiques (Louarn et al., 2012) ou pathogènes de l'orobanche (Thomas et al., 1998), sans que ces moyens ne soient utilisés couramment en agriculture.

III.A.6. *Autres agents pathogènes du tournesol*.

Il existe d'autres agents pathogènes principalement fongiques capables d'attaquer le tournesol mais leur impact est moins important que celui des organismes cités précédemment. On peut noter par exemple les maladies du Verticillium (*Verticillium dahliae*), de l'Albugo (*Pustula helianthicola*) dont les symptômes ressemblent à ceux du mildiou, du botrytis (*Botrytis cinerea*) ou de l'Alternariose (*Alternaria helianthi*) (CETIOM).

Orobanche (*Orobanche cumana*)

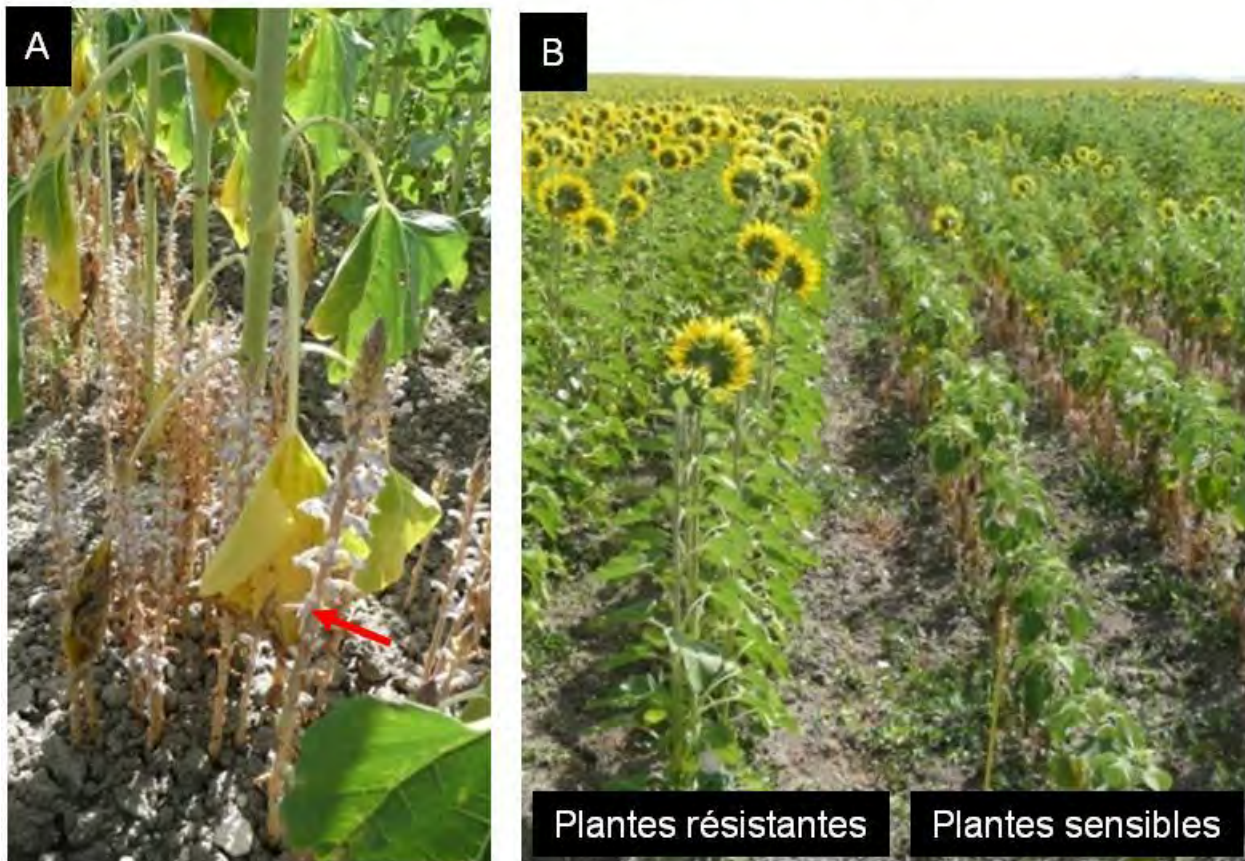


Figure 11 : La plante holoparasite *Orobanche cumana* (A) (flèche rouge) peut entraîner un retard de croissance chez les génotypes de tournesol sensibles en comparaison avec les génotypes résistants (B).

III.B. Moyens de lutte.

III.B.1. Lutte chimique.

La lutte chimique, menée grâce à l'utilisation de produits phytosanitaires, est utilisée soit en traitement de semences (mildiou) soit en traitement par épandage sur la culture (Phomopsis et Phoma). Bien que leur nombre ait été considérablement réduit ces dernières années à cause de leur toxicité et suite au réexamen des matières actives par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL), certains s'avèrent de moins en moins efficaces du fait de l'apparition de résistances chez les organismes phytopathogènes. C'est par exemple le cas de *Plasmopara halstedii* pour lequel de nombreux pathotypes ont développé des résistances au méfénoxam, seul traitement fongicide autorisé en France à ce jour.

III.B.2. Résistance variétale.

La résistance variétale du tournesol (« lutte génétique ») est aujourd'hui largement utilisée pour lutter contre l'ensemble de ces maladies cryptogamiques. Néanmoins, dans le cas du mildiou, ces moyens de lutte sont susceptibles d'appliquer une forte pression de sélection sur l'agent pathogène qui contourne fréquemment ces résistances. En effet depuis 20 ans, on peut observer en France l'apparition de nouveaux pathotypes (souvent appelés « races ») contournant plusieurs gènes de résistance. Ce contournement ne se retrouve pas chez les autres maladies du tournesol probablement du fait que pour les champignons nécrotrophes (i) il n'y ait pas de résistance totale mise en œuvre, et (ii) aucune interaction de type {génotype de tournesol * souche de l'agent pathogène} n'a été mise en évidence empêchant l'identification de nouveaux pathotypes.

Au cours de cette thèse nous reviendrons largement sur cette problématique en proposant des hypothèses quant aux rôles de protéines appelées effecteurs de pathogénicité dans l'évolution de la virulence de l'agent pathogène *P. halstedii* (chapitre II).

III.B.3. Conduite de culture.

Il existe une troisième méthode de lutte fondée sur les conduites de la culture du tournesol (Mestries et al., 2011). Celle-ci vise dans un premier temps à réduire la quantité d'inoculum dont les formes de conservation ont une durée de survie allant de un à dix ans.

La qualité sanitaire des semences est un facteur important vis-à-vis de tous les micro-organismes capables de se transmettre par ce biais. En effet, ce point qui concerne particulièrement le mildiou permet d'éviter l'arrivée d'un agent pathogène sur une parcelle saine.

Lorsque l'agent pathogène est présent sur la parcelle, l'allongement de **la rotation** (délai de retour d'une même culture sur une même parcelle) peut permettre de réduire significativement la quantité d'inoculum viable dans le sol. Cette durée doit tenir compte, (i) des caractéristiques du sol auxquelles la survie des formes de conservation peut être liée, (ii) de la sensibilité des autres espèces cultivées sur la parcelle aux agents pathogènes présents, et (iii) de la réglementation dans le cas du mildiou.

D'autre part, **la gestion des résidus de cultures** après la récolte a un impact important sur la survie des formes de conservation des micro-organismes qui continuent de s'y développer, produisant des fructifications à l'origine de nouvelles contaminations. Il est alors important de broyer ces résidus de culture pour accélérer leur décomposition et donc de limiter le support trophique disponible pour les micro-organismes phytopathogènes.

En complément, l'**enfouissement** de ces résidus permet de perturber le cycle de développement de certains champignons dont la formation des fructifications est déterminée par la lumière (Phomopsis et Phoma par exemple).

Dans un deuxième temps, la réussite et l'expression d'un événement infectieux dépendent du stade de développement de la culture au moment où il se produit. Il est alors possible de mettre en place une **stratégie d'esquive** qui consiste à rechercher un décalage entre la phase de réceptivité de la culture et les périodes rassemblant les conditions pédo-climatiques favorables à l'infection. Il s'agit par exemple d'éviter que la levée des semis ne se produise durant les périodes de pluies propices à la germination des oospores de mildiou (libération de zoospores).

Dans le cas où l'infection a eu lieu, il est alors possible d'**atténuer l'impact de la maladie** en jouant sur la **densité de population, l'irrigation et la fertilisation azotée** permettant de réduire le nombre

de plantes atteintes et la gravité des symptômes. Par exemple, pour la maladie causée par le *Phomopsis*, l'augmentation de la densité de 5 à 7,5 plantes/m² peut entraîner une augmentation de 22% du taux de plantes atteintes sur tige (Debaeke and Pérès, 2003). Pour des raisons similaires à celles qui régissent la stratégie d'esquive décrite ci dessus, une irrigation raisonnée permet de réduire sensiblement le taux de plantes atteintes. Enfin, la fertilisation azotée a tendance à augmenter aussi bien le taux de plantes atteintes que la gravité des symptômes, en partie en favorisant l'augmentation du couvert végétal. Par exemple, en 2003, Debaeke *et al.* montrent que, sous faible pression d'inoculum, une variation de 60 à 120 unités d'azote entraîne une augmentation moyenne de 36 % de la proportion de tiges atteintes. Certains auteurs proposent d'utiliser une stratégie d'évitement pour limiter l'impact d'un événement d'infection sur le rendement. Dans cette optique, l'utilisation de géotypes de tournesols ramifiés a été proposée. En effet, sachant que la floraison du tournesol est un stade de développement critique pour le rendement, l'hypothèse faite ici est que l'étalement dans le temps des floraisons chez les tournesols ramifiés permettrait de limiter cet impact à un nombre restreint de capitules.

La lutte agronomique peut être définie comme une association de pratiques qui sont à la fois défavorables à l'installation et à l'expression de la maladie (Mestries et al., 2011). Malgré l'importance économique des maladies citées précédemment, les mécanismes d'infection et de propagation de certains bioagresseurs sont très peu étudiés. Dans ce sens, une meilleure connaissance des cycles de développement et des mécanismes infectieux de chaque agent pathogène serait nécessaire pour lutter efficacement contre eux. C'est ce que nous avons souhaité faire pour *Plasmopara halstedii* dans notre étude (Chapitre I).

Peu de loci de résistance aux maladies causées par des champignons ont été caractérisés chez le tournesol. Dans le cas du mildiou pour lequel de nombreux loci de résistance ont été décrits chez le tournesol (cf Chapitre I), le contournement rapide de la plupart des gènes de résistance spécifiques utilisés montre toute l'importance qu'il y a à intégrer, au sein de bonnes pratiques culturales, une utilisation plus intelligente de la lutte génétique pour une plus grande durabilité (Cf partie IV.D. de l'introduction générale). Cela nécessite une meilleure connaissance des déterminants moléculaires responsables des résistances génétiques afin de pouvoir améliorer les schémas d'utilisation de ces résistances chez les lignées cultivées de tournesol.

Malgré leur impact économique sur la culture, peu d'études approfondies portant sur la définition

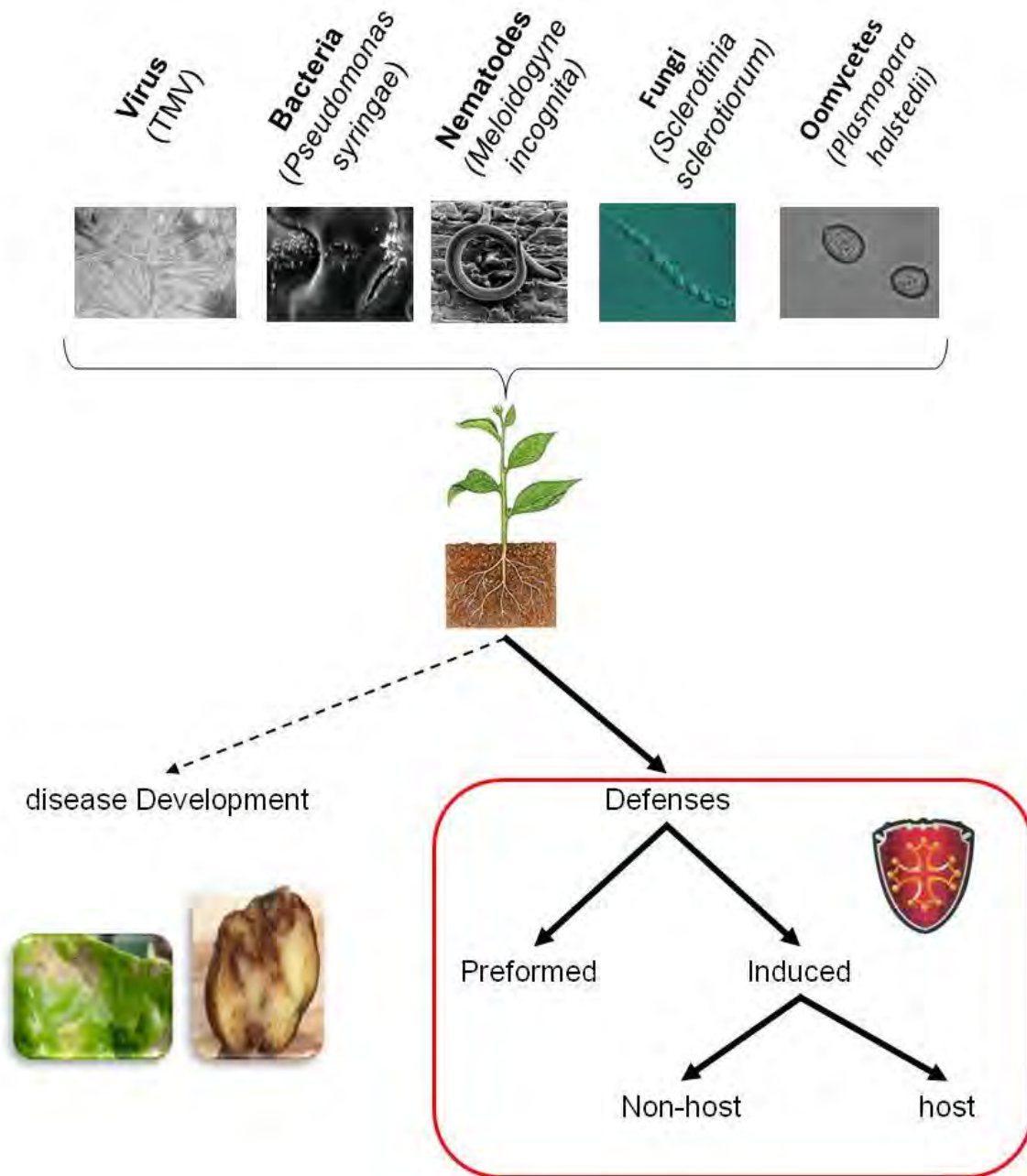


Figure 12 : Organisation des mécanismes de défenses chez les plantes.

de souches de l'agent pathogène et sur les aspects cellulaires et moléculaires ont été réalisées sur les maladies du tournesol. Faisant figure d'exception, le mildiou du tournesol causé par l'oomycète *Plasmopara halstedii* a fait l'objet de la mise en place d'un système déjà ancien de nomenclature internationale de description des pathotypes (Gulya et al., 1998) permettant un suivi épidémiologique en UE depuis plusieurs années, et donnant lieu à différentes publications (voir chapitre I). Les premières études moléculaires et morphologiques ont déjà été publiées sur l'agent pathogène (Bouzidi et al., 2007; As-sadi et al., 2011), ce qui nous permet d'approfondir les aspects cellulaires de cette interaction et de poursuivre l'étude des déterminants moléculaires du pouvoir pathogène de l'oomycète responsable de la maladie.

IV. Interactions plantes-agents pathogènes

IV.A. *Défenses préformées et induites chez les plantes.*

Malgré la permanence et la grande diversité des interactions plantes-agents pathogènes, très peu de phénomènes d'infections vont permettre le développement de la maladie caractérisé par l'apparition des symptômes, et ce grâce à un système de défense mis en place au cours de l'évolution chez les plantes. Les mécanismes impliqués peuvent être classés en deux catégories (Figure 12): (i) **des mécanismes de défense préformés** ou passifs, tels que des barrières physiques (cuticule et paroi cellulaire) ou des composés antimicrobiens qui constituent un rempart naturel à l'encontre d'un large spectre d'agresseurs, et (ii) **des mécanismes de défenses induits**, par la reconnaissance plus ou moins spécifique d'un agent pathogène par la plante. Parmi les réactions de défenses induites, on peut distinguer, d'une part les mécanismes dits « **non-hôtes** » (Figure 13A), qui procurent à toutes les plantes (hôtes) un premier niveau d'immunité vis-à-vis de l'ensemble des isolats d'une espèce d'agents pathogènes, et d'autre part les mécanismes « **hôtes** » (Figure 13B) qui apportent à un hôte particulier une immunité spécifique contre un nombre restreint d'isolats d'une espèce d'agent pathogène. On parle alors d'interaction isolat (ou race)-cultivar. Ce sont souvent les mêmes mécanismes qui sont mis en place chez les plantes lors des défenses induites de types « hôtes » et « non-hôtes » (dépôt de callose, production de molécules

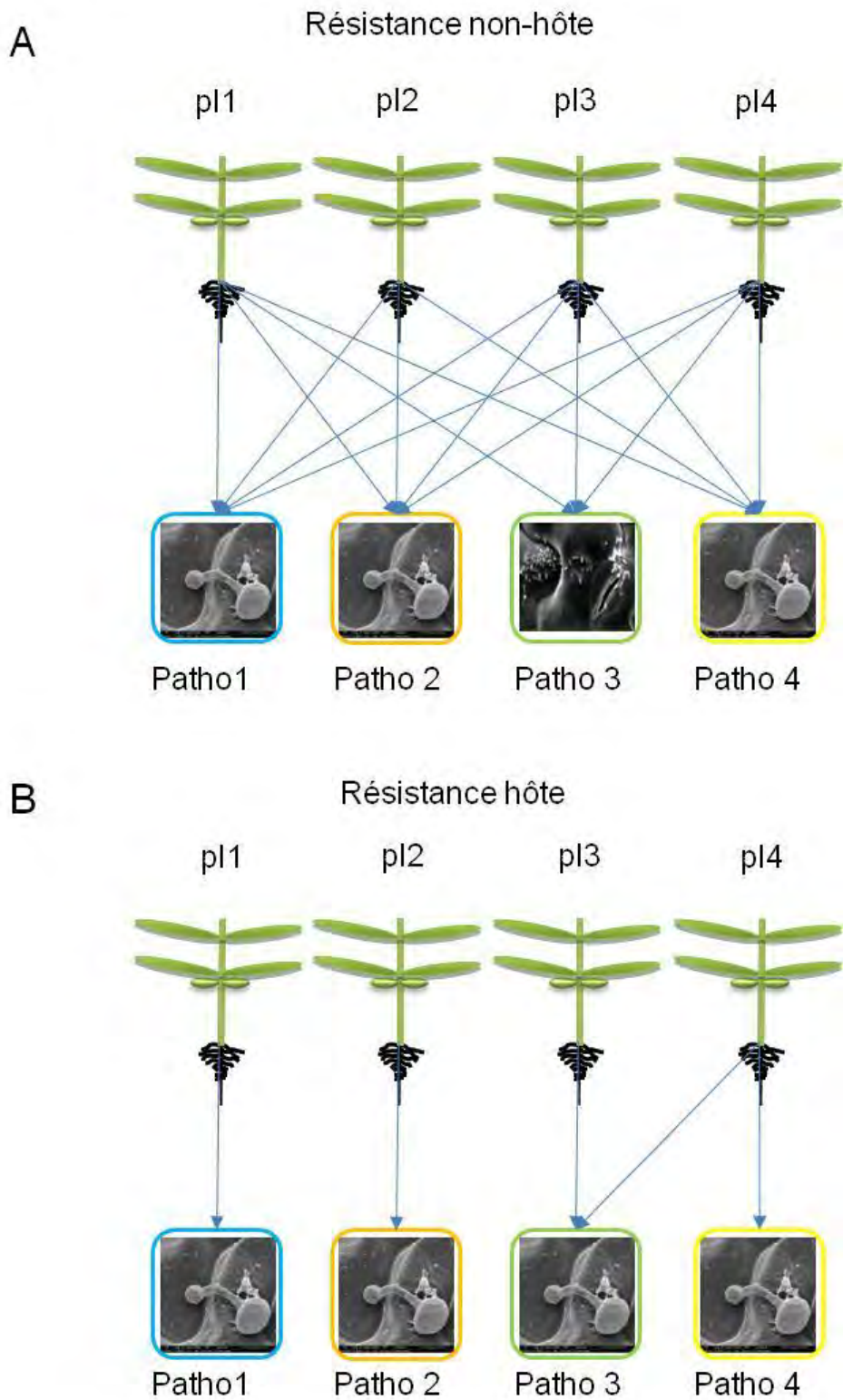


Figure 13 : Résistance hôtes et non-hôtes chez les plantes. (A) Une même résistance hôte permet à plusieurs génotypes d'une espèce de lutter contre l'ensemble des isolats d'une ou plusieurs espèces d'agents pathogènes. (B) Une résistance hôte permet à un génotype d'une espèce de lutter contre un nombre restreint d'isolats d'une espèce d'agent pathogène. (pl) plante; (Patho) pathotype.

antimicrobiennes et mort cellulaire programmée de type réaction hypersensible ou HR). Cependant, dans le cadre des réponses « non-hôtes » (non spécifiques à une interaction isolat-cultivar), ces mécanismes de défense seraient mis en place à un niveau permettant de ralentir le développement de l'agent pathogène. Dans le cadre des réponses « hôtes », les mécanismes interviendraient rapidement, transitoirement et de façon ciblée contre le nombre restreint d'isolats d'une espèce d'agent pathogène à l'origine de leur induction. Chez les microorganismes phytopathogènes, un ensemble d'outils a été sélectionné au cours de l'évolution permettant d'inhiber les mécanismes de défense induits chez les plantes. L'un de ces outils est la sécrétion de protéines appelées « **effecteurs** » de pathogénicité, permettant la mise en place de conditions favorables à l'infection (facteur de virulence). Cependant la reconnaissance de ces effecteurs par la plante peut induire des mécanismes de défense, faisant de ces protéines un facteur d'avirulence qui conduit à l'immunité de la plante.

IV.B. Modèle zig-zag.

Les mécanismes moléculaires qui régissent les interactions plantes-agents pathogènes pourraient s'organiser autour du modèle en zig-zag proposé par Jones et Dangl en 2006 (Figure 14). Ce modèle, qui n'a cessé de se complexifier, reposait initialement sur le concept linéaire et binaire d'interaction gène pour gène (Flor 1971) et se dissociait en seulement trois étapes : (i) Induction des défenses de la plante suite à la reconnaissance de l'agent pathogène, (ii) suppression de ces mécanismes de défense par les effecteurs de l'agent pathogène, (iii) induction de la résistance de la plante entraînée par la reconnaissance des effecteurs de l'agent pathogène. De plus, dans les premiers modèles de zig-zag décrits, les mécanismes de défenses mis en place suite à la reconnaissance d'un microorganisme sont séparés en deux catégories en fonction de la molécule de l'agent pathogène qui les active : (i) La reconnaissance extracellulaire d'un PAMP à la surface de l'agent pathogène entraînerait des mécanismes de défense généraux et de faible intensité (PAMP Triggered Immunity PTI), (ii) la reconnaissance intracellulaire d'un effecteur aboutirait à des mécanismes de défense ciblés et efficaces pour lutter contre l'agent pathogène détecté (Effector Triggered Immunity ETI). Néanmoins, comme tout modèle, celui du zig-zag a pour but de simplifier la réalité pour nous permettre de mieux l'appréhender.

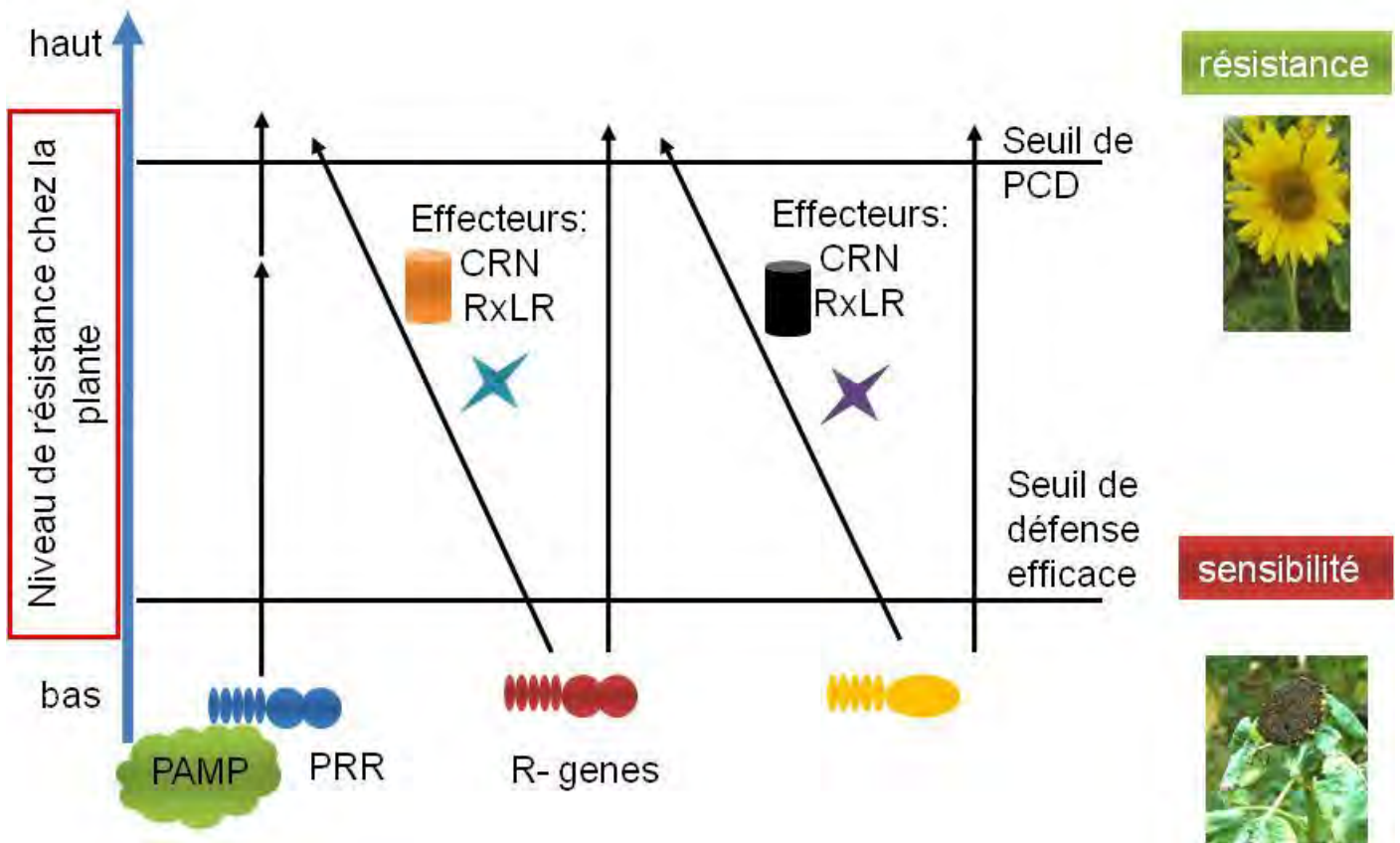


Figure 14 : Modèle du zig-zag d'après Jones & Dangl (2006) et adapté aux oomycètes par Hein et al., en 2009, qui représente le niveau de défense chez la plante au cours des différentes étapes de l'interaction plante-oomycète. Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMP); Pattern Recognition Receptor (PRR); Programmed Cell Death (PCD).

Récemment, plusieurs études portant sur différents pathosystèmes laissent entrevoir un modèle plus complexe que celui proposé à l'origine, ne reposant pas uniquement sur des interactions gènes pour gène (Thomma *et al.*, 2011; Pritchard et Birch, 2014; Moury *et al.*, 2014), et dans lequel les effecteurs tiennent toujours une place centrale. Dans cette partie nous décrivons ces mécanismes moléculaires impliqués dans (i) la perception extracellulaire des agents pathogènes par la plante, (ii) l'inhibition des mécanismes de défense de la plante par les effecteurs de l'agent pathogènes, (iii) l'induction des mécanismes de défense de la plante par la reconnaissance intracellulaire des effecteurs des agents pathogènes (Figure 15). Ces différentes étapes seront illustrées par des exemples tirés des études sur les interactions entre les plantes et les microorganismes de types bactériens, fongiques, et parfois oomycètes. Nous décrivons ensuite les connaissances acquises chez les oomycètes dont fait parti mon sujet d'étude *Plasmopara halstedii*.

IV.B.1. Perception extracellulaire de l'agent pathogène par la plante.

IV.B.1.1) PAMPs, MAMPs et DAMPs.

La résistance des plantes à la plupart des attaques qu'elles subissent dans la nature, viendrait en grande partie du fait qu'elles sont capables de percevoir la présence de l'agent pathogène. En effet, suite au premier contact avec la plante, l'agent pathogène peut être perçu soit à l'extérieur de la cellule végétale par la reconnaissance simultanée de motifs spécifiques présents à la surface du microorganisme, soit sur des effecteurs sécrétés par l'agent pathogène à l'extérieure de la cellule végétale, à proximité de la membrane plasmique (effecteurs apoplastiques). Ces motifs sont appelés « motifs associés à des molécules d'agents pathogènes » (**Pathogen-Associated-Molecular-Patterns ; PAMPs**) ou « motifs associés à des molécules de microorganismes » (**Microbial-Associated-Molecular-Pattern ; MAMPs**).

Chez les oomycètes, de nombreux MAMPs ont été identifiés, tels que GP42 de la famille des transglutaminases chez *Phytophthora sojae* (Hahlbrock *et al.*, 1995; Reiss *et al.*, 2011), les protéines de type CBEL chez *Phytophthora parasitica* (Gaulin, 2002; Dumas *et al.*, 2008) qui joueraient un rôle dans l'adhésion de l'agent pathogène à la plante.

Parmi les protéines portant des MAMPs, certaines sont capables d'induire des réactions

nécrotiques chez la plante hôte. C'est par exemple le cas des élicitines qui forment une famille de protéines de structure proche jouant souvent le rôle de PAMP. En effet, ces protéines initialement décrites chez différents *Phytophthora* induisent des réactions nécrotiques chez le tabac (Ponchet et al., 1999; Huitema et al., 2005). Elles ont été décrites aussi chez l'oomycète nécrotrophe *Pythium* (Ponchet et al., 1999). Il semble que les élicitines jouent un rôle important dans le développement des agents pathogènes, utilisant leur capacité à lier les stérols afin de compenser l'auxotrophie des *Phytophthora* et *Pythium* pour ces molécules, les acheminant de la plante vers l'agent pathogène (Ponchet et al., 1999). Par exemple, la protéine extracellulaire INF1 (infestine 1), produite par l'oomycète *Phytophthora infestans*, fait partie de la classe I des élicitines acides. La reconnaissance de motifs protéiques conservés au sein de cette protéine induit des réactions de défense de type mort cellulaire programmée chez la plupart des Solanacées.

De même, d'autres protéines sont capables d'induire des réactions de défense chez l'hôte, comme les Necrosis and ethylene inducing peptide 1 (Nep1)-like proteins (NLP) décrites chez les oomycètes hémibiotrophes du genre *Phytophthora* (Jiang et al., 2006; Qutob et al., 2006; Dong et al., 2012). Néanmoins, chez l'oomycète biotrophe obligatoire *Hyaloperonospora arabidopsidis*, parmi les 15 protéines NLPs (HaNLP) identifiées par similarité de séquences, certaines n'induisent de réponse nécrotique ni chez le tabac ni chez *A. thaliana* (Cabral et al., 2012). En effet, contrairement aux NLPs produites par des oomycètes hémibiotrophes comme *Phytophthora* durant la phase nécrotique, certaines de ces HaNLP non-toxiques sont induites lors des phases précoces de l'infection et pourraient avoir un rôle dans l'installation de l'interaction biotrophique.

Les plantes peuvent aussi percevoir des molécules issues de la dégradation des composants de la cellule végétale ou du micro-organisme appelées « motifs moléculaires associés à une situation de danger » (**Danger-Associated-Molecular-Patterns ; DAMPs**). Par exemple, les chitinases secrétées par la plante sont capables de dégrader la paroi des champignons en s'attaquant aux liaisons glycosidiques des molécules de chitine. Cette dégradation impacte, non seulement la croissance des agents pathogènes fongiques par la disruption de leur paroi, mais entraîne également la production de PAMPs qui pourraient être perçus par la plante.

Hyphe d'un agent pathogène filamenteux

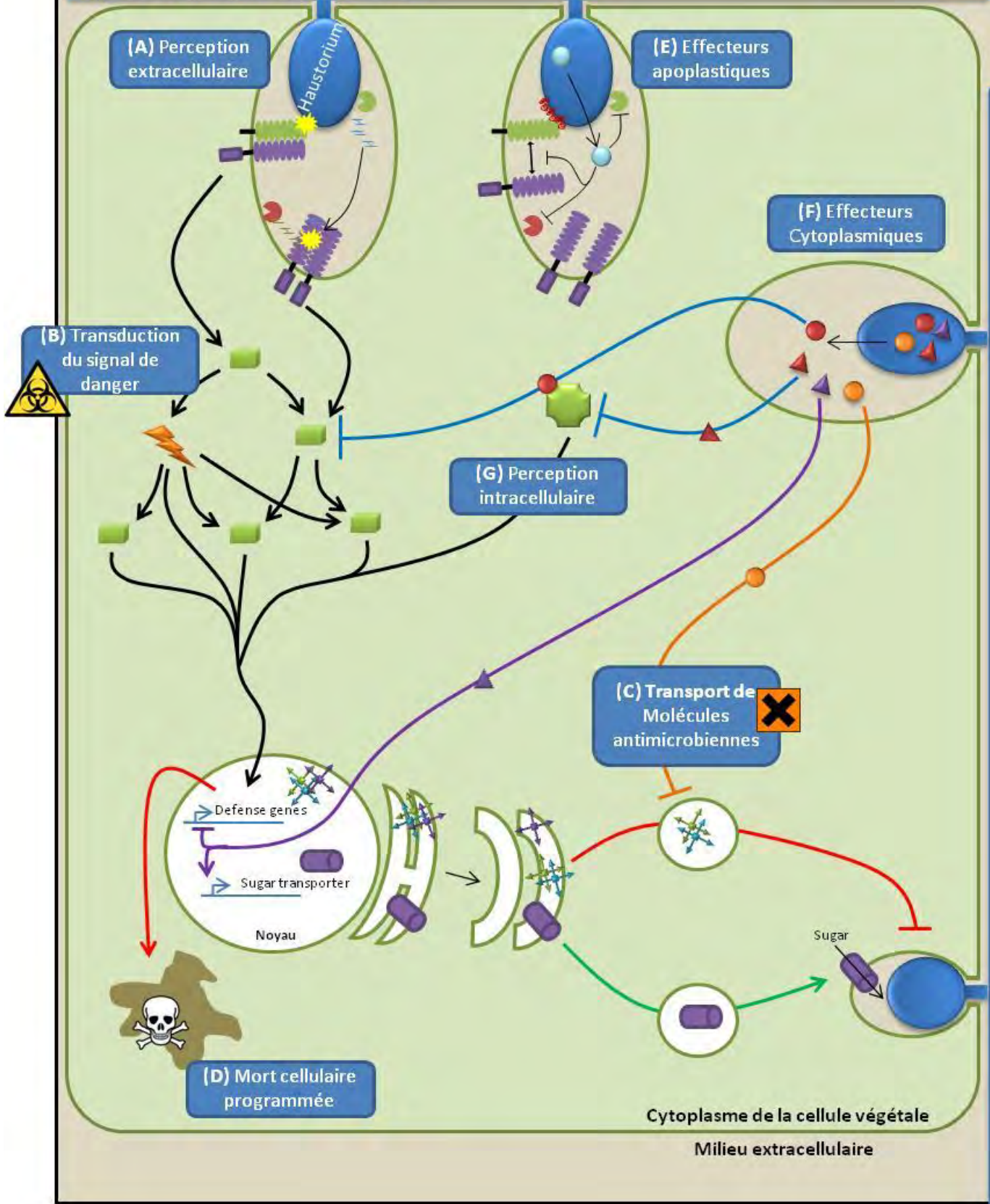


Figure 15: Schéma général des interactions entre plantes et agents pathogènes de type champignon ou oomycète.

(A) Dans un premier temps, les plantes sont capables de percevoir la présence de l'agent pathogène dans le milieu extracellulaire grâce à des récepteurs membranaires de type PRR. Les molécules perçues par les PRR peuvent être: (i) des PAMPs ou MAMPs présents à la surface de l'agent pathogène, ou (ii) des DAMPs issues soit de la dégradation de la paroi végétale par des enzymes de l'agent pathogène, soit de la dégradation de la paroi de l'agent pathogène par des enzymes de la plante. **(B)** La perception de l'agent pathogène par les PRR déclenche l'induction d'un signal de danger dont la transduction se fait à travers un réseau complexe et redondant de protéines de la plante ou de signaux chimiques. L'intégration du signal de danger par ce réseau de transduction aboutit dans le noyau de la cellule végétale. L'expression des gènes de défense qui en découle peut se traduire **(C)** par la production de molécules antimicrobiennes acheminées jusqu'au site d'infection par le trafic vésiculaire, ou **(D)** par l'induction d'une réaction de mort cellulaire programmée. **(E)** En parallèle les agents pathogènes peuvent sécréter dans l'espace apoplastique des effecteurs qui vont inhiber la reconnaissance de l'agent pathogène soit en masquant les PAMPs et MAMPs soit en inhibant l'action des PRR, ou encore en empêchant la production des DAMPs ou en les dégradant. **(F)** Certains des effecteurs appelés « effecteurs cytoplasmiques » parviennent à entrer dans le cytoplasme de la cellule végétale pour (i) inhiber les voies de transduction du signal de danger induit par la reconnaissance (A) extra- ou (G) intra-cellulaire de l'agent pathogène, (ii) en allant inhiber directement dans le noyaux l'expression de gènes de défense, (iii) en empêchant la sécrétion par la plante des molécules antimicrobiennes (inhibition du trafic vésiculaire), (iv) en activant l'expression de gènes de sensibilité de la plante produisant par exemple des transporteurs de sucres utilisés dans le transfert de nutriments de l'hôte vers l'agent pathogène. **(G)** Les effecteurs cytoplasmiques peuvent être perçus par des protéines de résistance de la plante.

IV.B.1.2) *Reconnaissance des agents pathogènes et initiation du signal de danger.*

La perception extracellulaire des micro-organismes présents dans l'environnement se ferait principalement par l'intermédiaire de récepteurs de la plante appelés **Pattern-Recognition-Receptors (PRR)** organisés en complexes membranaires (Han and Jung, 2013; Macho and Zipfel, 2014; Zipfel, 2014) (Figure 15A). Contrairement aux mammifères qui présentent des PRRs localisés aussi bien à l'intérieur qu'à la surface de leurs cellules, tous les PRRs de plantes connus sont situés au niveau de la surface cellulaire (Zipfel, 2014).

Deux types de PRRs sont connus aujourd'hui : les **Receptor-Like Kinase (RLK)** et les **Receptor-Like Protein (RLP)**. Tous ces PRRs présentent un domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire qui peut être de type Répétitions Riches en Leucine (LRR), Motif Lysine (LysM), Lectine ou encore Epidermal Growth Factor (EGF)-like. Ce qui différencie les RLKs des RLPs est la présence d'un domaine kinase intracellulaire chez les RLKs alors qu'il est absent chez les RLPs.

Dans la plupart des cas, les PRRs fonctionnent en homodimères, en hétérodimères ou en hétéromultimères (Figure 16), pour initier la transduction d'un signal de danger suite à la perception d'un PAMP ou DAMP spécifique (Macho et al., 2014; Zipfel, 2014; Böhm et al., 2014). Par exemple, les molécules de chitine issues de la dégradation de la paroi des champignons induisent la formation d'un complexe de récepteurs actifs à travers l'**homodimérisation** des protéines RLK AtCERK1 chez *A. thaliana* (Figure 16A). Cette même molécule de chitine est aussi reconnue par le récepteur LYM2 chez *A. thaliana*, et par l'**hétéromultimère** OsEBIP/OsCERK1 chez le riz (Figure 16B). La reconnaissance du PAMP chitine illustre parfaitement la redondance de ces systèmes de perception chez les plantes. Chez les bactéries, la flagelline est reconnue au travers de deux épitopes différents, flg22 et flgII-28. L'épitope flg22 est reconnue par l'**hétérodimère** FLS2/BAX1 chez de nombreuses plantes supérieures. Chez la tomate il est possible que des mécanismes similaires à FLS2/BAX1 soient impliqués dans la reconnaissance de l'épitope flgII-28, cependant aucun des récepteur n'a encore été identifié (Zipfel, 2014; Figure 16C). Pour certains PRRs (ex : CERK1 et FLS2), des récepteurs orthologues ciblant les mêmes PAMPs ont été identifiés chez des plantes pouvant appartenir à des familles différentes (Lacombe et al., 2010; Zipfel, 2014). Venant affirmer l'importance des PRR dans ce système de perception, la disruption chez *A. thaliana* du récepteur FLS2, qui intervient dans la perception du PAMP flagelline, entraîne une

déficience partielle de son immunité vis-à-vis d'un grand nombre d'espèces bactériennes (Zipfel et al., 2004).

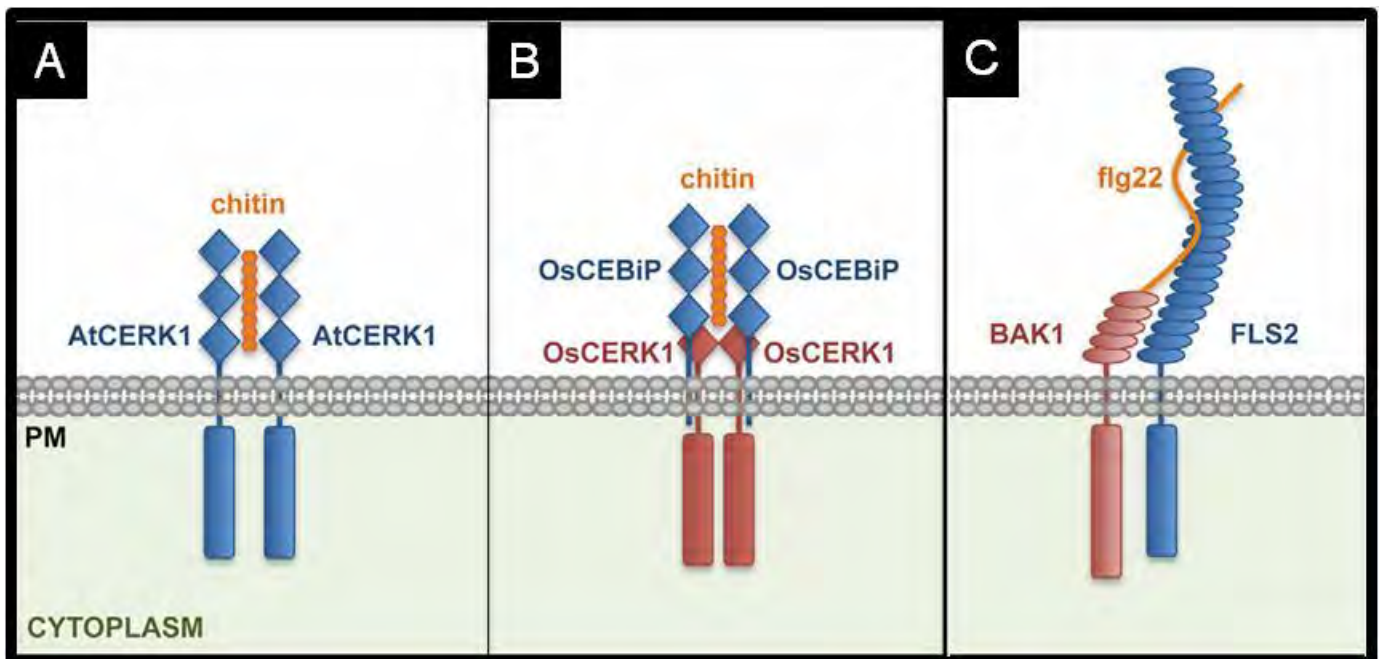


Figure 16 : Exemple montrant la perception d'un ligand par l'hétérodimérisation, l'homodimérisation ou la multidimérisation des PRRs de plante (Macho et Zipfel, 2014). (A) Chez Arabidopsis, les longues chaînes de chitine agissent en tant que ligand bivalent, conduisant à l'homodimérisation de la protéine AtCERK1 qui conduit à l'activation du complexe de récepteurs. (B) Chez le riz, la formation d'un complexe multimérique de récepteurs composé du dimère OsCEBiP et OsCERK1 est induit par la liaison de la chitine. (Shimizu et al., 2010). (C) Chez Arabidopsis, le peptide flg22 est perçu par le domaine LRR de FLS2 et cause la formation immédiate d'un hétérodimère stable avec le co-récepteur BAK1. (Chinchilla et al., 2007)

De façon générale, le scénario le plus probable est que ces récepteurs changent de conformation lorsqu'ils entrent en contact avec leur ligand, ce qui a pour effet d'activer un complexe présent au niveau du cytoplasme et qui joue le rôle de régulateur positif ou négatif sur la transduction du signal de danger. Le plus souvent, ces régulateurs agissent sur l'état de phosphorylation des cibles des PRRs.

Par exemple, chez *A. thaliana*, les protéines SCD1, BSK1 ainsi que la phosphorylation de BIK1 sont nécessaires à l'activation du choc oxydatif (production de molécules anti-microbiennes de type espèces réactives de l'oxygène qui peuvent aussi induire la PCD) mis en place suite à la perception du PAMP bactérien flg22 (peptide de la flagelline) (Figure 17). A l'inverse, lorsque flg22 est absent, un ensemble de régulateurs négatifs tels que des phosphatases inhibe la phosphorylation de BIK1 (Figure 18). Chez le riz, en absence de bactéries phytopathogènes de type *Xanthomonas*, XB24 garde le récepteur / protéine de résistance XA21 inactif au sein de l'hétérodimère qu'il forme avec le récepteur OsSERK2 en induisant la phosphorylation de certains résidus. Lorsqu'un PAMP de *Xanthomonas* est perçu par cet hétérodimère, XB24 est relâché et XA21 est activé. Par la suite, la protéine XB15 se lie avec XB21 activé et induit sa dé-phosphorylation pour atténuer l'induction des réponses de défense.

Chez *A. thaliana*, il a été montré que ces régulateurs négatifs pouvaient fonctionner en entraînant la dégradation de récepteurs tels que celui de la flagelline FLS2. Les mécanismes d'autophagie et de trafic vésiculaire ont aussi un rôle important dans la régulation des différentes composantes de ce système à travers le contrôle de leur dégradation, de leur localisation et de leur recyclage (Teh and Hofius, 2014; Zhou et al., 2014).

IV.B.1.3) Transduction et intégration des signaux de danger.

La transduction du signal de danger se fait à travers un réseau complexe et redondant pouvant faire intervenir des kinases, des signaux calciques, des espèces réactives de l'oxygène (ROS), ainsi que le trafic vésiculaire et l'autophagie qui désigne la dégradation de composants cellulaires par ses propres lysosomes (Gassmann and Bhattacharjee, 2012; Teh and Hofius, 2014; Lindeberg et al., 2012) (Figure 15B). L'une des hypothèses avancées est que la complexité de ce système serait à l'origine de sa robustesse, permettant ainsi à chaque cellule de la plante d'induire un signal de danger en réponse adaptée à la menace extérieure perçue, et ce, malgré la disruption d'une de ses

Figure 17 : Exemple des complexes protéiques impliqués dans la perception de flg22 et de la chitine chez Arabidopsis et le riz. Chez Arabidopsis la perception de flg22 conduit à la phosphorylation des domaines cytoplasmiques de FLS2 et BAK1, ainsi que le RLCK BIK1. Une fois active, BIK1 se désolidarise du complexe de récepteurs conduisant ainsi à la phosphorylation et à l'activation de la NADPH AtRBOHD. Le choc oxydatif induit par flg22 nécessite la présence du récepteur RLK BSK1 et l'endocytose du régulateur SCD1. De même, BIK1 est nécessaire pour le choc oxydatif déclenché par l'activation induite par la chitine de AtCERK1. Dans les deux cas, on ne sait pas comment l'activation des PRR conduit à l'activation de la voie des MAPK et d'autres substrats en aval. (Macho et al 2014)

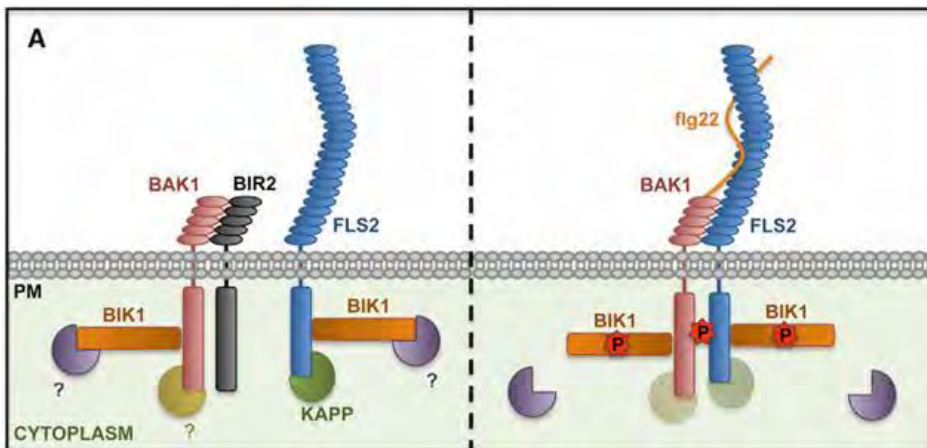
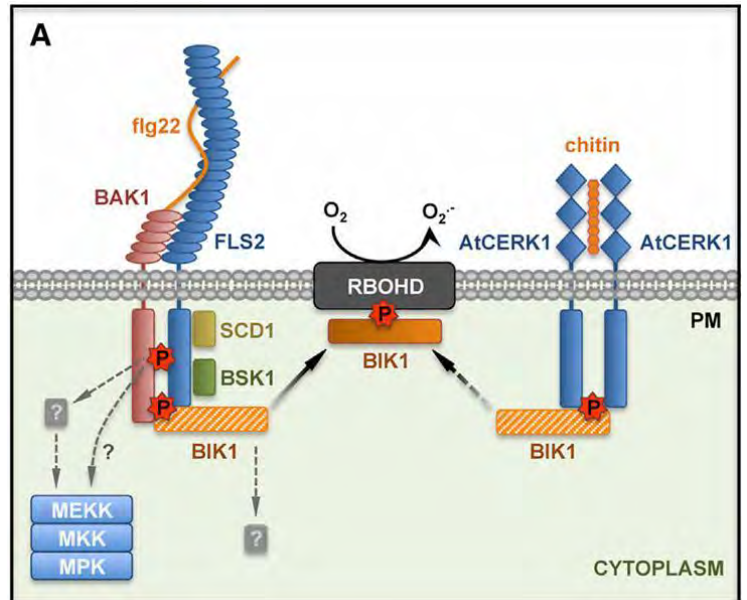


Figure 18 : Régulation négative des PRR. (A) Chez Arabidopsis, BIR2 interagit avec BAK1 en l'absence d'éliciteurs, inhibant la formation de l'hétérodimère entre FLS2 et BAK1. De plus, des phosphatases et autres potentiels régulateurs négatifs ciblent les kinases au sein du complexe PRR. La liaison de flg22 conduit au détachement de BIR2 et à la dissociation ou à l'inactivation des phosphatases, autorisant la formation de l'hétérodimère FLS2-BAK1 et donc l'activation du complexe. (Macho et al. 2014)

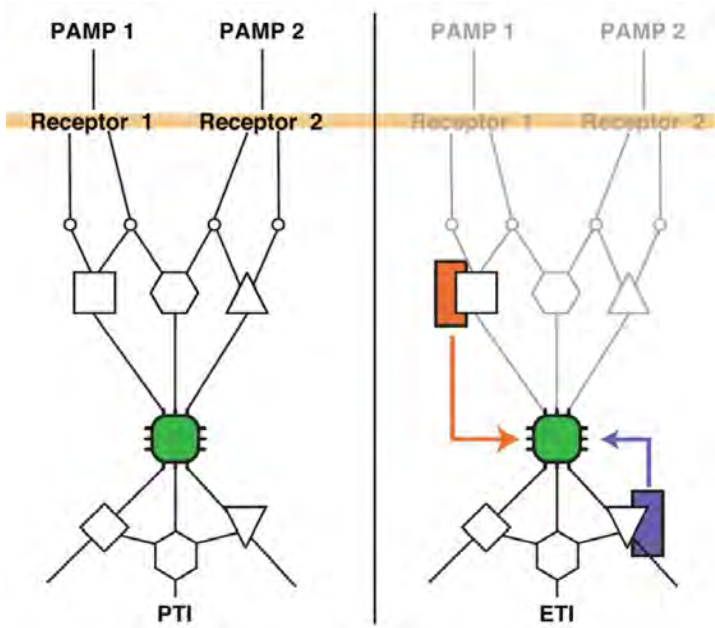


Figure 19 : Schéma des voies de transduction du signal de danger induit suite à la reconnaissance de PAMPs (PTI) et des effecteurs (ETI). (Gassmann and Bhattacharjee, 2012)

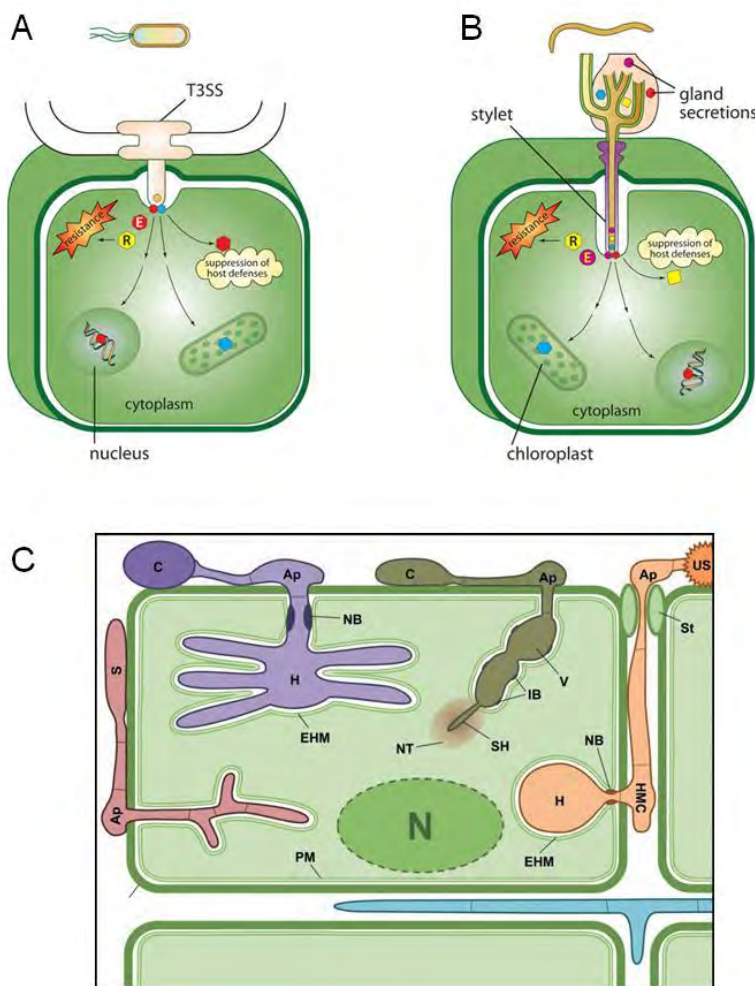


Figure 20 : (A) Effecteurs bactériens injectés dans la cellule végétale à travers le système de sécrétion de type III (T3SS) (Torto-Alalibo et al., 2009). (B) Effecteurs de nématodes injectés dans la cellule végétale à travers un stylet. (C) Structure infectieuses de différents agents pathogènes filamenteux (Torto-Alalibo et al., 2009). (C) Représentation schématique des structures d'infection et interfaces d'échange de différents champignons biotrophes (*Blumeria graminis*, *Colletotrichum graminicola*, *Puccinia graminis*, *Ustilago maydis*, *Cladosporium fulvum*). Ap, appressorium; C, conidie; CW, cell wall, paroi cellulaire; EHM, membrane extra-haustoriale; H, haustorium; HMC, cellule mère haustoriale; IB, interfacial bodies, structure d'interface; N, noyau; NB, neckband; NT, tissus nécrotiques; PM, membrane plasmique; S, spore; SH, hyphe secondaire; St, stomate; US, urédospore; V, vésicule. (Doehlemann et Hemetsberger, 2013)

composantes par un effecteur de l'agent pathogène (Gassmann and Bhattacharjee, 2012, Figure 19). Il semblerait que certaines de ces voies de transduction du signal soient largement conservées chez des plantes phylogénétiquement éloignées. Par exemple, l'expression transgénique du PRR de Brassicacées EFR chez des plantes sensibles de la famille des Solanacées permet d'augmenter leur résistance vis à vis d'un large spectre de bactéries (Lacombe et al., 2010).

L'intégration de ces signaux de danger par ce réseau se terminerait dans le noyau de la cellule végétale où serait activée la transcription de nombreux gènes de défense. Dans la plupart des cas, ces gènes permettraient la production de molécules antimicrobiennes acheminées ensuite jusqu'au point d'infection en utilisant le trafic vésiculaire (Lindeberg et al., 2012).

Cependant, cette reconnaissance extracellulaire peut aussi induire la mise en place de mécanismes de défenses comme le dépôt de callose, la production de molécules antimicrobiennes, ou des réponses de type hypersensible conduisant à la résistance de la plante.

IV.B.2. Les effecteurs, déterminants clés du pouvoir pathogène.

Afin de contourner les mécanismes de perception et de défense de la plante, la plupart des agents pathogènes seraient capable de sécréter des effecteurs apoplastiques ou cytoplasmiques.

Les effecteurs apoplastiques (Figure 15E): Ces protéines sont sécrétées dans l'espace apoplastique où ils agissent en tant que facteur de virulence. Contrairement au système de sécrétion de type II bien connue chez les bactéries (Nivaskumar et Francetic, 2013), les structures impliquées dans la sécrétion des effecteurs dans le milieu apoplastique restent peu connues chez les organismes filamenteux que sont les champignons et oomycètes. On peut alors distinguer les microorganismes capables de mettre en place des structures d'infection/nutrition appelées haustorium, de ceux qui n'en font pas. En effet, certains oomycètes (exemples : *P. halstedii*, *H. arabidopsidis*, *Ph. infestans*) et champignons (exemples : *Uromyces fabae* et *Melampsora lini*) sont capables de mettre en place des haustoria, sorte d'interface entre la plante et l'agent pathogène au sein d'une invagination de la membrane cytoplasmique de la cellule de l'hôte.

Parmi les champignons qui n'utilisent pas d'haustoria, il a été montré que certaines souches de *Magnaporthe oryzae* étaient capables d'accumuler des effecteurs sécrétés au niveau de structures appelées « Biotrophic Interface Complexe » (BIC) avant leur translocation dans les cellules de l'hôte. Chez *Ustilago maydis*, ce sont des hyphes infectieux qui jouent le rôle d'interface entre le champignon et la plante (Brefort et al., 2009 ; Koeck et al., 2011). Dans tous les cas, ces structures

joueraient le rôle d'interface dynamique permettant la sécrétion d'effecteurs (Yi and Valent, 2013; Petre and Kamoun, 2014; Doehlemann and Hemetsberger, 2013). **Les effecteurs cytoplasmiques :** Chez les bactéries, les effecteurs cytoplasmiques sont injectés directement dans la cellule végétale par les systèmes de sécrétion de type III et IV (He et al., 2004; Christie et al., 2014). Chez les oomycètes et les champignons, les effecteurs cytoplasmiques sont sécrétés de la même façon que les effecteurs apoplastiques mais les modalités et sites d'entrée de ces protéines dans le cytoplasme de la cellule végétale font toujours débat (Kale et al., 2010; Petre and Kamoun, 2014; Wawra et al., 2012, 2013; Figure 20). Néanmoins, une fois dans le cytoplasme, ces protéines jouent un rôle essentiel dans la virulence des microorganismes en établissant les conditions propices au développement de l'agent pathogène. De plus, il a été montré que certains effecteurs cytoplasmiques pouvaient se déplacer de cellules en cellules pour préparer l'infection dans les tissus adjacents avant qu'il y ait contact avec le micro-organisme (Khang et al., 2010).

IV.B.2.1) Le rôle des effecteurs dans la virulence des agents pathogènes.

Au cours de l'évolution, les microorganismes phytopathogènes sélectionnés par l'environnement sont ceux ayant développé, à travers l'utilisation des effecteurs (apoplastiques et cytoplasmiques), différentes stratégies permettant : (i) la remobilisation des nutriments de l'hôte et (ii) l'inhibition des mécanismes de défense mis en place par la plante suite à la reconnaissance extracellulaire des différents agents pathogènes (Göhre and Robatzek, 2008).

Dégradation des parois végétales.

Un des rôles de la paroi des cellules végétales est de faire office de barrière naturelle et préformée contre les agents pathogènes. Les effecteurs apoplastiques de type Cell Wall Degrading Enzymes (CWDE), identifiés chez les bactéries et les champignons, jouent un rôle essentiel dans la pénétration et la colonisation de la plante en participant à la dégradation de la paroi qui entoure les cellules végétales (Sinha et al., 2013). Parmi ces enzymes, des hydrolases impliquées dans la dégradation de la cellulose, du xyloglucane et de la pectine ont été identifiées chez les oomycètes (Costanzo et al., 2006; Wu et al., 2008; Feng et al., 2010; A and B, 2010). Le fait que ces grandes familles multigéniques aient été identifiées chez de nombreux oomycètes suggère qu'elles constituent un arsenal clé dans ce genre, en tirant partie de leur variabilité pour échapper à la

reconnaissance de la plante (Misas-Villamil et van der Hoorn, 2008).

Inhibition directe des molécules et enzymes de défense de la plante.

Une autre stratégie consiste à inhiber directement les molécules et enzymes de défense secrétés par la plante (protéases, enzymes dégradant la paroi, hydrolases) en utilisant des effecteurs apoplastique de type protéases. C'est le cas des protéines inhibitrices de glucanases de plantes identifiées chez *Phytophthora sojae*, *Phytophthora ramorum*, *Ph. infestans* et *Bremia lactucae* (Stassen et al., 2012; Rose et al., 2002; Damasceno et al., 2008). Toujours dans la même catégorie, des protéines inhibitrices de protéases à sérines de type Kazal ont été identifiées chez différents *Phytophthora* (*Ph. infestans*, *Ph. palmitovora*, *Ph. ramorum*, *Ph. sojae* et *Ph. brassicae*), *Plasmopara halstedii* et *Plasmopara viticola* (Tian et al., 2004; Tyler et al., 2006; Chinnapun et al., 2009; Mestre et al., 2012). Cette stratégie vient rejoindre celle exposée dans le point (ii) lorsque l'inhibition des enzymes de défense de la plante vient inhiber le relarguage des PAMPs dans l'espace apoplastique (Rose et al., 2002).

Inhibition des mécanismes de défenses de l'hôte : Jeu de cache-cache.

Les effecteurs apoplastiques peuvent, par plusieurs moyens, empêcher le déclenchement des mécanismes de défense/résistance chez la plante, en évitant par exemple la perception des microorganismes par l'hôte.

Pour ce faire, la stratégie la plus simple est d'empêcher la reconnaissance des micro-organismes par les PRRs de plantes via la modification des motifs protéiques de type PAMPs (Gómez-Gómez et al., 1999; Sun et al., 2006). Cependant, ces transformations peuvent avoir un impact sur la structure de la protéine se répercutant négativement sur la valeur adaptative (« fitness ») de l'agent pathogène. Dans ce cas, les PAMPs sont soumis à une sélection purificatrice qui limite la diversification de ces motifs protéiques.

Certains micro-organismes ont développé au cours de l'évolution des mécanismes faisant intervenir des effecteurs apoplastiques permettant de dégrader ou de camoufler les PAMPs aux « yeux » de la plante. Par exemple, la bactérie symbiotique *Sinorhizobium meliloti* produit des lipopolysaccharides capables de former une couche protectrice empêchant la perception de certains PAMPs par les PRRs de plante. De même, Avr4 et Ecp6, deux effecteurs produits par *Cladosporium fulvum*, présentent des domaines de liaison à la chitine lui permettant de dissimuler

ces molécules vis-à-vis des récepteurs de la plante en inhibant ainsi la perception de l'agent pathogène (Libault et al., 2007; Ali and Bakkeren, 2011).

Une autre stratégie est mise en place par *Pseudomonas syringae*, chez qui la dégradation du PAMP peptidoglycane par l'effecteur apoplastique HopP1 permet de ne plus être perçu par les récepteurs de la plante (Oh et al., 2007). Les effecteurs qui sont, de par leurs fonctions, moins soumis à une sélection purificatrice, peuvent muter plus aisément et échapper à la reconnaissance de leurs hôtes. De façon surprenante, alors que plusieurs effecteurs apoplastiques ciblent des enzymes de défense de la plante tels que des protéases, aucun effecteur apoplastique capable d'inhiber l'action des chitinases, à l'origine de la libération de DAMPs, n'a encore été identifié (Rovenich et al., 2014).

Inhibition des signaux de danger chez l'hôte.

Une fois les PAMPs reconnus par les PRR, les signaux de danger peuvent être inhibés au niveau de la transduction du signal dans la cellule végétale. En effet, les agents pathogènes utilisent aussi un panel d'effecteurs (apoplastiques et cytoplasmiques) pour empêcher l'initiation et la transduction du signal de danger induites par la reconnaissance extracellulaire de PAMPs. En plus de son rôle dans la séquestration des molécules de chitines, l'effecteur Ecp6 pourrait interférer avec le complexe protéique capable d'initier chez la plante un signal de danger suite à la détection de la chitine (Sánchez-Vallet et al., 2013). Un autre exemple est l'effecteur cytoplasmique AvrPtoB de *Ps. syringae* pv. *Tomato* DC3000, qui présente au niveau de son domaine C terminal une homologie des domaines « RING finger » et de l'homologie avec une E3 ubiquitine ligase. Cet effecteur pourrait faciliter la dégradation par le protéasome du PRR FLS2 permettant à la plante de percevoir la flagelline (reconnaissance du PAMP flg22). Toujours chez *Ps. syringae*, comme AvrPtoB, l'effecteur AvrPto joue un rôle au niveau des PRRs dans l'inhibition du déclenchement du signal de danger induit suite à la perception de PAMPs (He et al., 2006).

Par la suite, la transduction du signal se fait majoritairement par cascades de protéines MAP kinases qui peuvent être inhibées par déphosphorylation. Chez *A. thaliana*, deux MAP kinases clés dans la voie de signalisation (MAPK3 et MAPK6), activées par le PRR FLS2, peuvent être bloquées définitivement suite à l'altération de leurs résidus thréonine (sur lesquels peut se faire la

phosphorylation) par la phosphothréonine lyase HopA11, un effecteur de *Ps. syringae* (Zhang et al., 2007). Toujours chez *Ps. syringae* pv. *Tomato* DC3000, HopF2 serait capable d'inhiber en partie les mécanismes de défense de la plante grâce à son activité mono-ADP-ribosyltransférase de MAP kinase-kinase intervenant dans le déclenchement de la PTI et de l'ETI. Chez l'oomycète *Ph. infestans* les effecteurs PexRD2 et Avr3a sont capables de supprimer la mort cellulaire induite par la reconnaissance de l'agent pathogène (Bos et al., 2010a; King et al., 2014). D'après plusieurs études, les effecteurs cytoplasmiques inhibant la transduction des signaux de danger cibleraient préférentiellement les principaux nœuds de ces réseaux (Lindeberg et al., 2012; Gassmann and Bhattacharjee, 2012).

Manipulation de l'hôte.

Il est aussi possible pour les micro-organismes d'utiliser des effecteurs capables de cibler le noyau de la cellule végétale et d'interagir avec la machinerie cellulaire pour induire ou inhiber, directement ou non, l'expression (transcription ou traduction) de gènes de défense de la plante (Göhre and Robatzek, 2008).

L'effecteur HopU1 de *Ps. syringae* contrôle l'expression des gènes de la plante en se liant à deux protéines chaperonnes AtGrp7 et AtGrp8 intervenant dans le turnover de certains ARNs (Fu et al., 2007). La régulation de l'expression des gènes de défense chez les plantes peut faire intervenir des petits ARNs de deux catégories, les microRNA (miRNA) et les small RNA (siRNA). Par exemple, l'effecteur de *Ps. syringae* AvrRpt2 induit l'expression du siRNA Nat-siRNAATGB2 contribuant ainsi à l'ETI en empêchant la production de PPRL, un régulateur négatif de la résistance induit par le gène de plante RPS2 (Katiyar-Agarwal et al., 2006).

D'autres effecteurs semblent jouer un rôle direct dans la régulation du transcriptome de défense en tant que facteurs de transcription. C'est le cas des effecteurs bactériens de type TAL (Transcription Activator-Like) identifiés chez les espèces du genre *Xanthomonas spp* et chez *Ralstonia solanacearum* (Deslandes and Genin, 2014; Boch and Bonas, 2010). Ces effecteurs sont constitués d'un signal de localisation nucléaire, d'un domaine d'activation et d'un domaine de liaison à l'ADN qui leur permettent de fonctionner tels des facteurs de transcription. Le domaine de liaison à l'ADN de ces TALs est constitué d'un nombre variable de modules de 34 acides aminés répétés en tandem. La séquence de ces modules est conservée, à l'exception des résidus en

position 12 et 13 qui peuvent varier pour permettre une liaison spécifique à différents promoteurs. Le code qui régit cette interaction entre les résidus variables et les promoteurs de gènes cible est très bien décrit par Bosh *et al.* (2009) et par Moscou et Bogdanove en 2009. De plus, la structure des protéines TALs a été observée par cristallographie (Mak *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2012). Ces études montrent que le résidu variable 12 vient placer le résidu variable 13 au contact de l'ADN. Ces propriétés de liaison spécifique à l'ADN ont été utilisées pour développer un ensemble de méthodes basées sur les Transcription Activator-Like Effectors (TALE) et permettant des modifications ciblées de l'ADN génomique (Juillerat *et al.*, 2014; Wright *et al.*, 2014).

La plupart des effecteurs de type TAL identifiés aujourd'hui stimulent le développement de l'agent pathogène en activant la transcription de gènes de la plante, appelés « gènes de sensibilité », qui interviennent dans la remobilisation des ressources de l'hôte au profit du microorganisme. C'est par exemple le cas du TAL PthXo1 de *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (Xoo) qui active la transcription du gène OsSWEET11 codant pour un transporteur de sucre (Chen *et al.*, 2010). Cependant, une autre étude suggère que OsSWEET11 serait capable de transporter le cuivre à l'intérieur du cytoplasme afin d'en diminuer la quantité dans le xylème et de favoriser ainsi le développement de Xoo dans les tissus conducteurs de la plante (Yuan *et al.*, 2010). Le TAL AvrBs3 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* cible un élément conservé au sein des promoteurs du gène de poivron *UPA20* induisant la transcription de ce facteur régulant la croissance cellulaire. Ainsi AvrBs3 est capable d'induire une hypertrophie cellulaire chez les plantes sensibles (Marois *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 2007; Chapitre III).

Inhibition des réponses de défense de la plante utilisant le transport vésiculaire (Figure 15).

Enfin, la dernière stratégie vise à empêcher l'acheminement des molécules anti-microbiennes produites par la plante jusqu'au site d'infection en jouant sur le trafic vésiculaire qui constitue un goulot d'étranglement dans l'immunité végétale. C'est par exemple le cas des effecteurs de *Ps. syringae* AvrE et HopM1 (Lindeberg *et al.*, 2012).

IV.B.2.2) Localisation subcellulaire des effecteurs.

Le contexte spatio-temporel dans lequel les effecteurs exercent leur activité biologique est essentiel pour la fonction de ces protéines dans la virulence de l'agent pathogène (Hicks and

Galán, 2013). En effet, après leur introduction dans la cellule de l'hôte, la localisation subcellulaire des effecteurs peut être un indice pour identifier la fonction de ces protéines dans la virulence de l'agent pathogène. Ainsi, chez l'oomycète *Ph. capsici*, la localisation d'effecteurs de type CRN dans différents compartiments nucléaires de la plante suggère un rôle de ces protéines dans la régulation de l'expression des gènes de l'hôte (Stam et al., 2013b). De plus, les effecteurs CRN83_152, CRN20_624 et CRN79_188 de *Ph. capsici* induisent des changements de morphologie nucléaire (Stam et al., 2013a).

L'effecteur HopM1 de *Ps. Syringae*, qui inhibe la sécrétion de molécules antimicrobiennes en ciblant le trafic vésiculaire de la plante, est localisé dans des petites vésicules intracellulaires issues de l'appareil de Golgi.

Chez *Hyaloperonospora arabidopsidis*, la localisation dans le tonoplaste de la plante de l'effecteur HaRxL17 augmente la sensibilité de l'hôte. D'autres effecteurs ciblent les mitochondries ou les chloroplastes de la plante (Hicks and Galán, 2013). L'effecteur de *Ps. syringae* pv. *tomato* DC3000, HopF2 cible la membrane plasmique pour inhiber l'initiation du signal de PTI et d'ETI (Robert-Seilaniantz et al., 2006). Cette localisation est aussi requise pour que HopF2 puisse jouer son rôle de facteur d'avirulence chez les hôtes résistants.

Plusieurs mécanismes détaillés par Hicks et Galán en 2013 permettent aux effecteurs de rejoindre leur cible à l'intérieur de la cellule végétale (effecteurs cytoplasmiques). Une des stratégies souvent utilisée est la modification post traductionnelle des effecteurs par la machinerie de l'hôte tels que l'ajout de groupements lipidiques ou l'ubiquitination. Dans les deux cas, la nature, la conformation et le nombre de ces groupements peuvent avoir un impact sur sa localisation. De façon générale, ces exemples illustrent bien l'importance de la localisation subcellulaire des effecteurs dans leurs rôles en tant que facteurs de virulence ou d'avirulence (ETI).

Pour conclure cette partie, nous avons vu que la plupart des micro-organismes phytopathogènes sécrètent des effecteurs dans le milieu apoplastique, dont certains (effecteurs cytoplasmiques) entrent à l'intérieur de la cellule végétale. L'ensemble de ces protéines a pour but de créer un environnement favorable au développement de l'agent pathogène. Lorsque l'action des effecteurs induit la sensibilité de la plante qui développe alors pleinement les symptômes de la maladie, ces protéines jouent le rôle de facteurs de virulence et induisent l'**Effector-Triggered-Susceptibility (ETS)**. Cependant, ces effecteurs peuvent être reconnus par la plante, induisant à leur tour des

mécanismes de défenses.

IV.B.3. Perception intracellulaire des effecteurs cytoplasmiques de l'agent pathogène.

Les effecteurs cytoplasmiques qui ciblent les différents compartiments cellulaires végétaux dans le but d'inhiber les mécanismes de défense/résistance peuvent être perçus, directement ou non, par la plante. Cette perception est susceptible d'induire la mise en place d'un second niveau de mécanismes de défense qui font passer les effecteurs du statut de facteur de virulence à celui de facteur d'avirulence.

IV.B.3.1) Gènes de résistance de la plante.

Certaines plantes sont capables de reconnaître les effecteurs cytoplasmiques comme du « non soi » grâce à des **protéines de résistance (R)**. Cette reconnaissance peut être directe, c'est le cas pour la protéine de résistance R3a qui interagit physiquement avec l'effecteur de *Ph. infestans* Avr3a et permet ainsi à la pomme de terre de résister à l'infection (Figure 21). Mais cette reconnaissance peut aussi se faire de manière indirecte (modèle de garde). Dans ce cas, la protéine de résistance, le « gardien », perçoit la modification qu'un effecteur induit sur des protéines ou un processus cellulaire de la plante qui sont dits « gardés ». Par exemple, chez la tomate, l'interaction physique entre les effecteurs de *Ps. syringae* AvrPto ou AvrPtoB avec la protéine kinase Pto conduit à des modifications chez Pto qui sont perçues par la protéine de résistance Prf à travers les changements qu'ils entraînent sur la protéine kinase Pto (Deslandes and Rivas, 2012; Mucyn et al., 2006; Kim et al., 2002).

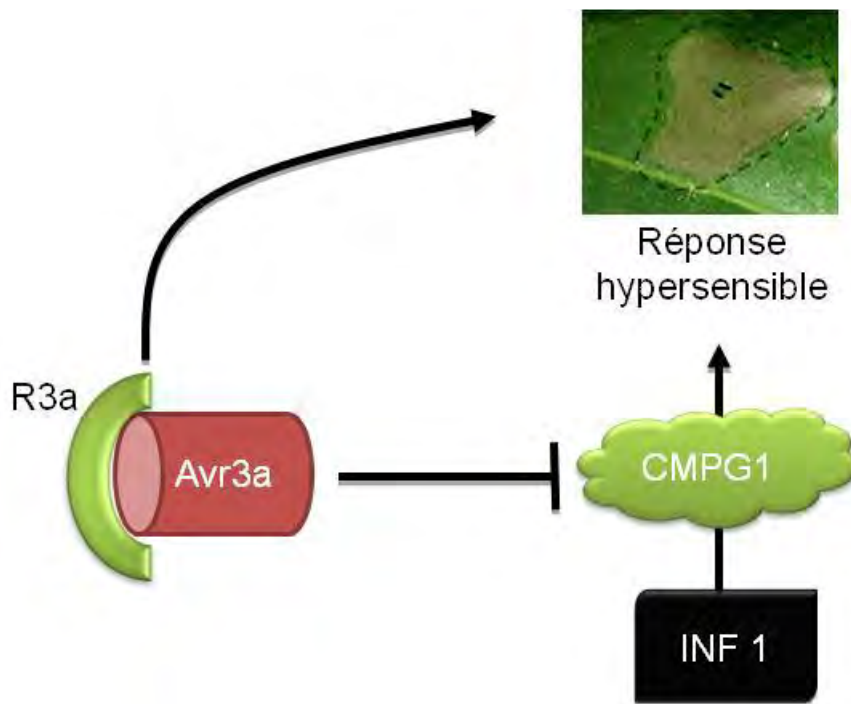


Figure 21 : Schéma représentant le rôle de l'effecteur Avr3a dans la virulence de *Ph. infestans*. Avr3a est capable d'inhiber la mise en place des défenses de la plante suite à la reconnaissance du PAMP INF1, en jouant sur la protéine de plante CMPG1. Cependant, chez les variétés de pomme de terre possédant le gène de résistance correspondant R3a, il y a reconnaissance directe entre l'effecteur de *P. infestans* Avr3a et la protéine de résistance correspondante R3a.

La protéine Pto est donc dite « gardée » par la protéine de résistance Ptf. Cet exemple souligne l'un des points forts du modèle de garde dans lequel une seule protéine de résistance peut percevoir l'action de plusieurs effecteurs sur une même cible gardée. Ainsi, ce résultat remet en cause l'aspect binaire du modèle zig-zag basé sur le concept de relation gène pour gène.

IV.B.3.2) Intégration des signaux de danger et mise en place des défenses de la plante.

L'ensemble des signaux de danger induits par la reconnaissance extracellulaire ou intracellulaire de l'agent pathogène sont intégrés par la plante à différents niveaux du réseau de transduction du signal. Une plante est résistante lorsqu'elle est capable d'intégrer l'ensemble des signaux de danger pour mettre en place une réponse adaptée c'est-à-dire rapide, transitoire (restreinte à la durée de l'infection), ciblée et efficace contre l'agent pathogène présent, et localisée au point d'infection.

Du fait de leur phénotype visible, les mécanismes de résistances de type **réaction hypersensible (HR)** ont été majoritairement étudiés, permettant l'identification de nombreux gènes d'avorulence. Cette réaction se traduit par une mort cellulaire programmée, restreinte aux zones de contacts avec l'agent pathogène, stoppant ainsi son développement (van Doorn et al., 2011; Fomicheva et al., 2012). Cette réaction de défense conduit la plupart du temps à l'immunité de l'hôte et à l'absence de symptômes de maladie.

Cependant, de nombreux travaux semblent montrer que la reconnaissance d'un effecteur ou de son action sur une protéine végétale peut aussi entraîner une réponse intermédiaire allant de la fermeture des stomates jusqu'à la production d'une grande variété de molécules antimicrobiennes (Mclachlan et al., 2014; Malinovsky et al., 2014; Doehlemann and Hemetsberger, 2013). En effet, il semblerait qu'il y ait une continuité entre les réponses induites dans les cadres de la PTI et de l'ETI (Roux et al., 2014).

Néanmoins, chacun de ces mécanismes est efficace envers un spectre plus ou moins large d'agents pathogènes. Par exemple, l'induction de mécanismes de type réaction hypersensible n'est efficace que si l'agent pathogène est en phase biotrophe, certains microorganismes nécrotrophes allant même jusqu'à induire cette réaction de défense pour favoriser leur développement (Govrin and Levine, 2000; Glazebrook, 2005; Lorang et al., 2007).

Quoi qu'il en soit, lorsque la reconnaissance de ces effecteurs induit des mécanismes de résistance, ces protéines deviennent alors des facteurs d'avorulence et induisent l'**Effector Triggered Immunity (ETI)**. L'ensemble de ces mécanismes est très bien décrit dans différentes revues (Pais et al., 2013; Wawra et al., 2012a; Bozkurt et al., 2012). Contrairement aux voies de signalisation impliquées dans la PTI, Gassmann et Bhattacharjee rassemblent dans une revue en 2012, des éléments qui laissent penser que les voies de signalisation utilisées pour déclencher l'ETI seraient courtes et directes.

En occultant une réalité biologique bien plus complexe (interaction des deux partenaires, plante et microorganisme, avec l'ensemble de leur environnement biotique et abiotique ; hétérogénéité spatio-temporelle de l'interaction; hétérogénéité tissulaire ; prise en compte du caractère quantitatif de certaines réponses ; Pritchard et Birch, 2014) ce modèle a le mérite de rendre accessible la réalité nous permettant de progresser dans la compréhension des interactions plantes-microorganismes. Ainsi, il illustre bien le rôle central que jouent les effecteurs en tant que facteurs de virulence ou d'avorulence en fonction du génotype de l'hôte au cours de la coévolution pathogène/hôte. Dans ce contexte de course à l'armement, on comprend aisément la fragilité des résistances utilisées dans les variétés de plantes cultivées. Néanmoins, le modèle du zig-zag ne doit donc pas être considéré comme un dogme immuable mais comme une base permettant la progression de nos connaissances sur ce sujet (Pritchard et Birch, 2014).

IV.C. Co-évolution plantes-agents pathogènes : une course à l'armement.

IV.C.1. Côté agent pathogène :

Face à leur reconnaissance et à la mise en place de mécanismes de défense par la plante, différents dispositifs ont été sélectionnés au cours de l'évolution pour permettre aux agents pathogènes d'infecter leurs hôtes. Pour cela, plusieurs stratégies évolutives visent à modifier le nombre et la nature des effecteurs sécrétés par les agents pathogènes.

La première stratégie vise à échapper à la vigilance de la plante en supprimant la reconnaissance des effecteurs de l'agent pathogène. Cette méthode peut être mise en œuvre en stoppant la production des effecteurs reconnus par la plante, soit en inhibant l'expression de ces gènes, soit en les délétant totalement ou partiellement de leur génome.

Il leur est aussi possible de modifier la séquence protéique des effecteurs secrétés afin de ne plus être reconnus par la plante, évitant ainsi la mise en place des mécanismes de défense. En effet, il a été montré que le polymorphisme présent chez les effecteurs pouvait être à la base de changements importants dans la virulence de ces micro-organismes en permettant la création d'effecteurs ayant la même fonction mais échappant à la reconnaissance de la plante. Par exemple, le polymorphisme de l'effecteur ATR13 (RxLR) joue un rôle important dans la pathogénicité de l'oomycète *Hyaloperonospora arabidopsidis*. La reconnaissance de la protéine d'avirulence ATR13 par le gène de résistance d'*A. thaliana* RPP13 peut être contournée par la mutation spécifique de trois acides aminés dans le domaine C-terminal de l'effecteur (Allen et al., 2008). A l'inverse, certains résidus protéiques d'ATR13, concernés au sein des populations naturelles, indiquent l'importance de leur rôle dans la fonction de la protéine et par extension dans la virulence de l'agent pathogène. De plus, chez de nombreux oomycètes tels que *Ph. infestans*, il est montré que les gènes codants pour des effecteurs sont majoritairement localisés dans des régions pauvres en gènes et riches en éléments transposables favorisant ainsi l'apparition de mutations et de recombinaisons (Cf Perspective et discussion générale).

La deuxième stratégie permettant d'inhiber les mécanismes de défense induits chez les plantes, vise à produire des effecteurs affichant de nouvelles fonctions adaptées à la suppression des mécanismes de défenses de l'hôte. La production de ces effecteurs peut se faire, (i) en activant la transcription de gènes préexistants dans le génome de l'agent pathogène, (ii) en acquérant du matériel génétique d'autres micro-organismes, ou encore (iii) en créant de nouveaux effecteurs par mutations ou recombinaisons génétiques (Gladieux et al., 2014).

IV.C.2. Côté plante :

Les plantes sont capables d'utiliser leurs différents systèmes de détection (gènes de résistance intervenant dans le système de garde et dans la reconnaissance directe des effecteurs) pour identifier les effecteurs de l'agent pathogène et, soit les contourner à leur tour, soit mettre en place des mécanismes de défense adaptés (Gururani et al., 2012).

Pour ce faire, la première stratégie vise à utiliser les mécanismes de plasticité génomique dont les plantes disposent et qui assurent continuellement la production d'une grande variété de protéines de résistance potentiellement capables de percevoir les nouveaux effecteurs produits par l'agent pathogène. En effet, l'analyse des génomes d'*A. thaliana* a mis en évidence que les gènes de résistance, regroupés entre gènes paralogues, sont parmi les plus polymorphes (Michelmore and Meyers, 1998; Borevitz et al., 2007; Clark et al., 2007). Ce regroupement de gènes présentant des séquences similaires faciliterait cette variabilité à travers des recombinaisons non homologues conduisant à la diversification (fusion, duplication) et à la suppression des gènes de résistance de plantes (Nagy and Bennetzen, 2008; Wicker et al., 2007).

La modification des motifs protéiques de la plante ciblées par les effecteurs de l'agent pathogène, constitue la deuxième stratégie de défense permettant ainsi d'échapper à l'action des effecteurs. Dans ce cas, malgré la présence de l'effecteur, celui-ci ne peut plus inhiber les mécanismes de défense de la plante en interagissant avec sa cible végétale.

Lorsque les effecteurs jouent le rôle de facteur de transcription, deux autres stratégies peuvent être mises en place. Premièrement, l'activation de la transcription de gènes de susceptibilité de la plante peut être modifiée suite au changement du promoteur de ce gène entraînant une baisse de la virulence de l'agent pathogène (Gust et al., 2010). Cette modification peut se produire au cours de la sélection naturelle ou être utilisée par l'homme en remplaçant dans des lignées cultivées l'allèle sensible par l'allèle résistant (Jorgensen, 1992). Ces résistances, plus difficiles à identifier, sont supposées être durables sur un large spectre d'hôtes (Ortiz et al., 2002). Néanmoins, si ces gènes de plante sont la cible directe des effecteurs, il est possible d'utiliser ces protéines de l'agent pathogène pour identifier les promoteurs cibles. Toutefois, la modification du promoteur d'un gène de sensibilité peut avoir des effets importants sur sa transcription en l'absence de tout pathogène qui peut impacter le développement de la plante, surtout dans le cas de gènes pléiotropes.

IV.D. La durabilité des résistances chez les plantes.

Une résistance est dite durable si elle est efficace pendant une longue période, sur de grandes surfaces et dans des conditions favorables au développement de l'agent pathogène (Johnson, 1979). Même s'il paraît difficile de prédire la durabilité d'une résistance sur plusieurs années avant son déploiement, le contournement rapide de la plupart des gènes de résistance utilisés jusqu'alors interroge sur les facteurs clés qui déterminent l'efficacité de la résistance d'une plante dans l'espace et dans le temps (Cooke et al., 2012; Stukenbrock and Bataillon, 2012).

Au cours des six dernières décennies, les plus grosses puissances mondiales sont passées d'une agriculture paysanne à une agriculture industrielle. Ce changement s'est traduit par une diminution du nombre d'exploitations, une augmentation de leurs tailles, et une diminution du nombre de variétés cultivées au profit d'idéotypes à haut rendement et résistants aux maladies. Du fait de leur phénotype sans équivoque et de leur déterminisme génétique simple de type gène pour gène, ce sont le plus souvent **des résistances « totales »** dites **qualitatives**, qui ont été introduites dans les lignées de plantes cultivées et utilisées de façon quasi-systématique au champ (Quenouille et al., 2014). Le modèle zig-zag actuel, combiné aux paramètres populationnels régissant la création de diversité chez l'agent pathogène, peut rendre compte du contournement rapide des résistances.

La durabilité d'une résistance vis-à-vis d'un microorganisme phytopathogène dépend de trois critères biologiques :

Premièrement, **le potentiel adaptatif de l'agent pathogène** joue un rôle important (Ayme et al., 2007) et prend en compte deux critères principaux qui sont : (i) la **notion de fréquence de mutations** permettant la création de nouveaux allèles, (ii) la **notion de flux de gènes** suite aux migrations des agents pathogènes, et enfin (iii) le **mode de reproduction** qui, s'il est sexué, privilégie l'apparition de combinaisons alléliques favorables, alors que le mode de reproduction asexuée permet l'augmentation de la fréquence des individus possédant ces combinaisons alléliques favorables. Dans une moindre mesure, la **dérive génétique** qui, dans des populations à effectif limité, conduit à la disparition de certains allèles dans la population est aussi à prendre en compte.

Le deuxième critère est le coût sur la valeur adaptative ou « fitness » de l'agent pathogène qu'engendre le nombre de mutations nécessaires pour contourner la résistance de la plante. En effet, plus le coût associé à ces mutations aura un impact sur la valeur adaptative de l'agent pathogène, plus la résistance associée à ce gène sera durable (Vera Cruz et al., 2000; Leach et al., 2001; Thrall and Burdon, 2003; Montarry et al., 2010).

Enfin, la durabilité d'une résistance dépend également de la **pression de sélection que va engendrer cette résistance sur l'agent pathogène**. Ainsi, la sélection naturelle qui s'applique sur une population dans un environnement donné, entraîne une augmentation de la fréquence des individus possédant une mutation favorable dans cet environnement.

Pour ces raisons, plusieurs auteurs ont avancé deux hypothèses permettant d'expliquer la plus grande durabilité des résistances quantitatives (Parlevliet, 2002; Palloix et al., 2009; Roux et al., 2014; Brun et al., 2010) : (i) **leur caractère polygénique** implique qu'un agent pathogène doit combiner un plus grand nombre de mécanismes (mutations, créations d'effecteurs) dans son génome pour contourner ces résistances (Figure 22) ; (ii) **les résistances quantitatives se caractérisent par une réduction de symptômes plutôt qu'une absence**. La pression de sélection ainsi exercée sur l'agent pathogène est plus faible que lors d'une résistance qualitative, ce qui permettrait de réduire le risque d'émergence de mutant virulent dans la population. De plus, alors que les résistances qualitatives reposent principalement sur l'activation de mécanismes de défense, suite à la reconnaissance des agents pathogènes, les résistances quantitatives reposeraient aussi sur des mécanismes préformés (telles que les barrières physiques) plus compliqués à contourner et entraînant : (i) une augmentation du temps de latence des agents pathogènes (temps entre l'infection et la production de tissus contagieux avec production d'inoculum), (ii) une diminution de l'efficacité d'infection et de colonisation, ainsi (iii) qu'une inhibition des mécanismes de dissémination (Pariaud et al., 2009; Roux et al., 2014). Ces hypothèses concordent avec le modèle développé par Janzac *et al.* (2009) qui prédit que la durabilité d'une résistance dépend du mode d'interaction (direct ou non) entre les protéines de virulence de l'agent pathogène et les protéines de résistance de la plante. Néanmoins, les agents pathogènes peuvent eux aussi s'adapter aux résistances quantitatives qui finissent par sélectionner des isolats plus agressifs comme cela a été rapporté dans plusieurs pathosystèmes tels que la pomme de terre/*Ph. Infestans* (Montarry et al., 2006; Andrivon et al., 2007), ou le blé/*Mycosphaerella graminicola* (Cowger and Mundt, 2002).

Des études visant à augmenter la durabilité des résistances qualitatives proposent différents

modèles, tous basés sur l'utilisation de plusieurs d'entre elles associées dans le temps (lors des rotations de culture), dans l'espace (à l'échelle du paysage ou de la parcelle) ou au sein d'un même génotype (pyramidage) (Wolfe, 1985; McDonald and Linde, 2002; Mundt et al., 2002; Pink, 2002). Il a également été montré qu'il était possible d'augmenter la durabilité des résistances qualitatives en les associant à des résistances quantitatives au sein d'un même génotype (Palloix et al., 2009; Brun et al., 2010). En 2014, Quenouille *et al.* ont montré que la durabilité de l'allèle *pvr2³* qui induit la résistance du piment *Capsicum annuum* au *Potato virus Y* (PVY) est positivement corrélée à la présence d'allèles de résistance quantitative dans le fond génétique de la plante. Cette étude discute des compromis qui existent entre : (i) la forte pression de sélection résultant de cet assemblage de résistances, (ii) la durabilité de cette résistance, et (iii) le spectre d'hôte visé dans cette association de résistances.

Les auteurs suggèrent qu'au cours de la sélection agronomique, une combinaison de loci quantitatifs ayant des effets mineurs sur la résistance pourrait résoudre ce compromis et ainsi augmenter sa durabilité (Quenouille et al., 2014).

Récemment, un effecteur de type RxLR (voir IV-II-1. De l'introduction générale) a été impliqué dans la reconnaissance d'un gène de la pomme de terre conférant une résistance quantitative détectée uniquement au champ, ce qui semblerait étendre le rôle des effecteurs RXLR aux résistances quantitatives (Rietman et al., 2012).

Ces études montrent l'importance qu'il peut y avoir à étudier plus précisément les déterminants moléculaires des interactions plantes-agents pathogènes, et en particulier celles sur des oomycètes, responsables de nombreux contournements de résistances végétales, afin d'adopter des méthodes de lutttes durables intégrant au sein des pratiques culturales une utilisation intelligente des résistances génétiques.

V. Les oomycètes pathogènes des plantes.

V.A. Les oomycètes.

Les oomycètes ont été pendant longtemps confondus avec les champignons à cause de leur développement sous forme d'hyphes, mais il est maintenant établi que de nombreuses différences physiologiques existent entre les deux groupes de microorganismes. En particulier, la paroi est majoritairement composée de cellulose chez les oomycètes et de chitine chez les champignons, et les zoospores des oomycètes sont mobiles grâce à la présence de deux flagelles (Lee et al., 2012). La segmentation des hyphes par des *septa* a longtemps été un critère pour différencier les champignons des oomycètes. Cependant, on sait aujourd'hui que, contrairement aux champignons du genre ascomycètes qui présentent des cellules septées, le groupe des glomeromycètes produit, comme les oomycètes, des hyphes non-septés. Ce sont finalement des études phylogénétiques qui ont permis de montrer que les oomycètes appartiennent au groupe des Stramenopiles et seraient donc plus proches des algues brunes que des champignons (Lee et al., 2012)(Figure 23 A).

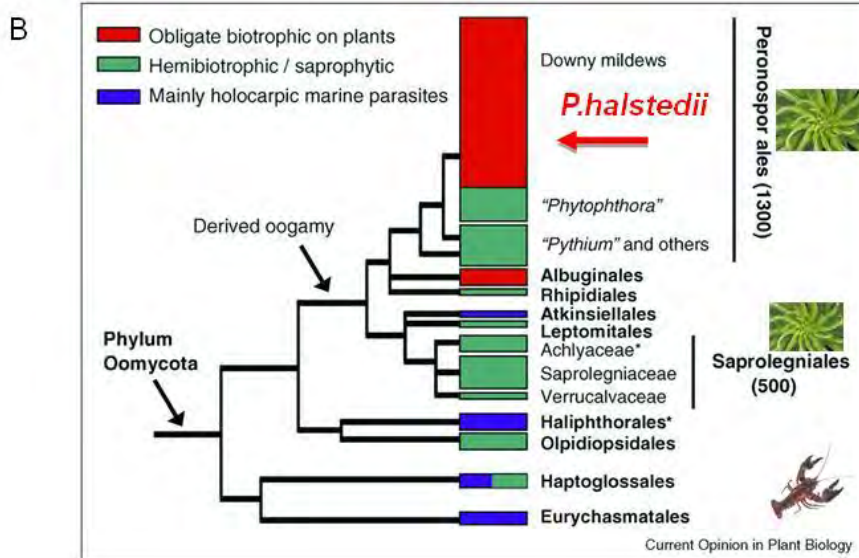
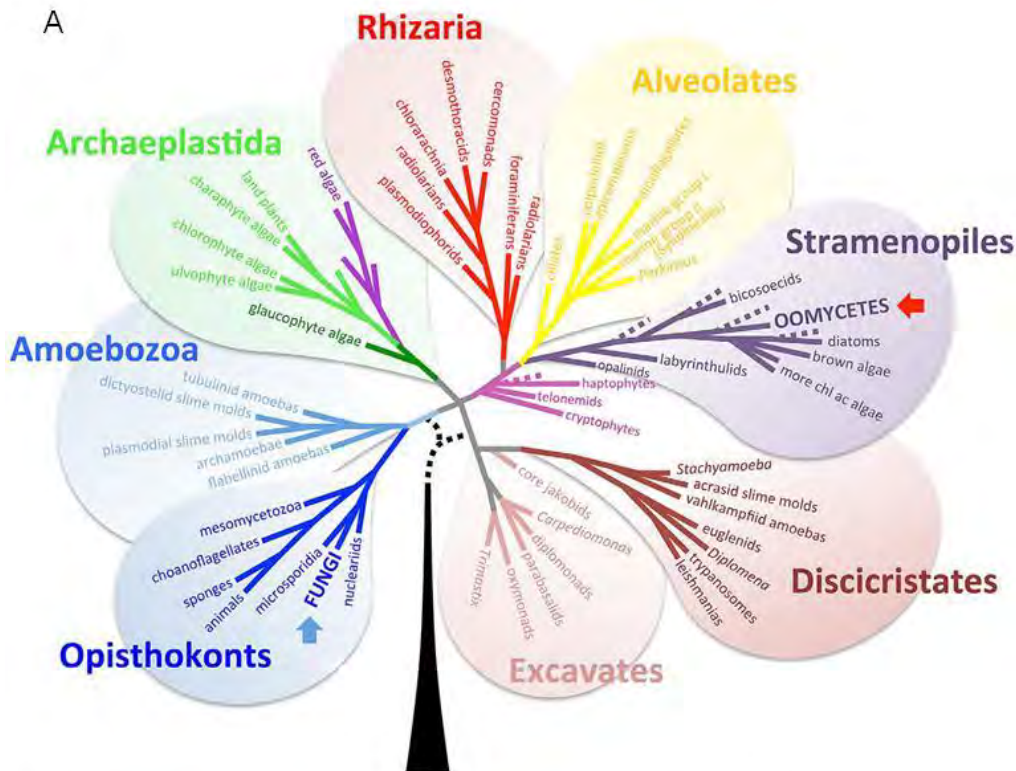


Figure 23: Arbre du vivant plaçant les oomycètes au sein du règne des Stramenopiles (A). Classification de l'ensemble des oomycètes basée sur leur histoire évolutive. Les noms entre guillemets indiquent les taxons ayant besoin d'une révision taxonomique. Ceux n'étant pas encore officiellement décrits sont marqués d'un astérisque. Les nombres d'espèces sont indiqués à droite entre parenthèses pour les deux plus grands groupes d'oomycètes. En bas de l'arbre (rectangles bleus), on trouve des oomycètes pathogènes d'animaux (B).

Le tournesol, comme la plupart des plantes est, tout au long de son développement, au contact de microorganismes pathogènes tels que des nématodes, des champignons, des bactéries, des virus et des oomycètes. Au sein du groupe des oomycètes, on compte un grand nombre d'agents pathogènes de plantes (*Ph. Infestans*) et d'animaux (*Saprolegnia parasitica*, van den Berg et al., 2013) qui tirent leurs nutriments de leurs hôtes sans que ces derniers n'en tirent aucun bénéfice (Thines and Kamoun, 2010; Figure 23B). De plus, leur résistance aux méthodes de luttés chimiques et génétiques les classe parmi les microorganismes les plus dommageables pour les plantes et ce, quel que soit leur mode de vie. En effet, on distingue trois types de modes de vie parmi les oomycètes phytopathogènes : (i) le mode de vie biotrophe lorsque les oomycètes ont besoin de leurs hôtes en vie pour réaliser leur cycle de développement complet, (ii) le mode de vie nécrotrophe dans lequel les oomycètes se nourrissent de leurs hôtes dont ils ont provoqué la mort, et (iii) les oomycètes hémibiotrophes qui débutent leur cycle de développement par une phase biotrophe et le finissent par une phase nécrotrophe (Figure 23B).

De nombreuses études portent sur les oomycètes phytopathogènes et sur la résistance de leurs hôtes. C'est ainsi qu'un pathosystème modèle a été développé entre *A. thaliana* et l'oomycète biotrophe obligatoire *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Coates and Beynon, 2010). Pour des raisons économiques, d'autres oomycètes sont le sujet d'études visant à mieux comprendre l'interaction avec leurs hôtes, tels que l'hémibiotrophe *Ph. infestans*, l'agent pathogène de la pomme de terre à l'origine d'une grande famine qui a fait près d'un million de victimes au 19^{ème} siècle en Irlande, et *Plasmopara viticola* qui cause d'importants dégâts sur la vigne (Gessler et al., 2011).

Le premier effecteur cloné d'oomycète est ATR13, par clonage positionnel chez l'espèce modèle *H. arabidopsidis*. Il correspond au produit du gène d'avirulence reconnu par la protéine de R d'*A. thaliana* RPP13 (Allen et al., 2004). La caractérisation de plusieurs gènes AVR a ensuite conduit à la détermination de motifs conservés entre eux (Rehmany et al., 2005). Ces dernières années, le séquençage des génomes de plusieurs oomycètes a conduit à des inventaires exhaustifs d'effecteurs potentiellement cytoplasmiques groupés en deux classes principales : les RXLR et les CRN (Tyler et al., 2006; Haas et al., 2009; Kunjeti et al., 2012; Lamour et al., 2012; Stam et al., 2013b; Baxter et al., 2010; Stassen et al., 2012; Links et al., 2011; Kemen et al., 2011; Lévesque et al., 2010).

V.B. Les effecteurs cytoplasmiques des oomycètes : les CRN et les RxLR

V.B.1. Les Crinklers (CRN).

Les **Crinkler (CRN)**, ainsi nommés par leur propriété à induire des phénotypes « plissés » et nécrotiques après expression transitoire par agro-infection, ont été observés pour la première fois chez *Ph. infestans* (Torto et al., 2003). Ces protéines constituent la première classe d'effecteurs cytoplasmiques identifiés chez les oomycètes. Ils portent le motif Leucine-x-Leucine-Phénylalanine-Leucine-Alanine-Lysine (**LxLFLAK**) nécessaire et suffisant pour la translocation de ces protéines de l'espace apoplastique vers le cytoplasme de la cellule végétale par le biais de mécanismes encore mal connus (Schornack et al., 2010). De plus, le motif LxLFLAK et le motif Histidine-Valine-Leucine-Histidine(x3)-Proline (**HVLVVVP**) qui le suit ont été montrés comme potentiellement importants pour la recombinaison entre CRN (Haas et al., 2009).

V.B.2. Les RxLRs.

Chez les oomycètes phytopathogènes, les premiers effecteurs de type RxLR à avoir été clonés sont : ATR13 et ATR1 chez *H. arabidopsidis* (Allen et al., 2004; Rehmany et al., 2005), Avr1b-1 chez *Ph. sojae* (Shan et al., 2004), et Avr3a chez *Ph. infestans* (Armstrong et al., 2005). L'alignement de leurs séquences protéiques a permis l'identification du motif conservé en acides aminés Arginine-x-Leucine-Arginine (RxLR, x étant un acide aminé quelconque), suivi parfois du motif Aspartate-Glutamate-Glutamate-Arginine (dEER) (Rehmany et al., 2005; Tyler et al., 2006). Néanmoins certains effecteurs chez les oomycètes *Ps. Cubensis*, *A. laibachii*, et *H. arabidopsidis* semblent utiliser des motifs protéiques de type RxLQ, RxLG, ou QxLR (Cabral et al., 2011; Kemen et al., 2011; Tian et al., 2011).

RxLR-dEER est un motif suffisant pour la translocation des effecteurs à l'intérieur du cytoplasme de la cellule végétale, impliquant une endocytose qui serait liée aux radeaux lipidiques de la cellule végétale (Whisson et al., 2007; Kale et al., 2010; Petre and Kamoun, 2014). La recherche de ce

motif dans les protéines prédites sécrétées des génomes séquencés d'oomycètes a permis l'identification d'un grand nombre d'effecteurs RXLR putatifs allant de 26 chez *A. candida* à 563 chez *Ph. Infestans* (Figure). AVR3a, découvert chez *Ph. infestans*, est l'un des RxLR les mieux caractérisés. Son rôle fonctionnel est la stabilisation de CMPG1, une E3 ligase de l'hôte, supprimant ainsi la mort cellulaire programmée (réponse hypersensible) induite par la perception du PAMP INF1 (infestine 1) chez *Nicotiana benthamiana* (Bos et al., 2010b, 2006) (Figure 21). AVR3a est également capable d'induire une réponse hypersensible chez les plantes qui portent le gène de résistance correspondant R3a (Bos et al., 2006).

V.B.3. *Domaine C-terminal des effecteurs cytoplasmiques d'oomycètes.*

Faisant suite au domaine conservé qui a permis de les caractériser, les effecteurs CRN et RxLR possèdent un domaine variable en région C-terminale du motif HVLVVVP et dEER respectivement (Figure A). Ce domaine, parfois reconnu par la plante, pourrait jouer un rôle dans la suppression de l'immunité végétale. Chez les CRNs de *Ph. infestans*, 36 domaines variables C terminaux conservés et 8 domaines uniques ont été décrits (Haas et al., 2009; Figure 25B). La sur-expression de ces effecteurs chez *N. benthamiana* peut induire des réactions nécrotiques chez les plantes présentant le gène de résistance correspondant (Haas et al., 2009). Stam et al., en 2013 montrent la diversité des domaines C terminaux chez *Phytophthora capsici* et les fonctions qui peuvent y être associées. Les effecteurs du type CRN et RxLR semblent être spécifiques du groupe des oomycètes, tout particulièrement les CRN qui seraient des effecteurs ancestraux apparus avant les RxLR au cours de l'évolution car ils sont présents chez l'ensemble des oomycètes étudiés contrairement aux RxLR (Figure) (Hein et al., 2009; Haas et al., 2009; Fabro et al., 2011; Links et al., 2011; Schornack et al., 2010).

V.B.4. *Autres effecteurs cytoplasmiques d'oomycètes.*

Une troisième famille d'effecteurs potentiellement cytoplasmiques a été identifiée au sein du génome de l'oomycète *Albugo laibachii*. Ces protéines présentent un peptide signal et un motif Cystéine-Histidine-x-Cystéine (**CHxC**, x acide aminé quelconque) en partie N-terminale (Kemen et al., 2011). Aujourd'hui ces effecteurs n'ont été décrits chez aucun autre oomycète et leur fonction

reste inconnue. Cependant cette classe d'effecteurs serait sous sélection positive (Kemen et al., 2011).

Oomycète	RxLR-EER putatif	CRN putatif	Haustoria	Publication du génome
<i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i>	134	20	oui	Baxter <i>et al.</i> , 2010
<i>Phytophthora capsici</i>	146	84	oui	Stam <i>et al.</i> , 2013
<i>Phytophthora infestans</i>	563	196	oui	Haas <i>et al.</i> , 2009
<i>Phytophthora ramorum</i>	309	19	oui	Tyler <i>et al.</i> , 2006
<i>Phytophthora sojae</i>	335	100	oui	Tyler <i>et al.</i> , 2006
<i>Pythium ultimum</i>	non	26	non	Lévesque <i>et al.</i> , 2010
<i>Albugo candida</i>	26	6	oui	Kemen <i>et al.</i> , 2011
<i>Aphanomyces euteiches</i>	non	Yes	non	-

Figure 24 : État des lieux des effecteurs putatifs RxLR et CRN identifiés chez les oomycètes à partir de données de séquençages génomiques.

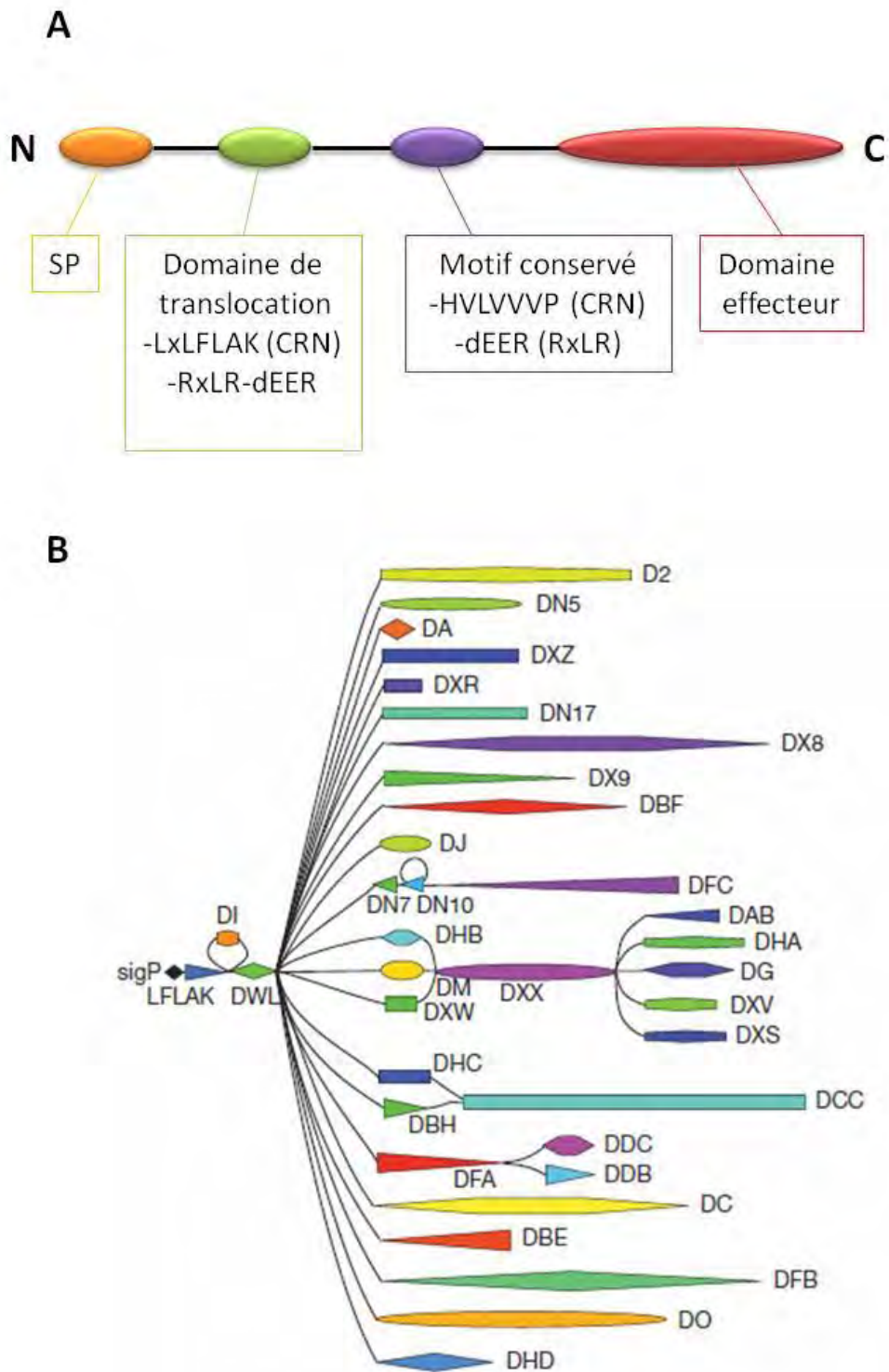


Figure 25 : (A) Schéma représentant la structure globale des effecteurs d'oomycètes. Signal peptide (SP). (B) Représentation de la diversité des domaines C-terminaux des effecteurs CRN identifiés chez *Ph. infestans*, *Ph. sojae*, et *Ph. Ramorum* (Haas et al., 2009).

Nous avons identifié ces motifs au sein de peptides putatifs chez *P. halstedii* (Cf Chapitre III).

VI. L'oomycète responsable du mildiou du tournesol, *Plasmopara halstedii* (voir aussi Chapitre I).

P. halstedii est un microorganisme phytopathogène du tournesol. Il fait partie des 800 espèces d'oomycètes responsables de symptômes regroupés sous le terme de « pourriture molle » (« downy mildew » en anglais) telle que l'oomycète modèle *H. arabidopsidis* qui attaque *A. thaliana* (Coates and Beynon, 2010). Le groupe des « downy mildews » comprend 146 espèces de *Plasmopara*, dont *Plasmopara viticola* agent pathogène de la vigne et *P. halstedii*, qui font partie de l'ordre des Peronosporales, au même titre que le groupe des « late blight phytophthora ».

VI.A. Cycle de développement de *P. halstedii* (Cf Chapitre I).

P. halstedii a un cycle de vie dont la complexité se matérialise par : (i) une infection au niveau des racines ou au niveau des feuilles, (ii) une grande variété de structures d'infection et de dissémination mises en place par l'agent pathogène. Dans cette partie nous allons résumer les aspects importants du cycle de vie de *P. halstedii* qui sont décrits plus en détail dans le chapitre I.

VI.A.1. Infection racinaire (dite infection primaire).

Au printemps, l'infection du tournesol par *P. halstedii* se fait principalement par la mise en place d'une structure de pénétration appelée **appressorium** au niveau de la racine des jeunes plantules de tournesol (Figure A). Néanmoins, nous avons mis en évidence durant mes travaux de thèse que *P. halstedii* pénètre également par d'autres moyens dans les tissus racinaires (Chapitre I).

VI.A.2. Progression dans la plante.

Après pénétration dans les racines des jeunes plantules de tournesol, l'agent pathogène progresse dans les tissus sous forme d'hyphes intercellulaires. *P. halstedii* met en place dans les cellules de la plante une structure d'infection/nutrition appelée *haustorium* qui joue un rôle important dans la virulence de l'agent pathogène permettant la sécrétion des effecteurs.

VI.A.3. Dissémination.

Dans des conditions de forte humidité et de température modérée favorables à la dissémination de *P. halstedii*, des structures adaptées appelées zoosporangiophores sont visibles à la surface (inférieure initialement) des cotylédons et des feuilles. Ces structures branchées portent des zoosporanges qui produisent et libèrent des zoospores asexuées (Chapitre I).

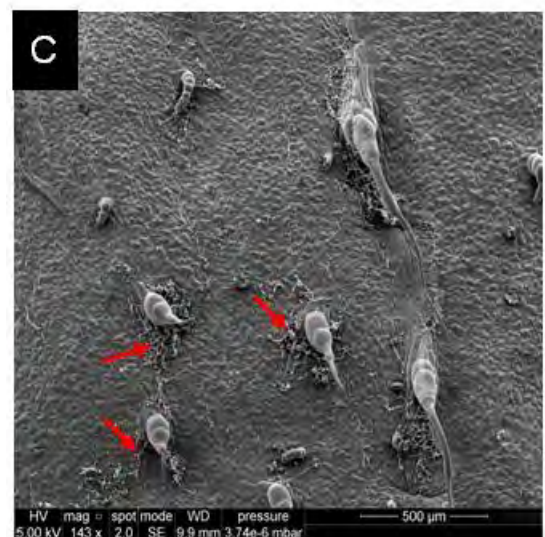
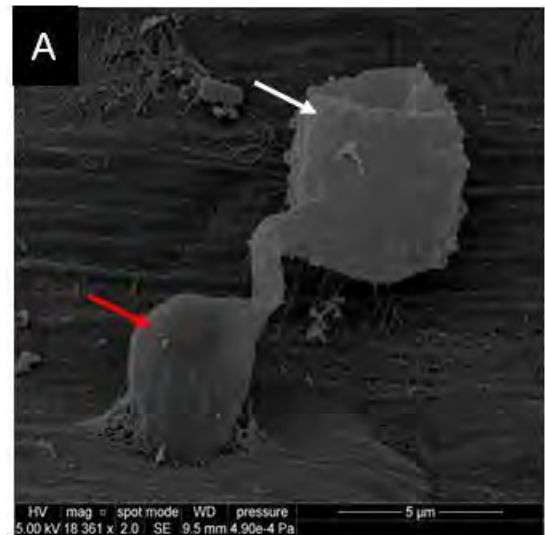
VI.A.4. Infection foliaire (dite infection secondaire).

P. halstedii est également capable d'infecter la plante au niveau de ses parties aériennes, notamment les feuilles plus tard dans la saison (Figure B et Figure C). Cette infection foliaire est aussi appelée infection secondaire. Dans ce cas nous avons observé un mécanisme unique de pénétration dans les tissus de la plante par la mise en place d'un **appressorium** au niveau des jonctions intercellulaires (Figure B). Ce résultat diffère de ceux trouvés chez *Plasmopara viticola* qui pénètre dans la vigne par les stomates à la surface des feuilles (Díez-Navajas et al., 2007; Kiefer et al., 2002).

VI.A.5. Systèmes de reproduction.

P. halstedii est un organisme homothallique (organes reproducteurs mâles et femelles portés par le même thalle) doué de reproduction sexuée et asexuée entre des organes reproducteurs provenant du même individu ou d'individus distincts. Ces modes de reproduction favorisent le brassage génétique entre isolats.

Figure 26: Photos prises en microscopie électronique à balayage (MEB). (A) Spore germée (flèche blanche) avec formation d'un appressorium (flèche rouge) sur une racine de tournesol. (B) Spore germée (flèche blanche) avec formation d'un appressorium (flèche rouge) sur une feuille de tournesol. (C) Regroupement des spores autour des trichomes lors d'une infection foliaire de tournesol (flèche rouge).



VI.B. Résistance génétique du tournesol aux pathotypes de *P. halstedii*.

Durant de nombreuses années, la présence de *P. halstedii* sur les terres cultivées a été un frein important au développement de la culture du tournesol jusqu'à l'introgession du premier gène de résistance au mildiou *PI* 1 chez le tournesol. Aujourd'hui, deux types de résistances sont identifiés : les résistances qualitatives et les résistances quantitatives.

VI.B.1. Les résistances qualitatives.

Des résistances qualitatives dite totales contre certains pathotypes de *P. halstedii* sont conférées par les **loci *PI*** (Dussle et al., 2004; Radwan et al., 2003; Bouzidi et al., 2002; Vincourt et al., 2012). Parmi eux, quatre loci *PI* ont été localisés dans des régions génomiques complexes, riches en gènes de type TIR-NBS-LRR ou CC-NBS-LRR qui pourraient être impliqués dans la reconnaissance de l'agent pathogène (Bouzidi et al., 2002; Radwan et al., 2003, 2004, 2008). Cependant, aucun gène *PI* n'a encore été cloné et les mécanismes moléculaires de la résistance au mildiou chez le tournesol restent inconnus.

*VI.B.2. Classification des isolats de *Plasmopara halstedii* en pathotypes.*

Le regroupement des isolats *P. halstedii* en **pathotypes** se fait sur la base de leurs profils de virulence établis sur neuf lignées différentielles de tournesol portant chacune différents allèles de résistance au niveau des gènes de résistance *PI* (Chapitre I et Figure A). Ainsi, l'attribution d'un pathotype à un isolat de *P. halstedii* permet de représenter en partie son spectre d'hôte. Cette classification, basée sur des traits phénotypiques, permet de mettre en évidence l'apparition rapide de nouvelles virulences chez l'agent pathogène (Gulya et al., 1998, Tourvieille 2012).

A

Lignées différentiels de tournesol			Pathotypes de <i>Plasmopara halstedii</i>																
numérotation	Lignée de tournesol	Source de résistance génétique connue	100	300	304	304	307	314	330	334	700	703	704	707	710	714	717	730	774
			10	10	10	30	51	30	42	53	60	60	71	71	60	71	71	60	73
D1	Ha-304	No <i>PI</i> gene	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
D2	RHA-265	<i>PI1</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
D3	RHA-274	<i>PI2/PI21</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
D4	PM13	<i>PI_{PM3}</i>	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S
D5	PM17	<i>PI5</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S
D6	803-1	<i>PI5+</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
D7	HAR-4	<i>PI_{H5}</i>	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R	R
D8	QHP1	<i>PI1/PI_{H5}</i>	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R	R
D9	Ha-335	<i>PI6</i>	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S	S	R	S
D10	Y7Q	<i>PI6-</i>	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S	S	R	S
D11	PSC8	<i>PI2</i>	R	R	R	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
D12	XA	<i>PI4</i>	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
D13	PSS2RM	<i>PI6/PI21</i>	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	R	S	S	R	S
D14	VAQ	<i>PI5</i>	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S
D15	RHA419	<i>PI_{Arg}</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

B

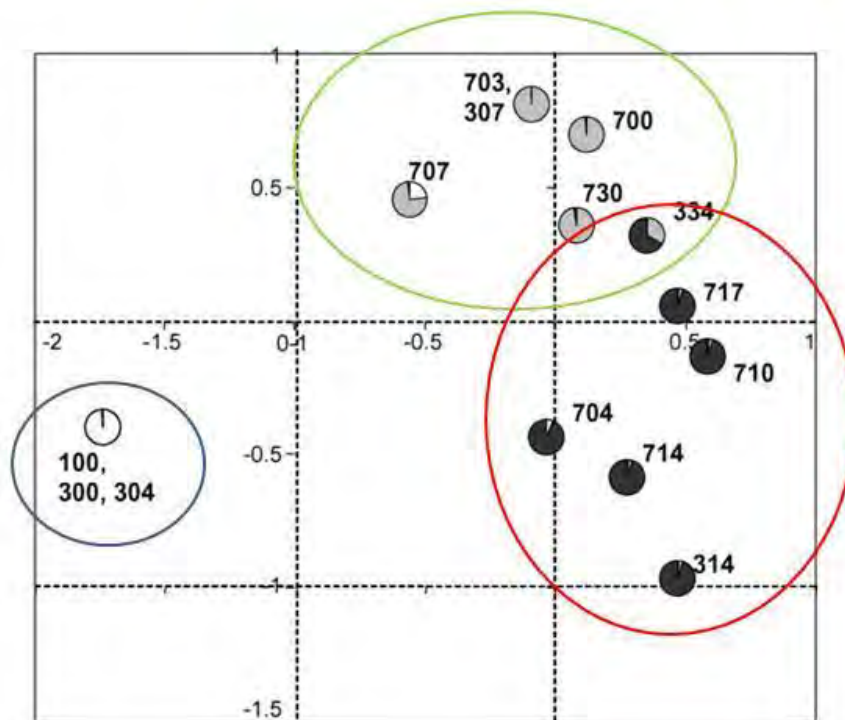


Figure 27 : (A) Profil de virulence des 16 pathotypes français et d'un pathotype américain (330 42) de *P. halstedii* (colonnes), sur les 15 hôtes différentiels (lignes) qui présentent différentes sources de résistance (3^{ème} colonne) (Gulya et al., 1998 ; Gulya et al., 2007; Delmotte et al., 2008; Tourvieille de Labrouhe et al., 2012). Explication des noms de pathotypes au chapitre 1 (B) ACP faite sur 22 isolats regroupant 14 races françaises à partir de 12 marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Ces analyses suggèrent l'existence de 3 groupes (ici en bleu, vert et rouge) parmi 14 pathotypes français (Delmotte et al., 2008; Ahmed et al., 2012).

VI.B.3. Les résistances quantitatives.

Une résistance de type quantitatif a été identifiée lors de la recherche d'une alternative plus durable aux résistances qualitatives, contre le pathotype 710 (Tourvieille de Labrouhe et al., 2008) (Cf IV.D. de l'introduction générale). Au sein de la population de lignées recombinantes RIL XRQ*PSC8, cette résistance contre le pathotype 710 a été associée à trois QTLs, parmi lesquels QRM1 (Quantitative Resistance to Mildew), cartographié sur le groupe de liaison (LG) 10 et expliquant 65% de la variabilité (Vear et al., 2008; Vincourt et al., 2012).

Dans l'équipe, des Near Isogenic Lines (NILs) ont été développées afin de réaliser le clonage positionnel de QRM1 et éventuellement celui du gène de résistance qualitative PI5 (LG13 ; Chapitre I) qui confèrent la résistance au pathotype 710 de *P. halstedii*. Les lignées NIL QRM1 seront testées pour mesurer l'efficacité de cette résistance vis-à-vis d'autres pathotypes de *P. halstedii*.

VI.B.4. Contournement des résistances génétiques et apparition de nouveaux pathotypes.

L'utilisation quasi systématique de certains gènes de résistance qualitatifs chez les variétés cultivées de tournesols est en partie responsable de la forte pression de sélection sur l'agent pathogène, aboutissant à leur contournement rapide. Ceci est suggéré par l'augmentation rapide du nombre de pathotypes de *P. halstedii* durant ces vingt dernières années en France passant d'un pathotype en 1997, à seize en 2012 ((Delmotte et al., 2008); Moinard et al., 2006 ; CETIOM). Cette augmentation est accompagnée dans certaines régions d'un accroissement du taux de parcelles atteintes. Par exemple dans le sud-ouest de la France, malgré l'utilisation de gènes de résistance dans les variétés de tournesol cultivé, la présence de mildiou est passée de 8% des parcelles atteintes en 2011 à 41% en 2013 en raison d'un printemps pluvieux favorable à la réussite de l'infection. Cependant, cette donnée ne rend pas compte du pourcentage de plantes atteintes par parcelle, donnée importante dans la mesure où, si le taux d'infection d'une parcelle est trop

important, la culture du tournesol doit y être abandonnée.

La diversification importante des isolats de *P. halstedii* pourrait être associée, pour partie à l'importation de nouveaux pathotypes dans le cadre du commerce international des semences, et pour partie à des croisements entre des isolats issus de trois groupes résultant d'introductions indépendantes de *P. halstedii* en France (Figure B, Delmotte et al., 2008). Ces pathotypes se seraient alors diversifiés grâce à l'évolution rapide de leur virulence sous l'effet de la pression de sélection exercée par les gènes de résistance déployés au sein des variétés cultivées (Delmotte et al., 2008; Ahmed et al., 2012).

Cette progression rapide de la maladie en France remet en cause la durabilité des résistances génétiques identifiées et nous amène à nous interroger sur les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette évolution.

VI.C. Les effecteurs de *P. halstedii*.

Lorsque j'ai commencé ces travaux de thèse en 2011, l'étude du contenu en effecteurs du pathogène *P. halstedii* venait juste de débiter avec une analyse transcriptomique à haut débit effectuée sur des lignées de tournesol résistantes et sensibles, infectées par le pathotype 710. Cette étude a conduit à la création d'un portail bio-informatique HP (<http://www.heliagene.org/HP>), comprenant 25 381 nouveaux clusters dont environ 580 prédits comme provenant de *P. halstedii*, et non du tournesol (As-sadi et al., 2011). A partir de ces données, cinq RXLR et quinze CRN putatifs ont été identifiés pour la première fois chez *P. halstedii* par une analyse PSI-BLAST. Les polymorphismes de ces effecteurs ont été analysés en comparant leurs séquences transcrites chez quatre pathotypes de *P. halstedii* (100, 304, 703, 710). Sept des quinze CRN putatifs sont polymorphes avec 45 polymorphismes nucléotidiques uniques (Single Nucleotide Polymorphism ou SNP) dont 22 conduisent à des changements d'acides aminés dans les protéines prédites. Aucun des cinq effecteurs de type RXLR n'a montré de polymorphisme (As-sadi et al., 2011).

Tandis que, jusqu'à présent, les études de cette interaction portaient principalement sur le tournesol et les mécanismes conduisant à sa résistance (gènes *Pl*, résistance variétale...), ces premiers résultats montrent l'intérêt d'étudier plus en détail les mécanismes moléculaires conditionnant la virulence de l'agent pathogène.

VII. Objectifs et plan de la thèse :

Notre équipe a décrit pour la première fois chez *P. halstedii* l'existence de protéines de type effecteurs jouant chez d'autres oomycètes un rôle clé dans la virulence des agents phytopathogènes (As-sadi et al., 2011). Nous faisons donc l'hypothèse que ces protéines jouent un rôle majeur dans la virulence de *P. halstedii* et peut-être aussi dans l'évolution rapide de cette virulence se traduisant par le contournement des principaux gènes de résistance. Si tel est le cas, l'étude des effecteurs candidats de *P. halstedii* (appelés effecteurs dans la suite du manuscrit) est un préalable à la mise en place d'une lutte plus durable contre la maladie : (i) en permettant d'identifier de nouvelles résistances chez la plante, mais aussi à terme, (ii) en définissant des stratégies de résistance plus durables permettant de prévenir l'apparition de nouveaux pathotypes virulents par des associations de résistances génétiques couplées à une conduite de culture adaptée.

Dans ce contexte, l'objectif à long terme de ce travail est de mieux comprendre le rôle des effecteurs dans l'adaptation de *P. halstedii* à son hôte, le tournesol, se traduisant par l'évolution constante de la virulence de l'agent pathogène. Cela suppose dans un premier temps l'identification d'effecteurs clés, responsables de la virulence de *P. halstedii*, par différentes stratégies basées notamment sur l'analyse de leur variabilité au sein de plusieurs pathotypes et sur leur étude fonctionnelle *in planta*. Ces études ont été amorcées au cours de ce travail de thèse.

Les résultats de la thèse seront présentés en trois chapitres :

Chapitre I : De meilleures connaissances des modes d'infection et de colonisation de *P. halstedii* dans la plante s'avéraient nécessaires pour étudier par la suite le rôle des effecteurs dans la virulence de *P. halstedii*. Nous avons rassemblé dans une revue les travaux publiés sur le mildiou du tournesol, ainsi qu'une étude cytologique réalisée durant ma thèse et concernant la description détaillée de l'interaction entre le pathotype 710 de *P. halstedii* et deux lignées quasi-isogéniques de tournesol l'une résistante et l'autre sensible à ce pathotype.

Chapitre II : Pour étudier l'impact du polymorphisme des effecteurs dans la virulence de *P. halstedii* nous avons identifié 54 effecteurs putatifs de type CRN et RXLR à partir de données d'études transcriptomiques, et analysé leur polymorphisme chez 7 pathotypes de *P. halstedii* dont les génomes ont été séquencés. Le polymorphisme inter et intra pathotype de 22 marqueurs moléculaires basés sur des effecteurs polymorphes est analysé parmi 35 isolats correspondant à 14 pathotypes de *P. halstedii*. Il permet de proposer une méthode de discrimination de 10 pathotypes de *P. halstedii* basée sur la PCR et met en lumière la complexité de l'interaction entre *H. annuus* et *P. halstedii*. Le chapitre 2 inclut un manuscrit prêt à être soumis pour publication.

Chapitre III : A partir des données génomiques obtenues durant ma thèse, un inventaire des effecteurs putatifs du pathotype 710 de *P. halstedii* a été réalisé. Afin d'étudier le rôle fonctionnel de ces effecteurs, nous avons en parallèle mis au point une méthode d'expression transitoire *in planta* par agro-infection dans les feuilles de tournesol. Cette méthode a permis la localisation subcellulaire de 6 effecteurs ainsi que la mise en évidence pour 4 effecteurs d'induction de nécroses chez un génotype de tournesol résistant, candidats potentiels pour être des gènes d'avirulence de *P. halstedii*.

Chapitre I: Modes d'infection, de colonisation et de dissémination de *Plasmopara halstedii*, l'oomycète biotrophe obligatoire responsable du mildiou chez *H. annuus*.

I. Contexte.

En débutant cette thèse, il nous est apparu que les références existantes ne prenaient pas suffisamment en compte les nouvelles données sur les Oomycètes, notamment, les modes d'infection et de colonisation de *P. halstedii* chez le tournesol. Ces connaissances sont pourtant nécessaires pour évaluer précisément la virulence de l'oomycète. Les articles décrivant le pathosystème étaient anciens, peu accessibles et présentaient des résultats parfois contradictoires. La plupart de ces publications se basaient en outre sur des observations comparant l'infection par *P. halstedii* chez des lignées de tournesol résistantes ou sensibles génétiquement éloignées.

Grâce à des observations en microscopie électronique à balayage (MEB) ou à transmission (MET) réalisées en collaboration avec Yves Martinez (plateforme d'imagerie TRI, Toulouse), nous sommes aujourd'hui en mesure de répondre plus précisément sur les modalités et cinétiques d'entrée de l'agent pathogène dans la plante dans le cadre d'une infection racinaire (dite primaire) ou foliaire (dite secondaire). Pour cela, nous avons comparé le développement de *P. halstedii* dans les tissus de deux génotypes de tournesol quasi-isogéniques utilisés au laboratoire car présentant un fond génétique proche et un comportement différentiel vis-à-vis du pathotype 710 de *P. halstedii* (TS sensible ; TSRM résistant, RM pour résistant au mildiou). En effet, la lignée TSRM a été développée par introgression (grâce à 5 rétrocroisements suivis d'autofécondations) du gène de résistance *PI5* (LG13) provenant de XRQ, chez la lignée TS sensible à tous les pathotypes de *P. halstedii*, (collaboration F. Vear, INRA Clermont-Ferrand).

Les résultats obtenus suite à ces observations mettent en lumière la complexité du cycle de vie de

P. halstedii. En effet, la capacité de cet agent pathogène à infecter et coloniser l'ensemble des tissus de la plante est expliquée en partie par la grande variabilité des mécanismes d'infection, de colonisation et de dissémination mis en place. Dans ce contexte nous avons regroupé au sein d'une publication de type revue dans *Molecular Plant Pathology*, un résumé des données physiologiques et moléculaires sur le pathosystème décrites dans la littérature ainsi que nos propres observations de microscopie réalisées sur un système d'infection en hydroponie développé au laboratoire.

L'ensemble de ces données permet de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors de l'interaction entre *P. halstedii* et le tournesol. Ses caractéristiques d'infection, sa capacité à attaquer une espèce d'intérêt agronomique et l'évolution rapide de sa virulence, font de ce biotrophe obligatoire un modèle biologique de grand intérêt pour de nouveaux investissements au niveau international.

II. Article 1: The sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*.

Pathogen profile

The sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*

QUENTIN GASCUEL^{1,2}, YVES MARTINEZ³, MARIE-CLAUDE BONIFACE^{1,2}, FELICITY VEAR⁴,
MAGALIE PICHON^{1,2} AND LAURENCE GODIARD^{1,2,*}

¹INRA, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR441, F-31326 Castanet-Tolosan, France

²CNRS, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM), UMR2594, F-31326 Castanet-Tolosan, France

³FR3450 CNRS, Pôle de Biotechnologie Végétale, BP42617, 31326 Castanet-Tolosan, France

⁴INRA, UMR 1095, Domaine de Crouelle, 234, Ave du Brezet, 63000 Clermont-Ferrand, France

SUMMARY

Downy mildew of sunflower is caused by *Plasmopara halstedii* (Farlow) Berlese & de Toni. *Plasmopara halstedii* is an obligate biotrophic oomycete pathogen that attacks annual *Helianthus* species and cultivated sunflower, *Helianthus annuus*. Depending on the sunflower developmental stage at which infection occurs, the characteristic symptoms range from young seedling death, plant dwarfing, leaf bleaching and sporulation to the production of infertile flowers. Downy mildew attacks can have a great economic impact on sunflower crops, and several *PI* resistance genes are present in cultivars to protect them against the disease. Nevertheless, some of these resistances have been overcome by the occurrence of novel isolates of the pathogen showing increased virulence. A better characterization of *P. halstedii* infection and dissemination mechanisms, and the identification of the molecular basis of the interaction with sunflower, is a prerequisite to efficiently fight this pathogen. This review summarizes what is currently known about *P. halstedii*, provides new insights into its infection cycle on resistant and susceptible sunflower lines using scanning electron and light microscopy imaging, and sheds light on the pathogenicity factors of *P. halstedii* obtained from recent molecular data.

Taxonomy: Kingdom Stramenopila; Phylum Oomycota; Class Oomycetes; Order Peronosporales; Family Peronosporaceae; Genus *Plasmopara*; Species *Plasmopara halstedii*.

Disease symptoms: Sunflower seedling damping off, dwarfing of the plant, bleaching of leaves, starting from veins, and visible white sporulation, initially on the lower side of cotyledons and leaves. *Plasmopara halstedii* infection may severely impact sunflower seed yield.

Infection process: In spring, germination of overwintered sexual oospores leads to sunflower root infection. Intercellular hyphae are responsible for systemic plant colonization and the induction of disease symptoms. Under humid and fresh conditions, dissemination structures are produced by the pathogen on all plant organs to release asexual zoosporangia. These zoosporangia play an important role in pathogen dissemination, as they release

motile zoospores that are responsible for leaf infections on neighbouring plants.

Disease control: Disease control is obtained by both chemical seed treatment (mefenoxam) and the deployment of dominant major resistance genes, denoted *PI*. However, the pathogen has developed fungicide resistance and has overcome some plant resistance genes. Research for more sustainable strategies based on the identification of the molecular basis of the interaction are in progress.

Useful websites: <http://www.heliagene.org/HP>, <https://www.heliagene.org/PlasmoparaSpecies> (soon available).

Keywords: effectors, *Helianthus annuus*, infection modes, life cycle, obligate biotroph oomycete, pathogen virulence, *Plasmopara halstedii*.

INTRODUCTION

Downy mildew (caused by *Plasmopara halstedii*) is one of the major diseases affecting sunflower (*Helianthus annuus*) production. The pathogen has been reported in most countries in which sunflowers are grown. The global impact on yield has been estimated recently to be 3.5% of commercial seed production in the presence of the control methods currently deployed, but loss of yield can be up to 100% in contaminated fields (Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains, <http://www.cetiom.fr>). In addition, sunflower cultivation has to be abandoned in fields too heavily contaminated by *P. halstedii*.

Sunflower, the fourth most widely grown oil crop in the world after oil palm, soybean and rapeseed, but second in the European Union, produces healthy oil rich in unsaturated fatty acids, and is regarded as a plant able to grow under low water input regimes, and with a limited addition of soil fertilizers and fungicides, in contrast with other oil crops. Total sunflower production has increased worldwide by 32% over the past 20 years, reaching 38 million tons in 2012, with an acreage of 23 million hectares (Food and Agriculture Organization).

*Correspondence: Email: Laurence.Godiard@toulouse.inra.fr

The pathogen *P. halstedii*, first identified in North America by Mr Byron D. Halsted, a botanist at the Bussey Institution (Harvard University) (Nishimura, 1922; Young and Morris, 1927), was later reported in Russia and Western Europe around 1960, where it was introduced probably via infected sunflower seeds (Ioos *et al.*, 2007). Since 1992, this pathogen has been submitted to quarantine regulation in the European Union. Thirty-six pathotypes of *P. halstedii*, often known as races, have so far been identified worldwide, mostly in zones in which sunflowers are widely grown: in North America, and in Europe, especially France, Spain, Germany, Ukraine and Russia. *Plasmopara halstedii* pathotypes are defined by an international nomenclature system based on differential virulence profiles on a set of sunflower inbred lines (Gulya *et al.*, 1998; Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2012).

During the last 20 years, new *P. halstedii* pathotypes showing increased virulence have appeared (Ahmed *et al.*, 2012), and several *Pl* resistance genes used in sunflower hybrids have become inefficient: for example, the *Pl2* gene conferring resistance to the most frequent pathotype has been overcome by different emerging pathotypes (Moinard *et al.*, 2006; Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2000). An understanding of pathotype evolution and sunflower resistance is therefore an agronomic issue.

Nevertheless, despite the economic importance of this crop pathogen, genomic resources for *P. halstedii* and, more generally, for pathogens of the genus *Plasmopara*, are limited. The aims of this review are to summarize our knowledge on the sunflower downy mildew pathogen, with a focus on infection and dissemination mechanisms, and to shed light on *P. halstedii* pathogenicity factors from recent molecular data.

PLASMOPARA HALSTEDII TAXONOMY AND REPRODUCTION

Plasmopara halstedii is a biotrophic oomycete belonging to the Peronosporales, the largest and most devastating group of plant-pathogenic oomycetes, which also includes the hemibiotrophs of the genus *Phytophthora*, causing late blight diseases, and an important group of obligate biotrophs causing downy mildews, such as *Plasmopara viticola* on grapevine and *Bremia lactucae* on lettuce (Gessler *et al.*, 2011; Michelmore and Wong, 2008; Thines and Kamoun, 2010). Eight hundred species responsible for downy mildews are grouped into 14 genera subdivided into four morphological and ecological subgroups. In subgroup II are included the genera *Basidiophora*, *Benua*, *Bremia*, *Paraperonospora*, *Plasmopara*, *Plasmoverna* and *Protobremia*, which produce vesicular to pyriform haustoria (Göker *et al.*, 2007). Unfortunately, *P. halstedii* was not among the eight *Plasmopara* species included in this study. All downy mildews are obligate biotrophic parasites that require a living plant host to accomplish their life cycle. Most, including *P. halstedii*, have not been successfully cultured *in vitro*.

One hundred and forty-six different *Plasmopara* species are listed in *Index Fungorum*. Few are phylogenetically related on the basis of large nuclear subunit ribosomal DNA sequences and other genes (Göker *et al.*, 2007; Riethmüller *et al.*, 2002). *Plasmopara* species cause downy mildew disease on various plants: *P. viticola* on grapevine, *P. umbelliferarum* on Umbelliferae, *P. geranii* and *P. pusilla* on geranium and *P. obducens* on impatiens. Seven species pathogenic on Ranunculaceae, originally referred to as *P. pygmaea*, but differing by morphological and molecular traits from all the other *Plasmopara* species, have been placed in the genus *Plasmoverna* (Constantinescu *et al.*, 2005). The origins of the species *P. halstedii* remain complex and mostly undetermined (cf. for review, Viranyi and Spring, 2011).

Plasmopara halstedii is a specialized pathogen which attacks several Asteraceae, including annual *Helianthus* species, e.g. *H. argophyllus*, *H. debilis* and *H. petiolaris*, and wild and cultivated forms of *H. annuus*, with strong impacts on sunflower yield. *Plasmopara halstedii* has been reported to infect other Asteraceae (*Bidens*, *Artemisia*, *Xanthium*), which could be potential reservoirs of inoculum.

In oomycetes, two types of sexual reproduction have been described: (i) homothallism, in which sexual reproductive cells (oogonia and antheridia) are produced by the same organism, which could lead to outcrossing or selfing in the absence of self-incompatibility mechanisms; and (ii) heterothallism, in which sexual reproductive cells are produced by two different organisms, leading only to outcrossing. *Plasmopara halstedii* is diploid, homothallic and has been shown to reproduce sexually and asexually in laboratory conditions (Spring, 2000; Spring and Zipper, 2006). Homothallic sexual reproduction has been shown to occur after the inoculation of sunflower seedlings with single zoospores (Spring, 2000; Spring *et al.*, 1998; Spring and Zipper, 2000). This is important for epidemiology as a single zoospore in a field can lead to the contamination of soil with oospores, the survival forms of the inoculum. The sexual phase is thus required to produce overwintering oospores, but asexual generations occurring during the sunflower growing season from spring to the end of summer are also important in disease propagation.

Genotypic analysis provided by Ahmed *et al.* (2012) suggested that reproduction is predominantly by selfing in wild *P. halstedii* French populations, but this did not prevent the emergence of new virulence (Intelmann and Spring, 2002). Reduced genetic variation and increased linkage disequilibrium have been shown to occur within French *P. halstedii* populations compared with mostly heterothallic *Phytophthora infestans* and *P. viticola* (Delmotte *et al.*, 2006 2008; Grünwald and Flier, 2005). These results confirmed the hypothesis that *P. halstedii* wild populations are homothallic, and suggested the absence of a self-incompatibility mechanism, which thus allows selfing and outcrossing mating systems (Ahmed *et al.*, 2012). Spring and Zipper (2006) also provided evidence for genetic recombination through parasexual events.

PLASMOPARA HALSTEDII PATHOTYPES AND SUNFLOWER RESISTANCE GENES

Plasmopara halstedii populations have been thoroughly characterized and classified into pathotypes mainly in France (Ahmed *et al.*, 2012) and Germany (Rozynek and Spring, 2000). In France, 17 reference pathotypes have been defined according to their

virulence profiles when tested for the infection of differential hosts carrying different *Pl* resistance genes (Fig. 1; Gulya *et al.* 1998; Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2012). Fourteen of these pathotypes (defined by triplet name, Fig. 1) have been classified into three distinct clusters, according to 12 single nucleotide polymorphism (SNP) markers designed on *P. halstedii* expressed sequence tags (ESTs): cluster 1: 100, 300, 304; cluster 2: 307, 700, 703, 707, 730;

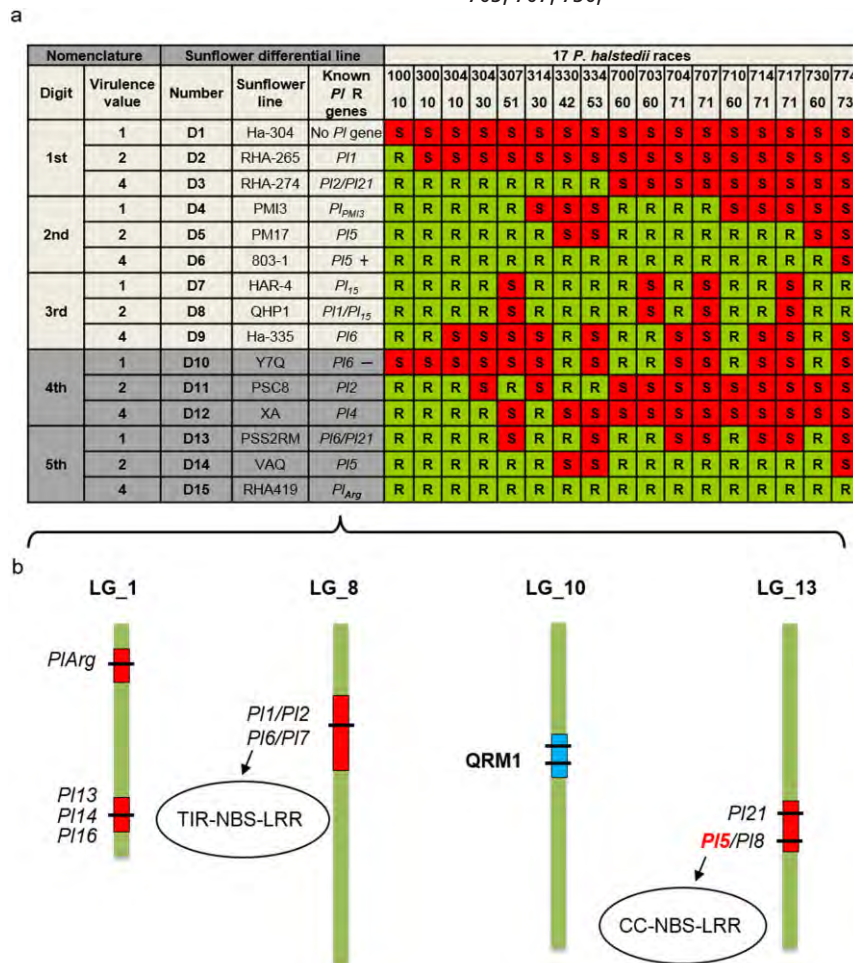


Fig. 1 Nomenclature of *Plasmopara halstedii* pathotypes and genetic map of sunflower resistance genes. (a) *Plasmopara halstedii* pathotypes were defined according to an international nomenclature based on the virulence profile of a given isolate on 15 sunflower differential lines (D1–D15) selected according to their resistance patterns (Gulya *et al.*, 1998; Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2012). Susceptibility (S) and resistance (R) were defined by the presence or absence of disease symptoms and sporulation on leaves 2–3 weeks after inoculation of sunflower root seedlings, grown in soil (Mouzeyar *et al.*, 1993). A triplet coding system was initially set up on nine sunflower lines (D1–D9, Gulya *et al.*, 1998), but the occurrence of new *P. halstedii* pathotypes led to the addition of six other sunflower lines (in dark grey) and to a five-digit coding system (D10–D15, Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2012). The phenotyping results on each triplet of sunflower differential lines give the pathotype digit values. If the first differential line of a set of three is susceptible, a value of ‘1’ is assigned to the pathotype. If the second line is S, a value of ‘2’, and, for the third line, a value of ‘4’. When the line is resistant, a value of ‘0’ is assigned to the pathotype. The virulence code is additive within each set. For example, virulence code 710 is explained by ‘7’ (S for D1–D3, 1 + 2 + 4 = 7); ‘1’ (S for D4) and ‘0’ (R for D7–D9). Dominant genes giving resistance to *P. halstedii* are called *Pl* genes. The known functional R genes are indicated in the sunflower differential lines. ‘+’ or ‘-’ after the *Pl* gene indicates the strength of resistance alleles. (b) Eleven sunflower *Pl* genes have been mapped on three of 17 sunflower linkage groups (LGs) (Bachlava *et al.*, 2011; Bouzidi *et al.*, 2002; Franchel *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2012; Mulpuri *et al.*, 2009; Radwan *et al.*, 2003; Vincourt *et al.*, 2012; Wieckhorst *et al.*, 2010). *Pl1/Pl2/Pl6* and *Pl7* are localized in a Toll/interleukin-1 receptor-nucleotide-binding site-leucine-rich repeat (TIR-NBS-LRR)-rich region. *Pl5/Pl8* and *Pl21* are localized in a coiled-coil (CC)-NBS-LRR-rich region. QRM1, the major quantitative trait locus (QTL), conferring a quantitative resistance to pathotype 710 of *P. halstedii*, was mapped on LG10 (Vear *et al.*, 2008b; Vincourt *et al.*, 2012).

and cluster 3: 314, 334, 704, 710, 714, 717 (Ahmed *et al.*, 2012; Delmotte *et al.*, 2008). These clusters could have resulted from three independent *P. halstedii* introductions into France, and intercluster recombinations could have facilitated the emergence of new pathotypes in response to host resistance (Ahmed *et al.*, 2012).

Two pathotypes showing new virulence profiles have been recorded more recently and can be differentiated by the addition of six further sunflower lines (Fig. 1a, dark grey rows), extending the pathotype nomenclature to a five-digit code (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2012) (Fig. 1). The addition of these six differential hosts was also a prospective approach aimed to improve the distinction of emerging pathotypes. Assuming a strong correlation between the two codes for a given pathotype, the triplet code is used in the rest of this article.

To avoid downy mildew attacks, modern sunflower cultivars carry one or more dominant resistance genes, denoted *PI*. *PI* genes originated mostly from wild *H. annuus*, but also from other *Helianthus* species (*H. argophyllus* and *H. tuberosus*) (Vear *et al.*, 2008a). More than 20 *PI* genes (*PI1*, *PI2*, *PI5–PI8*, *PI13–PI16*, *PI21*, *PI_{Arg}*; Fig. 1), conferring resistance to one or more pathotypes of *P. halstedii*, have been described, and 10 have been mapped in sunflower (Fig. 1b). *PI* genes are grouped into at least four complex genomic regions on three linkage groups (LGs). Toll/interleukin-1 receptor-nucleotide-binding site-leucine-rich repeat (TIR-NBS-LRR) and coiled-coil (CC)-NBS-LRR resistance gene analogues (RGAs) have been localized genetically to these regions (Fig. 1; Bouzidi *et al.*, 2002; Gentzbittel *et al.*, 1998; Radwan *et al.*, 2003, 2004, 2008), but no *PI* gene has yet been cloned. Quantitative resistance to pathotypes 710 and 703 of *P. halstedii* has been described in the sunflower line XRQ (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2008) and is conferred by three quantitative trait loci (QTLs) (Vear *et al.*, 2008b; Vincourt *et al.*, 2012). These QTLs have been mapped on LG10, LG8 and LG7 (Vincourt *et al.*, 2012). The major QTL, QRM1 (Fig. 1), explaining 65% of the variability, was mapped on LG10 in a genetic region of 0.8 cM (Vincourt *et al.*, 2012). A map-based cloning approach based on recombinant lines segregating only for QRM1 is underway in our group (As-Sadi, 2011; S. Muñoz LIPM, Castanet-Tolosan, France, personal communication).

MILDEW SYMPTOMS CAUSED BY *P. HALSTEDII* ON SUNFLOWER

Contrary to the related *P. viticola*, which attacks only green parts and fruits of grapevine (Musetti *et al.*, 2005), field infections of *P. halstedii* in sunflower usually result from root attacks by zoospores released at the beginning of spring from zoosporangia derived from oospores (primary infections, Fig. 3). Root infection leads to either seedling damping off, or to severe symptoms, in particular plant dwarfing (Fig. 2a), leaf discoloration (Fig. 2b) and sporulation (Fig. 2f,g), ultimately resulting in important yield

losses caused by the production of infertile flowers (Sackston, 1981). Dwarfing of sunflower plants is currently not explained, although it might be the result of hormonal manipulation or nutrient uptake by *P. halstedii*.

During sunflower growth, under humid and cool conditions, zoosporangia produced mainly on the surfaces of leaves and cotyledons are responsible for the contamination of the shoots of neighbouring plants, where they release zoospores (secondary infections, Fig. 3). Symptoms induced by secondary infections are often less severe than those induced by primary infections (Gulya *et al.*, 1998). In contrast, in grapevine, yield losses by *P. viticola* are mostly attributed to leaf infections (Schruff and Kassemeyer, 2000).

Two types of resistance to downy mildew conferred by *PI* genes have been described in sunflower: type I resistance is characterized by the absence of symptoms on shoots and the absence of the pathogen above the base of hypocotyls; type II resistance is characterized by weak sporulation symptoms restricted to cotyledons, and the absence of symptoms in the upper part of the plant with the pathogen never reaching the true leaves (Mouzeyar *et al.*, 1994). Resistant sunflower genotypes present either type I or type II resistance depending on their *PI* resistance genes (for example, the *PI5* allele from the inbred line XRQ confers type II resistance, whereas *PI6* confers type I resistance). These resistances have been used to protect crops against *P. halstedii* pathotypes, but, except for *PI_{Arg}* (Fig. 1a), they have all been overcome during the last 15 years. For example, the *PI2* and *PI6* genes have been overcome by eight pathotypes (Delmotte *et al.*, 2008; Moinard *et al.*, 2006).

To study *P. halstedii* resistance in laboratory conditions, we infected sunflower seedlings and grew them in hydroponic cultures (Fig. 2c), such that they showed the same symptoms as plants in the field. In our experiments, we compared a pair of downy mildew-susceptible and downy mildew-resistant near-isogenic sunflower lines (NILs), called TS and TSRM, respectively. The inbred line TS has no identified *PI* gene and is susceptible to all *P. halstedii* pathotypes. TSRM was obtained by backcrossing of the *PI5* gene from the inbred line XRQ into TS (six back-crosses and two selfings to obtain homozygous *PI5* resistance in a TS genetic background). TSRM presents type II resistance to *P. halstedii* pathotypes 100, 304, 703 and 710, as shown for *PI5* in other genetic backgrounds.

Two weeks after infection of TS and TSRM by pathotype 710, infected TS plants showed dwarfing (Fig. 2d), leaf discoloration (Fig. 2g) and sporulation on cotyledons and leaves (Fig. 2f,g). In contrast, infected TSRM plants grew as well as non-infected plants (Fig. 2e), showed no leaf discoloration and only rare sporulation on cotyledons, but never on leaves, as described previously for type II resistance (Mouzeyar *et al.*, 1993, 1994). In addition, hydroponic culture revealed root phenotypes (Fig. 2d,e). In infected plants of both TS and TSRM, roots turned brown and showed reduced growth, especially in the case of TS, compared with uninfected roots (Fig. 2d,e). It is not clear whether the brown root



Fig. 2 Disease symptoms caused by *Plasmopara halstedii* on sunflower in field (a, b) and hydroponic (c–g) conditions. Plant dwarfing (a, arrow) and leaf discoloration (b) of sunflower plants. (c–g) Two-day-old sunflower seedlings were root inoculated by *P. halstedii*, pathotype 710 (Mouzeyar *et al.*, 1993) and grown in oxygenated liquid growth medium under hydroponic conditions, shown in (c). A saturated atmosphere, obtained by placing for 2 days plastic covers over the trays, 12 days after inoculation, induced sporulation on cotyledons of the susceptible line TS (c, f, g), but not on the resistant near-isogenic line TSRM (c), as for inoculation tests performed in soil (Mouzeyar *et al.*, 1993). Dwarfing symptoms are visible on infected (inf.) TS plants, but not on TSRM (c), compared with uninfected (ctrl) TS and TSRM plants (d, e). Infection of TSRM did not affect shoot growth compared with non infected TSRM plants (e). (d, e) Note the brownish coloration on infected roots of both lines. (f, g) Typical ‘downy’ appearance on abaxial and adaxial cotyledon surfaces caused by sporulation on TS. (g) Leaf discoloration on 14-day-old plants. (d, e) Scale bars: 5 cm.

phenotype could be attributed to a general plant defence reaction to *P. halstedii* infection or to disease symptoms of roots. In TSRM plants, the root phenotype was less marked compared with TS plants, and probably not sufficiently strong to impact TSRM shoot development (Fig. 2d,e).

LIFE CYCLE OF *P. HALSTEDII*

Two modes of spore germination preceding plant infection have been described for obligate biotroph oomycetes: (i) indirect germination occurring by the release of motile zoospores from mature sporangia, their encystment on the plant surface and spore germination; (ii) direct germination: production of a germ tube by the sporangium itself. Although direct germination is the only method of germination for the genera *Hyaloperonospora* and *Peronospora*, which never produce mobile zoospores, the genus *Plasmopara* mainly uses the indirect germination of zoospores (Grenville-Briggs and Van West, 2005).

Root infection

Although *P. halstedii* can be dispersed by wind, water and via contaminated seeds (see section on Pathogen sporulation and

dissemination), it is mostly a soil-borne pathogen (Ioos *et al.*, 2007). In the field, root infections of young sunflower plants are responsible for the most severe symptoms and have a strong impact on yield. Infections have been shown to have a maximum efficiency during the first 5 days after seed germination, but can still occur until sunflower plants reach the four-leaf stage (2–3 weeks; Zimmer, 1971, 1975). *Plasmopara halstedii* zoospores released either from oospore sporangia (in the spring) or from asexual sporangia (from spring to summer) (Fig. 4a) can infect young sunflower plants (Cohen and Sackston, 1973; Nishimura, 1922; Spring and Zipper, 2000).

To decipher the different strategies deployed by the pathogen to colonize sunflower roots, scanning electronic microscopy (SEM) was used to follow root infection on TS and TSRM plants inoculated by pathotype 710 and grown in hydroponic conditions. *Plasmopara halstedii* zoosporangia release up to 20 mobile zoospores each (Fig. 4a,b). These mobile zoospores of *P. halstedii* possess two flagella (Fig. 4b,c) used to swim in soil free water and to reach epidermal root cells. In our infection conditions, all germinated zoospores were randomly dispersed on epidermal cells without apparent chemoattraction or electrotaxis, as reported for other root oomycete pathogens, such as *Phytophthora sojae* and

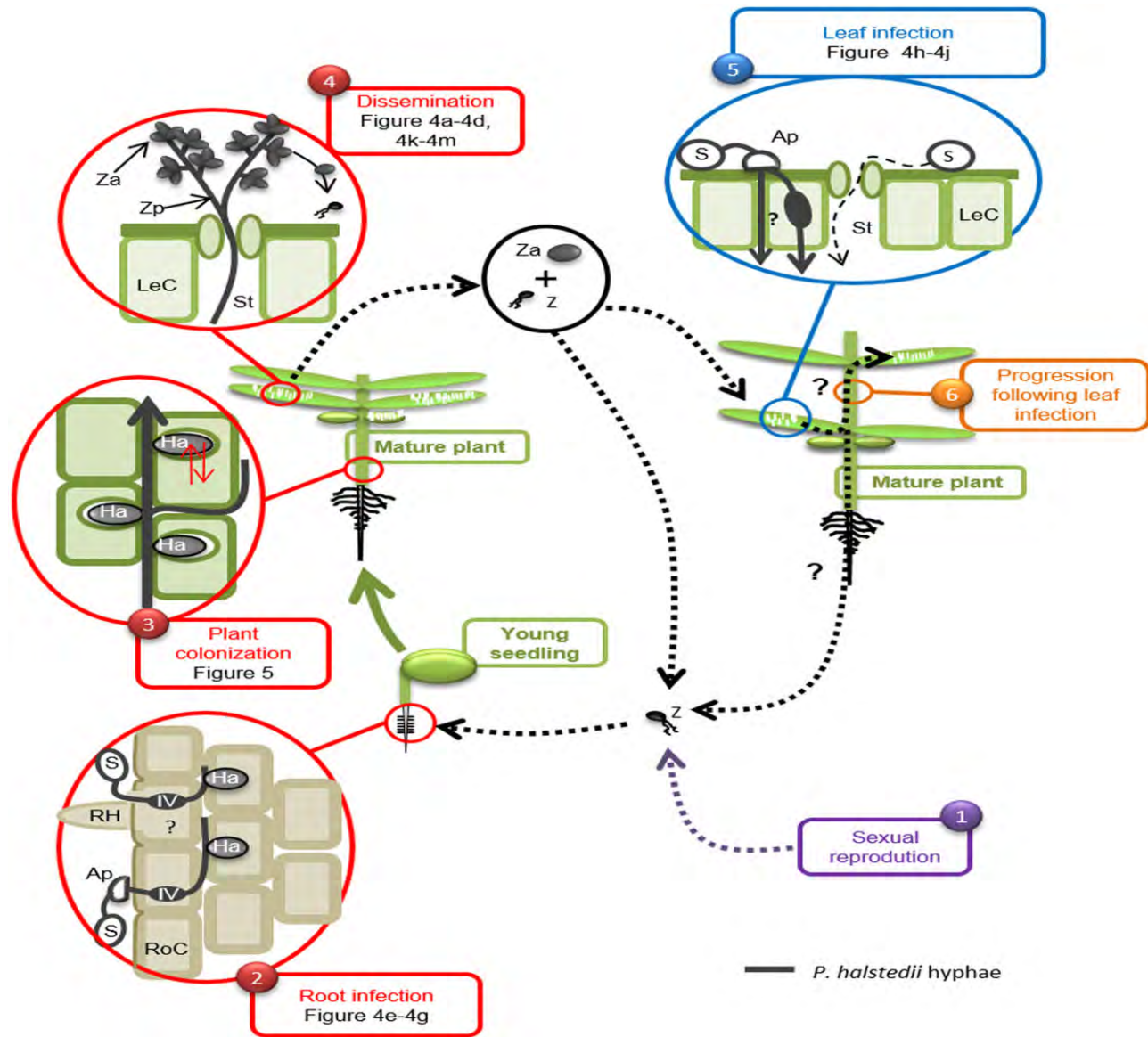
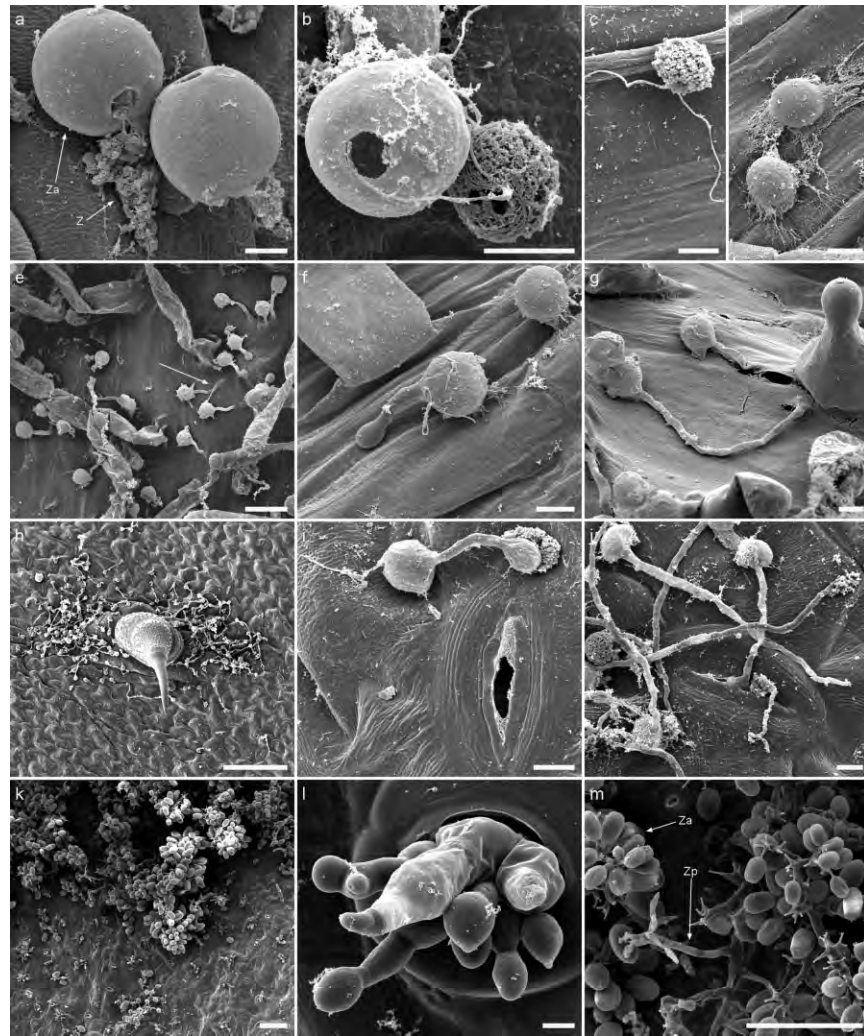


Fig. 3 Life cycle of *Plasmopara halstedii*. (1) In spring, biflagellate zoospores (Z) originating from zoosporangia produced by overwintering sexual oospores are released in soil free water. Spore (S) encystment occurs in contact with a sunflower root. (2) Zoospores germinate in a few hours and enter the root by two methods: (i) by direct penetration into a root cell (RoC) with or without the formation of an appressorium (Ap), a bulge in which the pathogen increases osmotic pressure and drills root epidermal cells; and (ii) through injuries frequently present at the base of root hairs (RH). The formation of infection vesicles (IV) then occurs in plant epidermal cells infected with appressoria (Wehtje *et al.*, 1979). (3) Pathogen hyphae (grey thick line) progress further through the intercellular spaces between cortical root cells to reach and colonize shoot tissues. At this stage of infection, *P. halstedii* establishes a large number of infection/nutrition structures, named haustoria (Ha). (4) Under high humidity conditions and moderate temperature (late spring and summer), *P. halstedii* will emerge first on the abaxial surface of leaves and cotyledons via stomata (St), close to a leaf cell (LeC). The branched structures that are produced are dissemination structures, named zoosporangiophores (Zp), carrying zoosporangia (Za). Zoosporangia can be disseminated and contaminate the leaves of other plants. They release up to 20 zoospores (Z). (5) Spores grouped around leaf trichomes or near veins encyst and germinate in a few hours to penetrate leaf tissues at intercellular junctions by forming appressoria (thick gray line). Rare events of penetration via stomata are also observed (thin dotted line). (6) Pathogen progression in plant tissue following leaf infection remains poorly characterized.

Phytophthora palmivora (Morris *et al.*, 1998; Tyler *et al.*, 1996), and for *P. halstedii* by Delanoë (1972), who described zoospore attraction to sunflower root surfaces by unidentified chemical compounds secreted by the plant.

Contact with the root surface induced *P. halstedii* zoospore encystment involving ultrastructural changes, including the loss of flagella and the appearance of a smooth surface (Fig. 4d). Other changes, not checked in our experiments, including the

Fig. 4 Scanning electron microscopy (SEM) images illustrating key steps of the *Plasmopara halstedii* life cycle. (a–d) Release and encystment of *P. halstedii* zoospores from zoosporangia. (a) Zoospores (Z) released from zoosporangia (Za) opercula. (b) A swollen zoospore on the right of a zoosporangium shows a lumpy surface and uses two flagella to move towards plant tissues (c). (d) Encysted spores lose their flagella and show a smooth surface. Scale bars: (a–d) 5 µm. Germination of spores into sunflower roots (e–g) and leaves (h–j). (e) Germinating spores in the root hair emerging zone. White arrow indicates penetration of a germ tube directly through the epidermis without appressorium formation. (f) Spore with a germ tube forming an appressorium. (g) Spore penetrating at the base of a root hair without a visible appressorium. (h) Spores germinating on leaves, grouped around a trichome. (i) Spore germination with appressorium formation near a stomata. (j) Rare entry of *P. halstedii* in leaves through stomata. Scale bars: 20 µm (e); 5 µm (f, g, i, j); 100 µm (h). (k–m) Dissemination structures of *P. halstedii*. (k) Sporulation of *P. halstedii* on the lower face of a cotyledon. (l) Enlargement of a zone from (k) showing zoosporangiophores exiting the plant through stomata. (m) Zoosporangia (Za) carried by a zoosporangiophore (Zp). Scale bars: 100 µm (k, m), 5 µm (l).



synthesis of a cell wall and deposition on the spore surface of an amorphous electron-dense material, were described by Gray *et al.* (1985) in *P. halstedii* as in other oomycetes. Twenty-four hours after infection, the majority of spores were encysted and then germinated in the root hair emerging zone (Fig. 4e). *Plasmopara halstedii* germ tubes can enter root tissues by three different ways: mostly by the formation of an appressorium structure (Fig. 4f), but also through injuries, especially at the bases of root hairs (Fig. 4g), or by direct penetration without an appressorium through the wall of epidermal cells (Fig. 4e). These three penetration modes have been described previously for pathotypes other than 710 (Nishimura, 1922; Wehtje *et al.*, 1979; Wehtje and Zimmer, 1978). Furthermore, it has been shown that the penetration of *P. halstedii* pathotype 300 via an appressorium leads to the formation of an infection vesicle in the root epidermal cell, suggesting a successful infection (Wehtje *et al.*, 1979). Subsequently, the pathogen may grow through one or two cortical cells before it becomes intercellular (Wehtje *et al.*, 1979).

In our conditions, no differences were observed in the establishment of infection structures between interactions that were compatible or compatible as a result of the presence/absence of the *PI5* resistance gene. In contrast, Wehtje and Zimmer (1978) reported that resistance conditioned by the *PI2* gene (type I resistance) could inhibit the penetration or pre-penetration processes during or soon after zoospore encystment.

Plant colonization and defence reactions

Following root penetration, *P. halstedii* grows intercellularly through plant tissues by coenocytic hyphae (Fig. 5a–c), producing infection/nutrition invaginations, named haustoria, in root, hypocotyl and cotyledon cells (Fig. 5a–c). During the compatible interaction between TS and pathotype 710, *P. halstedii* hyphae reach the top of the plant and infection becomes systemic (Fig. 2g), which is not observed for the resistant line TSRM.

However, in roots of both susceptible and resistant sunflower lines, a few hyphae and haustoria were observed, suggesting that,

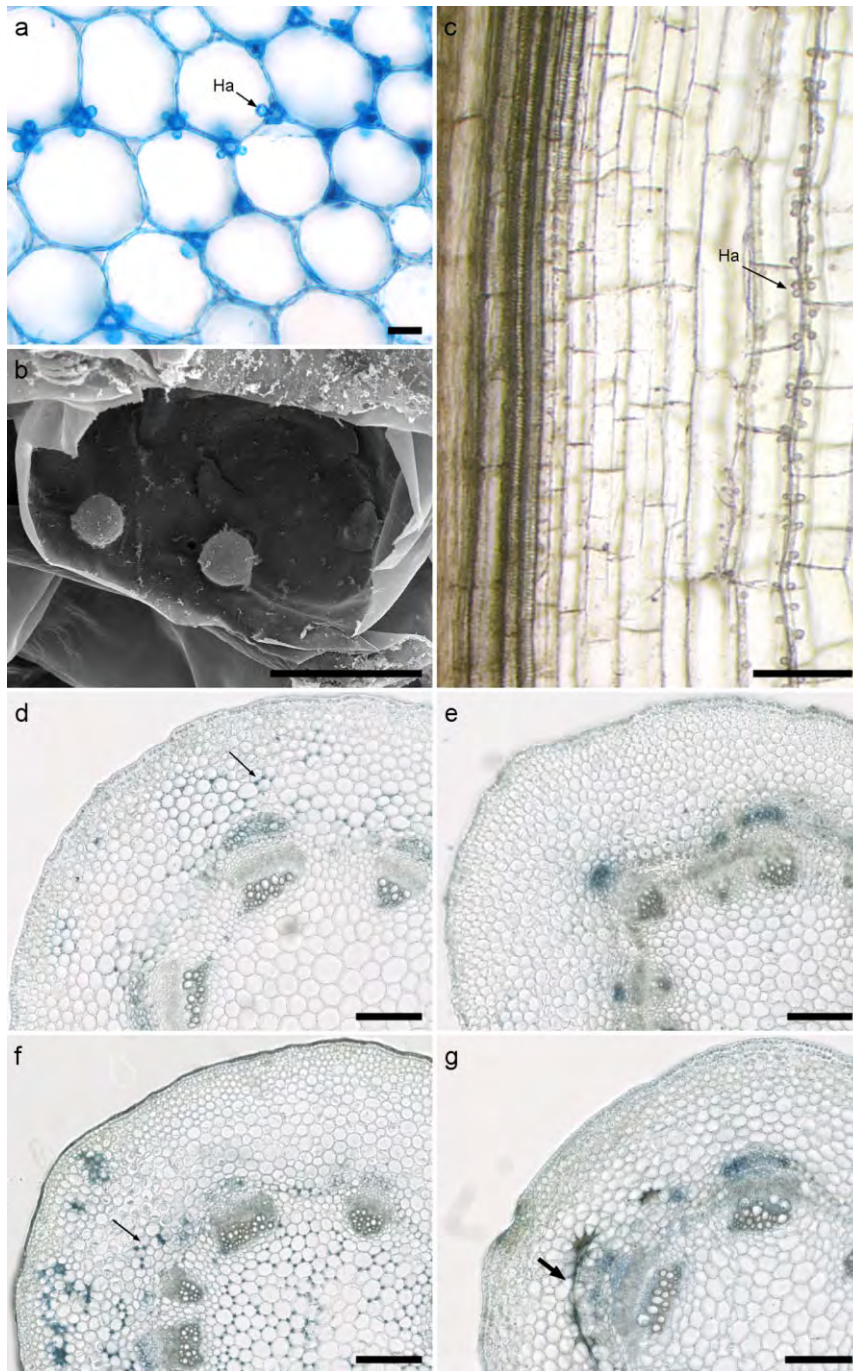


Fig. 5 *Plasmopara halstedii* hyphae and haustoria in hypocotyl and cotyledon tissues of susceptible and resistant sunflower lines. (a) Transverse sections of hypocotyls stained with 'cotton blue' in a lactophenol blue solution. Intercellular hyphae form haustoria (Ha) in adjacent cortical cells (black arrow). (b) Several haustoria were frequently observed in single hypocotyl and cotyledon cells [scanning electron microscopy (SEM) observations]. (c) Longitudinal section of a hypocotyl showing hyphal growth parallel to vascular bundles as a single track from the bottom to the top, and haustoria (Ha) in adjacent cells. (d–g) Time course of *P. halstedii* (pathotype 710) in a hypocotyl of susceptible (d, f) and resistant (e, g) near-isogenic lines of sunflower. Transverse section at 6 (d, e) and 10 (f, g) days post-inoculation stained with lactophenol blue. In the susceptible line TS, *P. halstedii* grew in both cortical and medullar cells of the hypocotyl (see arrows in d and f), whereas, in the resistant line TSRM, no (e) or very few (g) hyphae were visible and spider web hypersensitive response (HR)-like necroses (thick arrow, g) developed within the cortical parenchyma. Scale bars: 20 μm (a, b); 200 μm (c–g).

in type II resistance, the growth of the pathogen is not completely blocked at the root level (data not shown). However, from 6 days post-inoculation (dpi) in hypocotyl sections, large numbers of hyphae could be observed between cortical cells of TS plants (Fig. 5d, arrow), whereas no hyphae were detected in its NIL counterpart TSRM (Fig. 5g). This trend was confirmed at 10 dpi. In TS, all hypocotyl tissues, except vascular bundles, were fully infected by *P. halstedii* (Fig. 5f), whereas, in TSRM, far fewer hyphae were observed and none were seen in the central cylinder (Fig. 5g).

Moreover, defence reactions, visualized by groups of brown collapsed cells formed in contact with the pathogen, were only observed in TSRM cortex at 10 dpi (Fig. 5g, thick arrow). These reactions resembled the hypersensitive response (HR)-like reactions of hypocotyls and cotyledons described for type II (*PI1*, *PI5* and *PI8*) and type I (*PI2*) resistances (Mouzeyar *et al.*, 1993; Radwan *et al.*, 2005, 2011). Early HR-like reactions (before 6 dpi), resulting from contact with the pathogen, could explain the difference in *P. halstedii* colonization levels between TS and TSRM plants.

HR-like reactions described in type I and type II resistances were accompanied by callose deposition, phenolic compound accumulation, and cell divisions around necrotic cells in several studies (Mouzeyar *et al.*, 1993; Radwan *et al.*, 2005, 2011). HR-like reactions observed in the hypocotyl might increase sunflower resistance by limiting pathogen growth. The induction of sunflower defence genes during *P. halstedii* interactions is, however, poorly documented (Radwan *et al.*, 2005, 2011; As-Sadi, 2011).

The presence of HR-like reactions does not completely stop pathogen progression in hypocotyls and cotyledons of TSRM (as shown by weak sporulation on cotyledons). However, the absence of *P. halstedii* in TSRM leaves suggests that the region of the cotyledon node may serve as a mechanical or physiological barrier to oomycete spread, as hypothesized by Delanoë (1972) and Allard (1978).

Defence gene activation, leading to the production of antimicrobial compounds, HR-like reactions and other unknown mechanisms, is probably sufficient in resistant plants to impair mycelium growth in leaves and to stop systemic spread that would result in the formation of dissemination structures.

Pathogen sporulation and dissemination

At about 14 dpi in the growth chamber at a cool temperature (18–20 °C), after 2 days under saturating humidity conditions, sporulation occurred; a dense white down, visible to the naked eye, was produced on the cotyledon and/or leaf surfaces (Figs 2f,g and 3). This down was composed of zoosporangiophores (or conidiophores) (Fig. 4k–m). In the field, *P. halstedii* sporulation is only observed under favourable environmental conditions and notably high humidity.

Plasmopara halstedii hyphae were seen to exit the plant mainly through the stomata of leaves and cotyledons (Fig. 4l). At these sites, the hyphae developed branched zoosporangiophores, carrying the dissemination organs, zoosporangia, at the ends of the branches [Figs 4m and S1 (see Supporting Information)]. Zoosporangiophores were also formed on hypocotyl tissues and on roots (Fig. S1), but we cannot exclude the possibility that their formation on roots was facilitated by the hydroponic conditions used. It should be noted that *P. halstedii* zoosporangiophores and zoosporangia that formed on sunflower cotyledons, hypocotyls or roots showed different shapes (Fig. S1), as already described by Zahka and Viranyi (1991). Nishimura (1922) observed zoosporangia already formed by the pathogen in the substomatal cavity before the leaf emergence of zoosporangiophores. In addition, Bouterige *et al.* (2003) studied zoosporangia maturation *in vitro* leading to the formation and liberation of zoospores by the addition of 1% sucrose. At the end of the maturation, an apical papilla was formed at the top of zoosporangia through which the zoospores would be released (Figs 4a,b and S1).

The same types of dissemination structure have been observed for other phytopathogenic oomycetes, such as *P. viticola* on grapevine (Gessler *et al.*, 2011). The shape of zoosporangiophores has been used to classify oomycetes, but this method has been overemphasized and is controversial (Thines, 2014; Voglmayr *et al.*, 2004).

Shoot infection

Following sporulation, the dissemination of zoosporangia can lead to the secondary spread of infections (Fig. 3). This step in the life cycle of *P. halstedii* is responsible for late infections of neighbouring plants and contributes to pathogen dissemination (Spring, 2009).

In order to mimic shoot contaminations by zoosporangia in the field, a drop infection method, by the deposition of a suspension of zoosporangia on sunflower TS and TSRM leaves, was used. Grouped around leaf trichomes (Fig. 4h) and main veins (data not shown), zoospore encystment involved similar ultrastructural changes as in root infections (Bouterige *et al.*, 2003; Nishimura, 1922). Encysted zoospores germinated rapidly [starting from 4 h post-inoculation (hpi)] and subsequently penetrated plant tissues. Generally, the penetration of leaf tissues was enabled by appressoria formation close to intercellular junctions (Fig. 4i). Although Nishimura (1922) reported that *P. halstedii* enters leaves by stomatal openings, we rarely observed this on TS and TSRM leaves inoculated by pathotype 710 (Fig. 4j). These results contrast with *P. viticola* grapevine leaf infections, in which zoospores germinate on stomata (Dièsez-Navajas *et al.*, 2007; Kiefer *et al.*, 2002) or differentiate a germ tube towards stomatal openings (Burruano, 2000). In contrast with root infections by *P. halstedii*, direct entry in leaf tissues was not observed, probably because of the cuticle present on the sunflower leaf surface. Following appressorium formation, it is still unclear how *P. halstedii* invades leaf tissues: does it establish an infection vesicle in the epidermal cell as in roots, and how does it develop in leaf parenchyma?

More generally, following leaf infection, little is known about further *P. halstedii* colonization of the entire plant and how it impacts sunflower yield. However, leaf infections leading to systemic infection in upper plant parts and, conversely, basipetal growth of *P. halstedii* hyphae in the shoot, have been reported (Meliala *et al.*, 2000; Spring, 2009).

MOLECULAR RESOURCES AND PATHOGENICITY EFFECTORS

Plant-pathogenic oomycetes, either obligate biotrophs or hemibiotrophs, rely for their developmental cycle on pathogenicity factors, called effectors, that modify the metabolism of host plants to their benefit and thus enable pathogenicity (Bozkurt *et al.*,

2012). Repertoires of hundreds of effector proteins that can be localized in either the apoplast or cytoplasm of plant cells have been described to be encoded in oomycete genomes (Stassen and Van den Ackerveken, 2011). Within the class of cytoplasmic effectors, the RXLR and Crinkler (CRN) families have been shown to be secreted by the pathogen from haustoria and translocated into host cells (Schornack *et al.*, 2010; Whisson *et al.*, 2007). In addition to a signal peptide, RXLR proteins exhibit a characteristic RXLR amino acid motif that is sometimes associated with a (D)EER motif, whereas CRN proteins show a characteristic LXLFLAK motif (Rehmany *et al.*, 2005; Torto *et al.*, 2003). The different virulence profiles shown by pathotypes of *P. halstedii* (Fig. 1) could be explained by an intricate repertoire of effectors, and this has motivated our effort to develop *P. halstedii* genomics.

Despite the economic importance of downy mildew diseases caused by *Plasmopara* species, genomic resources were very limited until recently, even for *P. viticola*, the agent of grapevine downy mildew (As-Sadi *et al.*, 2011; Bouzidi *et al.*, 2007; Mestre *et al.*, 2012). The obligate biotrophic requirements of these organisms, and our consequent inability to grow them *in vitro*, could explain the lack of genomic resources. The genome size of *P. halstedii* was estimated at 100 Mbp (unpublished data), close to the genome sizes of other Peronosporales, such as *Hyaloperonospora arabidopsidis* (100 Mbp) and *Phytophthora sojae* (95 Mbp) (Baxter *et al.*, 2010; Tyler *et al.*, 2006). In contrast with these model oomycetes that can be transformed, genetic tools must be improved for *P. halstedii*. For example, transient expression of green fluorescent protein (GFP) was shown to be possible in *P. halstedii* using electroporation of sporangia, but GFP expression was lost during subsequent infections (Hammer *et al.*, 2007).

The first characterization of *P. halstedii* ESTs used a subtractive hybridization method applied to infected sunflower seedlings, and led to the identification of 230 non-redundant ESTs, 145 of which were assigned by polymerase chain reaction (PCR) tests on genomic DNA to be from *P. halstedii* (Bouzidi *et al.*, 2007). Among the predicted proteins, three shared significant homology to a *Phytophthora infestans* elicitor and to protease inhibitors related to pathogenicity, and five corresponded to unknown proteins having a signal peptide suggesting that they could be secreted proteins, but no RXLR or CRN effector was identified (Bouzidi *et al.*, 2007).

Extensive *P. halstedii* EST sequencing and search for RXLR and CRN effectors have been initiated by our group (As-Sadi *et al.*, 2011). 454[®] pyrosequencing of cDNA was performed using two sunflower genotypes, XRQ and PSC8, infected by pathotype 710. These genotypes are resistant and susceptible, respectively (As-Sadi *et al.*, 2011). About 45 000 non-redundant clusters, that may be from either sunflower or pathogen origin, were assembled and made available through a web-based portal <http://www.heliagene.org/cgi/HP.cgi>. This resource was screened on

dedicated plant or oomycete libraries using *in silico* BLAST filtering, and 577 clusters predicted to have an oomycete origin were identified, including 389 new *P. halstedii* genes (As-Sadi *et al.*, 2011). Most of the genes encode predicted proteins with unknown functions (only 32 had an Interpro motif), but the highest BLAST scores were obtained with proteins of hemibiotroph *Phytophthora* species (73% of the genes) and, to a lesser extent (17%), with the obligate biotroph *Hyaloperonospora arabidopsidis*, suggesting that *P. halstedii* does not share closer sequence homology with a pathogen causing downy mildew than with other Peronosporales oomycetes causing late blight disease. Homology searches based on known sequences of oomycete cytoplasmic effectors led to the characterization of 20 potential effectors having the conserved motifs found in RXLR and CRN effectors, showing, for the first time, that *P. halstedii* probably has the same kind of cytoplasmic effectors as found in other oomycetes (As-Sadi *et al.*, 2011).

To increase the number of *P. halstedii* expressed sequences, we performed a deeper transcriptome 454[®] sequencing based on the following materials: hypocotyls from infected susceptible sunflower plants of the inbred GB line and *in vitro*-germinated spores corresponding to a pre-infectious stage (the last stage at which it is possible to obtain *P. halstedii* material free of plant tissue). Four pathotypes of *P. halstedii* (100, 304-10, 703 and 710), representatives of the three groups of pathotypes described by Delmotte *et al.* (2008), were used; 80 354 non-redundant EST clusters were assembled and compared with draft genomic assemblies from *P. halstedii* in order to select only the oomycete clusters (unpublished data). The selected 24 597 *P. halstedii* clusters (mean size of 621 nucleotides) and 17 417 predicted peptides (mean size of 163 amino acids) will soon be made available in a new database, named *PlasmoparaSp*. This database was screened to identify the repertoire of expressed RXLR and CRN effectors from *P. halstedii*. Forty-nine expressed putative RXLRs and 54 CRNs were identified (unpublished data); these numbers are consistent with data from other oomycetes (Cabral *et al.*, 2011; Haas *et al.*, 2009). All the selected RXLRs have a predicted signal peptide, suggesting that they could be secreted from the pathogen. In contrast, 80% of *P. halstedii* CRNs were not predicted to have a canonical signal peptide, as reported for CRNs from other oomycete species (Stam *et al.*, 2013), suggesting that the highly conserved N-terminal sequences detected in *P. halstedii* CRN effectors could not be recognized by the prediction programs used. Nevertheless, the role of signal peptides in effector secretion must be shown experimentally. The putative translocation motifs of *P. halstedii* RXLR and CRN effectors were very similar to the published consensus sequences. Forty per cent of the RXLRs showed the exact RXLR consensus followed, or not, by the EER motif, and 29% had only the (D)EER motif. *Plasmopara halstedii* CRN effectors presented the characteristic modular structure composed of an N-terminal conserved region including the LXLFLAK and HVLVVVP motifs,

followed by a variable C-terminal domain. Variant motifs of LXLFLAK (28%) were observed, including LXLFLAK (35%) and LXLFLAK (20%), as observed for other oomycetes (Gaulin *et al.*, 2008). Our analyses revealed the presence in *P. halstedii* CRN effectors of nine different CRN C-terminal domains (DBE, DBF, DFB, DN5, DN17, DO, DXZ, newD2 and SN6) already described in *P. infestans* (Haas *et al.*, 2009). Comparing the putative effectors of *P. halstedii* with those of other oomycetes identified both conserved and *P. halstedii*-specific effectors, and revealed that the effector repertoire of *P. halstedii* is overall closely related to that of *Phytophthora* species (P. Mestre and L. Godiard, unpublished results).

FUTURE PROSPECTS

Plasmopara halstedii, an obligate biotroph oomycete causing downy mildew on the important crop plant sunflower, offers puzzling traits, such as diversified infection modes on plant roots and shoots, and a still enigmatic reproduction cycle. The adaptable characteristics of *P. halstedii* might favour the rapid evolution of its virulence, illustrated by the occurrence of novel pathotypes overcoming the resistance used in sunflower cultivars. In addition, evolutionary questions raised about its increasing virulence make plant genetic control of this pathogen a major stake and render this pathogen particularly interesting to study. Moreover, a global population genetic study should provide information on the origin of this invasive pathogen from North America and elucidate its worldwide dispersion and co-evolution with sunflower.

Pathogen effectors are probably major players in the interaction between *P. halstedii* and sunflower, as illustrated in other oomycete–plant interactions. An essential issue will be to define *P. halstedii* effectors that may have an impact on its capacity to infect the plant, on host specificity and on the pathogen developmental cycle *in planta*. The establishment of *in vitro* growth conditions and the development of genetic tools for *P. halstedii* would be good assets to solve these challenges.

To circumvent these difficulties, we developed genomic data on several *P. halstedii* pathotypes, and aimed to describe the complete set of effectors. A comprehensive study of effector polymorphism will be performed in *P. halstedii* pathotypes in order to find key determinants of pathogen virulence and host specialization. The identification of effectors with large variability between *P. halstedii* isolates and under positive selection should constitute a starting point to understand pathogen evolution. In contrast, the identification of the effectors most conserved between *P. halstedii* pathotype isolates, corresponding to essential pathogen genes, could be used to screen sunflower genetic resources to find more sustainable resistance genes.

In parallel, functional studies should be used to specify the roles of these proteins in sunflower cells and how they condition pathogen virulence. For this purpose, agroinfection methods have been

set up in sunflower plants, allowing the transient expression of *P. halstedii* effectors (Q. Gascuel, unpublished data). Ultimately, these studies should unveil molecular and physiological mechanisms, and hence lead to a better understanding of sunflower–*P. halstedii* interactions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Patrick Vincourt, Clare Gough (LIPM, Castanet-Tolosan, France) and Nicolas Frei dit Frey (Université Toulouse III/CNRS, LRSV, Castanet-Tolosan, France) for critical reading of the manuscript, and Pere Mestre (INRA, Colmar, France) for allowing the citation of unpublished data. We acknowledge Denis Tourvieille de Labrouhe (INRA, Clermont-Ferrand, France) for his expertise on sunflower downy mildew and for providing *P. halstedii* pathotypes, Nicolas Blanchet (LIPM, Castanet-Tolosan, France) for preparing plant material and Isabelle Fourquaux (Université Toulouse III, France) for preparing scanning electron microscopy samples. We are indebted to the TRI Platform, Toulouse, France for allowing access to imaging facilities. This work was supported by the French Laboratory of Excellence project 'TULIP' (ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02).

REFERENCES

- Ahmed, S., Tourvieille de Labrouhe, D. and Delmotte, F. (2012) Emerging virulence arising from hybridisation facilitated by multiple introductions of the sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*. *Fungal Genet. Biol.* **49**, 847–855.
- Allard, C. (1978) Invasion et colonisation systématique de la plantule de tournesol (*Helianthus annuus* L.) par le *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni. *Ann. Phytopathol.* **10**, 197–217.
- As-Sadi, F. (2011) Genetic and genomic based approaches towards a better sustainability of sunflower *Helianthus annuus* resistance to downy mildew *Plasmopara halstedii*. PhD, Université Toulouse III Paul Sabatier.
- As-Sadi, F., Carrere, S., Gascuel, Q., Hourlier, T., Rengel, D., Le Paslier, M.-C., Bordat, A., Boniface, M.C., Brunel, D., Gouzy, J., Godiard, L. and Vincourt, P. (2011) Transcriptomic analysis of the interaction between *Helianthus annuus* and its obligate parasite *Plasmopara halstedii* shows single nucleotide polymorphisms in CRN sequences. *BMC Genomics*, **12**, 498–573.
- Bachlava, E., Radwan, O.E., Abratti, G., Tang, S., Gao, W., Heesacker, A.F., Bazzalo, M.E., Zambelli, A., Leon, A.J. and Knapp, S.J. (2011) Downy mildew *Pl_B* and *Pl₁₄* and rust *R_{Adv}* resistance genes reside in close proximity to tandemly duplicated clusters of non-TIR-like NBS-LRR-encoding genes on sunflower chromosomes 1 and 13. *Theor. Appl. Genet.* **122**, 1211–1221.
- Baxter, L., Tripathy, S., Ishaque, N., Boot, N., Cabral, A., Kemen, E., Thines, M., Ah-Fong, A., Anderson, R., Badejoko, W., Bittner-Eddy, P., Boore, J.L., Chibucos, M.C., Coates, M., Dehal, P., Delehaunty, K., Dong, S., Downton, P., Dumas, B., Fabro, G., Fronick, C., Fuerstenberg, S.I., Fulton, L., Gaulin, E., Govers, F., Hughes, L., Humphray, S., Jiang, R.H.Y., Judelson, H., Kamoun, S., Kyung, K., Meijer, H., Minx, P., Morris, P., Nelson, J., Phuntumart, V., Qutob, D., Rehmany, A., Rougon-Cardoso, A., Ryden, P., Torto-Alalibo, T., Studholme, D., Wang, Y., Win, J., Wood, J., Clifton, S.W., Rogers, J., Van den Ackerveken, G., Jones, J.D.G., McDowell, J.M., Beynon, J. and Tyler, B.M. (2010) Signatures of adaptation to obligate biotrophy in the *Hyaloperonospora arabidopsidis* genome. *Science*, **330**, 1549–1551.
- Bouterige, S., Tronchin, G., Lesourd, M., Marot-Leblond, A., Molinero, V., Bouchara, J.P. and Robert, R. (2003) Ultrastructural and immunochemical changes during the *in vitro* development of *Plasmopara halstedii*. *Phytopathology*, **93**, 1023–1030.
- Bouzidi, M.F., Badaoui, S., Cambon, F., Vear, F., De Labrouhe, D.T., Nicolas, P. and Mouzeyar, S. (2002) Molecular analysis of a major locus for resistance to downy mildew in sunflower with specific PCR-based markers. *Theor. Appl. Genet.* **104**, 592–600.
- Bouzidi, M.F., Parlange, F., Nicolas, P. and Mouzeyar, S. (2007) Expressed Sequence Tags from the oomycete *Plasmopara halstedii*, an obligate parasite of the sunflower. *BMC Microbiol.* **7**, 110–121.

- Bozkurt, T.O., Schornack, S., Banfield, M.J. and Kamoun, S. (2012) Oomycetes, effectors, and all that jazz. *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**, 483–492.
- Burruano, S. (2000) The life-cycle of *Plasmopara viticola*, cause of downy mildew of vine. *Mycologist*, **14**, 179–182.
- Cabral, A., Stassen, J.H., Seidl, M.F., Bautor, J., Parker, J.E. and Van den Ackerveken, G. (2011) Identification of *Hyaloperonospora arabidopsidis* transcript sequences expressed during infection reveals isolate-specific effectors. *PLoS One*, **6**, e19328.
- Cohen, Y. and Sackston, W.E. (1973) Factors affecting infection of sunflower by *Plasmopara halstedii*. *Can. J. Bot.* **51**, 15–22.
- Constantinescu, O., Voglmayr, H., Fatehi, J. and Thines, M. (2005) *Plasmoverna* gen. nov., and the taxonomy and nomenclature of *Plasmopara* (Chromista, Peronosporales). *Taxon*, **54**, 813–821.
- Delanoë, D. (1972) Biologie et épidémiologie du mildiou du tournesol (*Plasmopara helianthi* Novot.). *Inf. Tech. CETIOM*, **29**, 1–47.
- Delmotte, F., Giresse, X., Richard-Cervera, S., M'Baya, J., Vear, F., Tourvieille, J., Walser, P. and Tourvieille de Labrouhe, D. (2008) Single nucleotide polymorphisms reveal multiple introductions into France of *Plasmopara halstedii*, the plant pathogen causing sunflower downy mildew. *Infect. Genet. Evol.* **8**, 534–540.
- Dièsez-Navajas, A.M., Greif, C., Poutaraud, A. and Merdinoglu, D. (2007) Two simplified fluorescent staining techniques to observe infection structures of the oomycete *Plasmopara viticola* in grapevine leaf tissues. *Micron*, **38**, 680–683.
- Franchel, J., Bouzidi, M.F., Bronner, G., Vear, F., Nicolas, P. and Mouzeyar, S. (2013) Positional cloning of a candidate gene for resistance to the sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii* race 300. *Theor. Appl. Genet.* **126**, 359–367.
- Gaulin, E., Madoui, M.A., Bottin, A., Jacquet, C., Mathe, C., Couloux, A., Wincker, P. and Dumas, B. (2008) Transcriptome of *Aphanomyces euteiches*: new oomycete putative pathogenicity factors and metabolic pathways. *PLoS One*, **3**, e1723.
- Gentzbittel, L., Mouzeyar, S., Badaoui, S., Mestries, E., Vear, F., De Labrouhe, D.T. and Nicolas, P. (1998) Cloning of molecular markers for disease resistance in sunflower, *Helianthus annuus* L. *Theor. Appl. Genet.* **96**, 519–525.
- Gessler, C., Pertot, I. and Perazzolli, M. (2011) *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathol. Mediterr.* **50**, 3–44.
- Göker, M., Voglmayr, H., Riethmüller, A. and Oberwinkler, F. (2007) How do obligate parasites evolve? A multi-gene phylogenetic analysis of downy mildews. *Fungal Genet. Biol.* **44**, 105–122.
- Gray, A.B., Sackston, W.E. and Thauvette, L. (1985) The development of infection structures of *Plasmopara halstedii* in suspensions of sunflower cells. *Can. J. Bot.* **63**, 1817–1819.
- Grenville-Briggs, L.J. and Van West, P. (2005) The biotrophic stages of oomycete–plant interactions. *Adv. Appl. Microbiol.* **57**, 217–243.
- Gulya, T.J., Tourvieille de Labrouhe, D., Masirevic, S., Penaud, A., Rashid, K. and Viranyi, F. (1998) Proposal for the standardized nomenclature and identification of races of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). In: *Sunflower Downy Mildew Symposium, Proceedings of Sunflower Downy Mildew Symposium*, International Sunflower Association Symposium III Fargo, ND, USA, pp. 130–136.
- Haas, B.J., Kamoun, S., Zody, M.C., Jiang, R.H.Y., Handsaker, R.E., Cano, L.M., Grabherr, M., Kodira, C.D., Raffaele, S., Torto-Alalibo, T., Bozkurt, T.O., Ah-Fong, A.M.V., Alvarado, L., Anderson, V.L., Armstrong, M.R., Avrova, A., Baxter, L., Beynon, J., Boevink, P.C., Bollmann, S.R., Bos, J.I.B., Bulone, V., Cai, G., Cakir, C., Carrington, J.C., Chawner, M., Conti, L., Costanzo, S., Ewan, R., Fahlgren, N., Fischbach, M.A., Fugelstad, J., Gilroy, E.M., Gnerre, S., Green, P.J., Grenville-Briggs, L.J., Griffith, J., Grünwald, N.J., Horn, K., Horner, N.R., Hu, C., Huitema, E., Jeong, D., Jones, A.M.E., Jones, J.D.G., Jones, R.W., Karlsson, E.K., Kunjeti, S.G., Lamour, K., Liu, Z., Ma, L., Maclean, D., Chibucos, M.C., McDonald, H., McWalters, J., Meijer, H.J.G., Morgan, W., Morris, P.F., Munro, C.A., O'Neill, K., Ospina-Giraldo, M., Pinzón, A., Pritchard, L., Ramsahoye, B., Ren, Q., Restrepo, S., Roy, S., Sadanandom, A., Savidor, A., Schornack, S., Schwartz, D.C., Schumann, U.D., Schwessinger, B., Seyer, L., Sharpe, T., Silvar, C., Song, J., Studholme, D.J., Sykes, S., Thines, M., van de Vondervoort, P.J.I., Phuntumart, V., Wawra, S., Weide, R., Win, J., Young, C., Zhou, S., Fry, W., Meyers, B.C., van West, P., Ristaino, J., Govers, F., Birch, P.R.J., Whisson, S.C., Judelson, H.S. and Nusbaum, C. (2009) Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature*, **461**, 393–398.
- Hammer, T.R., Thines, M. and Spring, O. (2007) Transient expression of *gfp* in the obligate biotrophic oomycete *Plasmopara halstedii* using electroporation and a mechanoperforation method. *Plant Pathol.* **56**, 177–182.
- Intelmann, F. and Spring, O. (2002) Analysis of total DNA by minisatellite and simple-sequence repeat primers for the use of population studies in *Plasmopara halstedii*. *Can. J. Microbiol.* **48**, 555–559.
- Ioos, R., Laugustin, L., Rose, S., Tourvieille, J. and de Labrouhe, D.T. (2007) Development of a PCR test to detect the downy mildew causal agent *Plasmopara halstedii* in sunflower seeds. *Plant Pathol.* **56**, 209–218.
- Kiefer, B., Riemann, M., Buche, C., Kassemeyer, H.H. and Nick, P. (2002) The host guides morphogenesis and stomatal targeting in the grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *Planta*, **215**, 387–393.
- Liu, Z., Gulya, T.J., Seiler, G.J., Vick, B.A. and Jan, C.C. (2012) Molecular mapping of the PI(16) downy mildew resistance gene from HA-R4 to facilitate marker-assisted selection in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* **125**, 121–131.
- Meliala, C., Vear, F., and Tournevielle de Labrouhe, D. (2000) Relation between date of infection of sunflower downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and symptoms development. *Helia*, **23**, 35–44.
- Mestre, P., Piron, M.C. and Merdinoglu, D. (2012) Identification of effector genes from the phytopathogenic oomycete *Plasmopara viticola* through the analysis of gene expression in germinated zoospores. *Fungal Biol.* **116**, 825–835.
- Michelmore, R.W. and Wong, J. (2008) Classical and molecular genetics of *Bremia lactucae*, cause of lettuce downy mildew. *Eur. J. Plant Pathol.* **122**, 19–30.
- Moinard, J., Mestries, E., Penaud, A., Pinochet, X., Tourvieille de Labrouhe, D., Vear, F., Tardin, M.-C., Pauchet, I. and Eychenne, N. (2006) An overview of sunflower downy mildew. *Phytoma—La Défense des Végétaux*, **589**, 34–38.
- Morris, P.F., Bone, E. and Tyler, B.M. (1998) Chemotropic and contact responses of *Phytophthora sojae* hyphae to soybean isoflavonoids and artificial substrates. *Plant Physiol.* **117**, 1171–1178.
- Mouzeyar, S., Tourvieille de Labrouhe, D. and Vear, F. (1993) Histopathological studies of resistance of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to downy mildew (*Plasmopara halstedii*). *J. Phytopathol.* **139**, 289–297.
- Mouzeyar, S., Delabrouhe, D.T. and Vear, F. (1994) Effect of host–race combination on resistance of sunflower, *Helianthus annuus* L., to downy mildew *Plasmopara halstedii*. *J. Phytopathol.* **141**, 249–258.
- Mulpuri, S., Liu, Z., Feng, J., Gulya, T.J. and Jan, C.C. (2009) Inheritance and molecular mapping of a downy mildew resistance gene, PI (13) in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **119**, 795–803.
- Musetti, R., Stringher, L., Borselli, S., Vecchione, A., Zulini, L. and Pertot, I. (2005) Ultrastructural analysis of *Vitis vinifera* leaf tissues showing atypical symptoms of *Plasmopara viticola*. *Micron*, **36**, 73–80.
- Nishimura, M. (1922) Studies in *Plasmopara halstedii*. *J. Coll. Agric. Hokkaido Imp. Univ.* **XI** (Pt 3), 185–210.
- Radwan, O., Bouzidi, M.F., Vear, F., Philippon, J., de Labrouhe, D.T., Nicolas, P. and Mouzeyar, S. (2003) Identification of non-TIR-NBS-LRR markers linked to the PI5/PI8 locus for resistance to downy mildew in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* **106**, 1438–1446.
- Radwan, O., Bouzidi, M.F., Nicolas, P. and Mouzeyar, S. (2004) Development of PCR markers for the PI5/PI8 locus for resistance to *Plasmopara halstedii* in sunflower, *Helianthus annuus* L. from complete CC-NBS-LRR sequences. *Theor. Appl. Genet.* **109**, 176–185.
- Radwan, O., Mouzeyar, S., Venisse, J.S., Nicolas, P. and Bouzidi, M.F. (2005) Resistance of sunflower to the biotrophic oomycete *Plasmopara halstedii* is associated with a delayed hypersensitive response within the hypocotyls. *J. Exp. Bot.* **56**, 2683–2693.
- Radwan, O., Gandhi, S., Heesacker, A., Whitaker, B., Taylor, C., Plocik, A., Kesseli, R., Kozik, A., Michelmore, R.W. and Knapp, S.J. (2008) Genetic diversity and genomic distribution of homologs encoding NBS-LRR disease resistance proteins in sunflower. *Mol. Gen. Genom.* **280**, 111–125.
- Radwan, O., Bouzidi, M.F. and Mouzeyar, S. (2011) Molecular characterization of two types of resistance in sunflower to *Plasmopara halstedii*, the causal agent of downy mildew. *Phytopathology*, **101**, 970–979.
- 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. *Plant Cell*, **17**, 1839–1850.
- Riethmüller, A., Voglmayr, H., Goker, M., Weiss, M. and Oberwinkler, F. (2002) Phylogenetic relationships of the downy mildews (Peronosporales) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia*, **94**, 834–849.
- Rozynek, B. and Spring, O. (2000) Pathotypes of sunflower downy mildew in southern parts of Germany. *Helia*, **23**, 27–34.

- Sackston, W.E. (1981) Downy mildew of sunflower. In: *The Downy Mildews* (Spencer, D.M., ed.), pp. 545–575. London: Academic Press.
- Schornack, S., van Damme, M., Bozkurt, T.O., Cano, L.M., Smoker, M., Thines, M., Gaulin, E., Kamoun, S. and Huitema, E. (2010) Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 17 421–17 426.
- Schruff, G. and Kassemeyer, H.H. (2000) *Krankheiten und Schädlinge der Weinrebe*. Gelsenkirchen: Verlag Th. Mann.
- Spring, O. (2000) Homothallic sexual reproduction in *Plasmopara halstedii*, the downy mildew of sunflower. *Helia*, **23**, 19–26.
- Spring, O. (2009) Transition of secondary to systemic infection of sunflower with *Plasmopara halstedii*—an underestimated factor in the epidemiology of the pathogen. *Fungal Ecol.* **2**, 75–80.
- Spring, O. and Zipper, R. (2000) Isolation of oospores of sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*, and microscopical studies on oospore germination. *J. Phytopathol.* **148**, 227–231.
- Spring, O. and Zipper, R. (2006) Evidence for asexual genetic recombination in sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*. *Mycol. Res.* **110**, 657–663.
- Spring, O., Rozynek, B. and Zipper, R. (1998) Single spore infections with sunflower downy mildew. *J. Phytopathol.* **146**, 577–579.
- Stassen, J.H.M. and van den Ackerveken, G. (2011) How do oomycete effectors interfere with plant life? *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**, 407–414.
- Thines, M. (2014) Phylogeny and evolution of plant pathogenic oomycetes—a global overview. *Eur. J. Plant Pathol.* **138**, 431–447.
- Thines, M. and Kamoun, S. (2010) Oomycete–plant coevolution: recent advances and future prospects. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**, 427–433.
- Torto, T.A., Li, S.A., Styer, A., Huitema, E., Testa, A., Gow, N.A.R., van West, P. and Kamoun, S. (2003) EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora*. *Genome Res.* **13**, 1675–1685.
- Tourvieille de Labrouhe, D., Pilorgé, E., Nicolas, P. and Vear, F. (2000) *Le Mildiou du Tournesol. Points Techniques*. Paris: INRA and CETIOM.
- Tourvieille de Labrouhe, D., Serre, F., Walser, P., Roche, S. and Vear, F. (2008) Quantitative resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus*). *Euphytica*, **164**, 433–444.
- Tourvieille de Labrouhe, D., Walser, P., Jolivot, D., Roche, S., Serre, F., Delmotte, F., Bordat, A., Godiard, L., Vincourt, P. and Vear, F. (2012) Proposal for improvement of sunflower downy mildew race nomenclature. In: *Proceedings of the 18th International Sunflower Conference, Mar del Plata, Argentina, March 2012*, pp. 322–327. Paris: International Sunflower Association.
- Tyler, B.M., Wu, M.H., Wang, J.M., Cheung, W. and Morris, P.F. (1996) Chemotactic preferences and strain variation in the response of *Phytophthora sojae* zoospores to host isoflavones. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2811–2817.
- Tyler, B.M., Tripathy, S., Zhang, X., Dehal, P., Jiang, R.H.Y., Aerts, A., Arredondo, F.D., Baxter, L., Bensasson, D., Beynon, J.L., Chapman, J., Damasceno, C.M.B., Dorrance, A.E., Dou, D., Dickerman, A.W., Dubchak, I.L., Garbelotto, M., Gijzen, M., Gordon, S.G., Govers, F., Grünwald, N.J., Huang, W., Ivors, K.L., Jones, R.W., Kamoun, S., Krampis, K., Lamour, K.H., Lee, M., McDonald, W.H., Medina, M., Meijer, H.J.G., Nordberg, E.K., Maclean, D.J., Ospina-Giraldo, M.D., Morris, P.F., Phuntumart, V., Putnam, N.H., Rash, S., Rose, J.K.C., Sakihama, Y., Salamov, A.A., Savidor, A., Scheuring, C.F., Smith, B.M., Sobral, B.W.S., Terry, A., Torto-Alalibo, T.A., Win, J., Xu, Z., Zhang, H., Grigoriev, I.V., Rokhsar, D.S. and
- Boore, J.L. (2006) *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science*, **313**, 1261–1266.
- Vear, F., Serieys, H., Petit, A., Serre, F., Boudon, J.P., Roche, S., Walser, P. and Tourvieille de Labrouhe, D. (2008a) Origins of major genes for downy mildew resistance in sunflower. In: *Proceedings of the 17th International Sunflower Conference, Cordoba, Spain*, pp. 125–130. Paris: International Sunflower Association.
- Vear, F., Serre, F., Jouan-Dufournel, I., Bert, P.F., Roche, S., Walser, P., Tourvieille de Labrouhe, D. and Vincourt, P. (2008b) Inheritance of quantitative resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica*, **164**, 561–570.
- Vincourt, P., As-Sadi, F., Bordat, A., Langlade, N.B., Gouzy, J., Pouilly, N., Lippi, Y., Serre, F., Godiard, L., Tourvieille de Labrouhe, D. and Vear, F. (2012) Consensus mapping of major resistance genes and independent QTL for quantitative resistance to sunflower downy mildew. *Theor. Appl. Genet.* **125**, 909–920.
- Viranyi, F. and Spring, O. (2011) Advances in sunflower downy mildew research. *Eur. J. Plant Pathol.* **129**, 207–220.
- Voglmyr, H., Rietmuller, A., Goker, M., Weiss, M. and Oberwinkler, F. (2004) Phylogenetic relationships of *Plasmopara*, *Bremia* and other genera of downy mildew pathogens with pyriform haustoria based on Bayesian analysis of partial LSU rDNA sequence data. *Mycol. Res.* **108**, 1011–1024.
- Wehtje, G. and Zimmer, D.E. (1978) Downy mildew of sunflower—biology of systemic infection and the nature of resistance. *Phytopathology*, **68**, 1568–1571.
- Wehtje, G., Littlefield, L.J. and Zimmer, D.E. (1979) Ultrastructure of compatible and incompatible reactions of sunflower to *Plasmopara halstedii*. *Can. J. Bot.* **57**, 315–323.
- 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**, 115–119.
- Wieckhorst, S., Bachlava, E., Dussle, C.M., Tang, S., Gao, W., Sasaki, C., Knapp, S.J., Schoen, C.C., Hahn, V. and Bauer, E. (2010) Fine mapping of the sunflower resistance locus *PLARG* introduced from the wild species *Helianthus argophyllus*. *Theor. Appl. Genet.* **121**, 1633–1644.
- Young, P.A. and Morris, H.E. (1927) *Plasmopara* downy mildew of cultivated sunflowers. *Am. J. Bot.* **14**, 551–558.
- Zahka, G.A. and Viranyi, F. (1991) Axenic culture of the downy mildew fungus *Plasmopara halstedii* in *Agrobacterium rhizogenes*-induced roots of sunflower (*Helianthus annuus*). *Can. J. Bot.* **69**, 2709–2715.
- Zimmer, D.E. (1971) A serious outbreak of downy mildew in the principal sunflower production area of the United States. *Plant Dis. Rep.* **55**, 11–12.
- Zimmer, D.E. (1975) Some biotic and climatic factors influencing sporadic occurrence of sunflower downy mildew. *Phytopathology*, **65**, 751–754.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Fig. S1 Various *Plasmopara halstedii* zoosporangiophores formed on sunflower tissues. Zoosporangiophore (Zp) carrying zoosporangia (Za) on cotyledon (a), hypocotyl tissue (b), emerging probably through a lenticel. (c, d) Zoosporangiophores formed on roots, near root hairs. Scale bars: 100 μ m (a, b); 50 μ m (c, d).

III. Lecture critique.

P. halstedii est un oomycète appartenant aux Peronosporales qui regroupent, au sein du règne des Stramenopila, la plupart des oomycètes phytopathogènes telle que la famille des *Phytophthora*. Néanmoins, sa taxonomie reste complexe comme en témoignent les évolutions importantes décrites dans les études publiées ces dernières années. De même que l'ensemble des Downy Mildew, *P. halstedii* est un biotrophe obligatoire. Cet agent pathogène attaque principalement le tournesol cultivé *Helianthus annuus* ; toutefois d'autres Astéracées telles que *Bidens*, *Artemisia* et *Xanthium* peuvent aussi être infectées et servir de réservoir d'inoculum (Figure). Partout où le tournesol est cultivé on retrouve *P. halstedii*, mais c'est majoritairement dans les plus gros pays producteurs (Russie, Ukraine, pays de l'UE) que cette maladie pose de réels problèmes économiques.

Lors de ces travaux, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'agent pathogène afin de mieux appréhender le danger dû au contournement des gènes de résistance utilisé pour protéger les cultures de tournesol et dont découle directement l'évolution de la virulence de *P. halstedii*.

La plupart des études rapportées dans cet article étant faites en comparant l'interaction entre *P. halstedii* et des lignées aux fonds génétiques éloignés, nous avons souhaité mettre en place un système modèle. Celui-ci nous permet d'observer l'interaction entre un couple de lignées quasi-isogéniques de tournesol présentant un comportement différentiel vis-à-vis d'un pathotype modèle de *P. halstedii* : Du côté agent pathogène, ce système est composé du pathotype 710 de *P. halstedii* qui, du fait de sa présence dans la région Midi Pyrénées, a été majoritairement étudié dans l'équipe (séquençage du génome, étude physiologique et microscopique de son interaction avec différentes lignées de tournesol), ce qui lui vaut d'être considéré comme notre pathotype de référence ; du côté de la plante de tournesol, nous avons utilisé les lignées quasi-isogéniques TS et TSRM respectivement sensible et résistante vis à vis du pathotype 710 de *P. halstedii*. Cependant, les résultats de génotypage réalisé sur ces lignées montrent que des rétrocroisements supplémentaires de TSRM avec TS sont nécessaires pour augmenter chez TSRM la part de fond génétique TS. Il semble en outre que le QTL de résistance quantitative QRM1-R (situé sur le LG10), présent chez XRQ et conférant une résistance quantitative au pathotype 710 ait été co-introgressé

Bidens



Artemisia



Xanthium



Figure 28: Planches botaniques (haut) et photos (bas) des hôtes satellites de *P. halstedii*.

en même temps que l'allèle résistant du locus *PI5* (données de génotypage avec des marqueurs proches). La lignée TSRM semble porter deux sources de résistance à *P. halstedii* : une résistance qualitative portée par le gène de résistance *PI5* et une résistance quantitative portée par le QTL QRM1-R. L'utilisation de rétrocroisements sur TSRM couplée à un génotypage des descendants permettrait de séparer ces deux sources de résistance dans deux lignées distinctes présentant le même fond génétique.

Au sein de ce système modèle, l'observation du développement de l'agent pathogène a été facilitée par la mise au point d'un protocole d'infection racinaire en condition d'hydroponie. Ce système présente l'avantage de travailler dans des conditions de culture permettant une croissance optimale de la plante et de l'agent pathogène. De plus les observations sont facilitées par l'absence relative d'autres microorganismes (culture quasi-axénique) et par un accès facile aux racines de la plante. Cependant, ces modalités ne reflètent pas les conditions présentes lors de l'infection du tournesol par *P. halstedii* dans le sol. Il faut donc prendre en compte le fait que les résultats obtenus par cette méthode, qui permet de décrypter des mécanismes en limitant les sources de variabilités environnementales, devraient ensuite être validés au champ pour transposer ces connaissances en agronomie.

A partir de ce système, nous avons observé, par MEB et microscopie optique, les mécanismes d'infection racinaire et foliaire ainsi que la croissance de l'agent pathogène dans les différents tissus de la plante. Les résultats de ces observations mettent en lumière la grande complexité du cycle de vie de l'agent pathogène.

En effet, suite à la germination des spores, *P. halstedii* va pénétrer dans la plante par trois mécanismes différents : (i) La formation d'un *appressorium* qui avait déjà été rapportée dans de nombreuses études, (ii) l'utilisation des ouvertures naturelles telles que des blessures au niveau de l'épiderme racinaire (Figure A), (iii) la « fusion » avec la surface racinaire (Figure B). Cependant, l'efficacité infectieuse des modes d'entrée (ii) et (iii) nécessite confirmation. Nous avons dans ce but observé en microscopie électronique à transmission (MET) des coupes transversales de feuilles et de racines (fixation dans une résine epxi-Epon-fixation/coloration PATAg contrastant les sucres des parois) afin de démontrer l'efficacité des différents mécanismes de pénétration de l'agent pathogène dans le tournesol (non montré). Cependant, probablement du fait que les événements d'infection de type (ii) et (iii) soient difficiles à observer en coupes transversales ultra-fines, seule l'efficacité d'infection après formation d'un *appressorium* a pu être

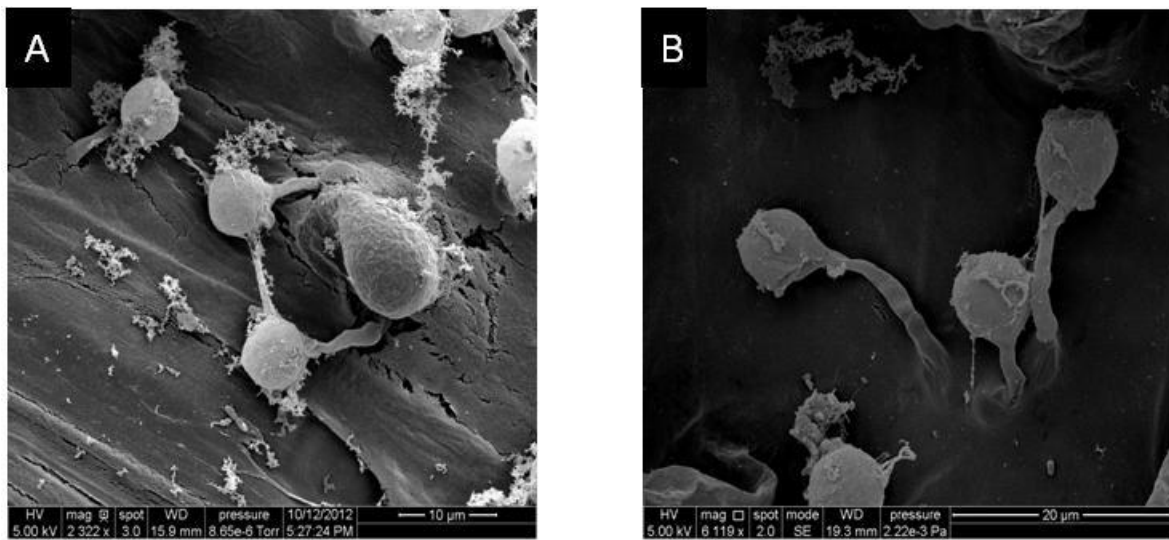


Figure 29: Structures annexes de pénétration dans les tissus de la plante. (A) Tube germinatif entrant par des blessures au niveau des poils racinaires. (B) Tube germinatif entrant par fusion dans les tissus racinaires de la plante.

confirmée par microscopie.

Le développement de l'agent pathogène vers les parties aériennes de la plante va se faire sous forme d'hyphes dans les espaces intercellulaires, tout en formant, au contact des cellules végétales, des structures extracellulaires d'infection/nutrition appelées *haustoria*. L'organisation des structures cellulaires au sein des hyphes non septés de l'agent pathogène est aujourd'hui inexplorée. Il serait pourtant intéressant d'étudier la composition des noyaux et leur organisation dans les hyphes de l'agent pathogène. En effet, chez certains champignons symbiotiques de la classe des *Glomeromycetes* et plus particulièrement chez le genre *Rhizophagus* présentant aussi des hyphes non septés, il a été montré que plusieurs noyaux de différentes origines pouvaient cohabiter chez un même isolat (Boon et al., 2010). Ces résultats suggèrent qu'un même organisme pourrait réguler l'expression des gènes en provenance de différents noyaux dans le temps mais aussi dans l'espace en contrôlant la localisation de ces derniers. Ainsi, ce mécanisme révèle un niveau supplémentaire de régulation génique qui pourrait permettre à un agent pathogène d'utiliser efficacement un arsenal de virulence plus large mettant ainsi en place des mécanismes mieux adaptés à sa plante hôte.

La colonisation systémique de la plante par l'agent pathogène se traduit dans un premier temps par une décoloration des feuilles et un nanisme des plantes. Plus tard, les tournesols infectés produiront des capitules infertiles conduisant à une perte importante de rendement. La gravité de ces symptômes est plus ou moins importante selon le niveau de résistance de la plante vis à vis de

l'agent pathogène qui l'infecte. Cependant, les mécanismes moléculaires à l'origine de ces symptômes observés sur le tournesol restent méconnus. Pour cette raison, nous ne les avons pas abordés dans cette revue. Ils constituent néanmoins des connaissances nécessaires pour définir de bons marqueurs d'évaluation de la virulence de l'agent pathogène à partir des symptômes. Par exemple nous ne savons pas si le nanisme observé sur les plantes sensibles résulte d'une manipulation hormonale de la plante par l'agent pathogène ou d'un épuisement de la plante parasitée (Evangelisti et al., 2014; Pieterse et al., 2012). De même, la cause de la décoloration des plantes le long des nervures des feuilles reste méconnue. Est-elle due à l'épuisement de la plante par le micro-organisme ou à une manipulation de la plante par l'agent pathogène ?

Lorsque les conditions sont réunies (forte humidité et température modérée) *P. halstedii* sort de la plante pour former des structures de dissémination (zoosporangiophores portant des zoosporanges) dont la forme semble dépendre du tissu végétal sur lequel il se trouve. Les zoospores produites par les zoosporanges sont alors capables d'infecter d'autres plantes au niveau de leurs parties aériennes telles que les feuilles. Lors des observations de feuilles de tournesol infectées à l'aide de gouttes d'eau contenant des zoospores (10^5 /ml), nous avons remarqué que, contrairement à *P. viticola*, les phénomènes d'entrée dans la plante par les stomates sont rares chez *P. halstedii*. En effet, *P. halstedii* semble utiliser préférentiellement, comme sur les racines, des *appressoria* pour pénétrer dans les tissus végétaux. Néanmoins, que ce soit dans le cadre des infections racinaires ou foliaires, l'absence d'études quantitatives en MET nous empêche de savoir avec quelles proportions ces mécanismes sont efficaces pour initier l'infection.

D'un point de vue agronomique, le mildiou a longtemps été un frein important à la culture du tournesol jusqu'à la découverte et l'utilisation de résistances génétiques totales (gènes *PI*) et quantitatives (ex : QRM1-R). Néanmoins, le contournement de ces gènes de résistance traduit une évolution rapide de *P. halstedii* avec l'apparition et le maintien d'isolats présentant une virulence accrue probablement issus de la sélection naturelle, bien que l'on ne puisse pas exclure les apports dus à des contaminations extérieures. Des études réalisées dans l'équipe ont permis d'identifier des gènes d'effecteurs putatifs de type CRN et RxLR Chez *P. halstedii* (As-sadi et al., 2011). Chez les microorganismes phytopathogènes, ces effecteurs jouent un rôle important comme facteur de virulence ou d'avirulence en fonction du génotype de l'hôte, et dans l'évolution du pouvoir pathogène (cf chapitre II). Chez *P. halstedii* ces effecteurs pourraient ainsi jouer un rôle important dans le contournement des gènes de résistances utilisés chez la plante.

Ces données constituent une base solide pour l'étude de la virulence de *P. halstedii* mais soulèvent également de nouvelles questions auxquelles il faudra répondre pour comprendre et modéliser ultérieurement la dynamique spatiotemporelle de l'interaction.

IV. Résultats complémentaires obtenus sur l'interaction en hydroponie entre TS/TSRM et le pathotype 710 de *Plasmopara halstedii*.

IV.A. Quantification de *P. halstedii* par Q-RT-PCR et localisation de régions clés dans la résistance chez TSRM.

Dans l'article 1 nous avons décrit les différences observées lors de la progression de l'agent pathogène dans les hypocotyles des lignées TS et TSRM à travers des observations en microscopie optique. Cette méthode présente l'avantage de donner accès à des informations qualitatives telles que la production d'*haustoria*, ou encore la mise en place par la plante de mécanismes de défense de type HR. Cependant, l'obtention de données quantitatives à partir des images de microscopie nécessite de se baser sur un grand nombre d'observations dont l'analyse demande des processus lourds de traitement d'images. De plus, les impératifs techniques liés à la préparation des échantillons rend difficile l'utilisation de cette méthode pour observer des quantités importantes d'échantillons, et ce malgré les efforts d'automatisation (Scanner de lames).

IV.A.1. Matériel et méthodes.

La mesure de l'expression des gènes de *P. halstedii* et de tournesol a été réalisée en collaboration avec Baptiste Majonade (LIPM). Le traitement statistique de ces données s'est fait en collaboration avec Marie-Françoise Jardinaud (LIPM).

IV.A.1.1) *Principes expérimentaux utilisés pour la quantification de P. halstedii.*

Pour étudier plus en détail la progression de l'agent pathogène dans la plante nous avons mis en place un protocole de quantification par PCR en temps réel (Q-RT-PCR) adapté au pathosystème modèle décrit dans l'article 1, sur le couple de lignées quasi-isogéniques TS et TSRM, infecté par le pathotype 710 ou non infecté. L'expérimentation a été réalisée sur les cDNAs obtenus à partir des ARN extraits de différents organes de la plante prélevés, au cours d'une cinétique comportant des temps précoces et des temps tardifs après inoculation, ou non traités (Figure). Le but initial de cette expérience sur puce Fluidigm contenant 90 lots d'amorces et 90 cDNA était de mesurer l'expression de 75 gènes d'effecteurs de *P. halstedii* (voir chapitre III), de 4 gènes de défense du tournesol et de 4 gènes constitutifs (2 exploitables) de *P. halstedii* afin de mesurer sa multiplication in planta.

Nous avons identifié comme références deux gènes de « ménage » dont l'expression varie peu en fonction des conditions physiologiques et expérimentales. Les gènes codants pour, (i) la protéine ribosomale WS21 (40S ribosomale protein S3a) et (ii) Ubc (Ubiquitine conjugaison enzyme) qui code pour une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine, ont été utilisés ensemble comme gènes de référence pour quantifier l'oomycète *Phytophthora parasitica* au cours des stades sexués, asexués, et de pathogénicité (Yan and Liou, 2006)). Leurs homologues ont été identifiés chez *P. halstedii* pour permettre la mesure de l'agent pathogène (tblastn parameters: matrix=BLOSUM62 expect value<0.0001).

Pour tenir compte de la variabilité biologique et expérimentale, les mesures d'expression des gènes ont été réalisées au cours de 3 répétitions biologiques indépendantes. La variabilité technique entraînant des différences de concentrations globales en ARNm entre les différents échantillons étudiés, a été prise en compte en normalisant l'expression des gènes de référence de l'agent pathogène par rapport à l'expression de sept gènes de ménages du tournesol précédemment utilisés par l'équipe, et dont nous avons vérifié la non-induction par l'infection (Rengel et al., 2012).

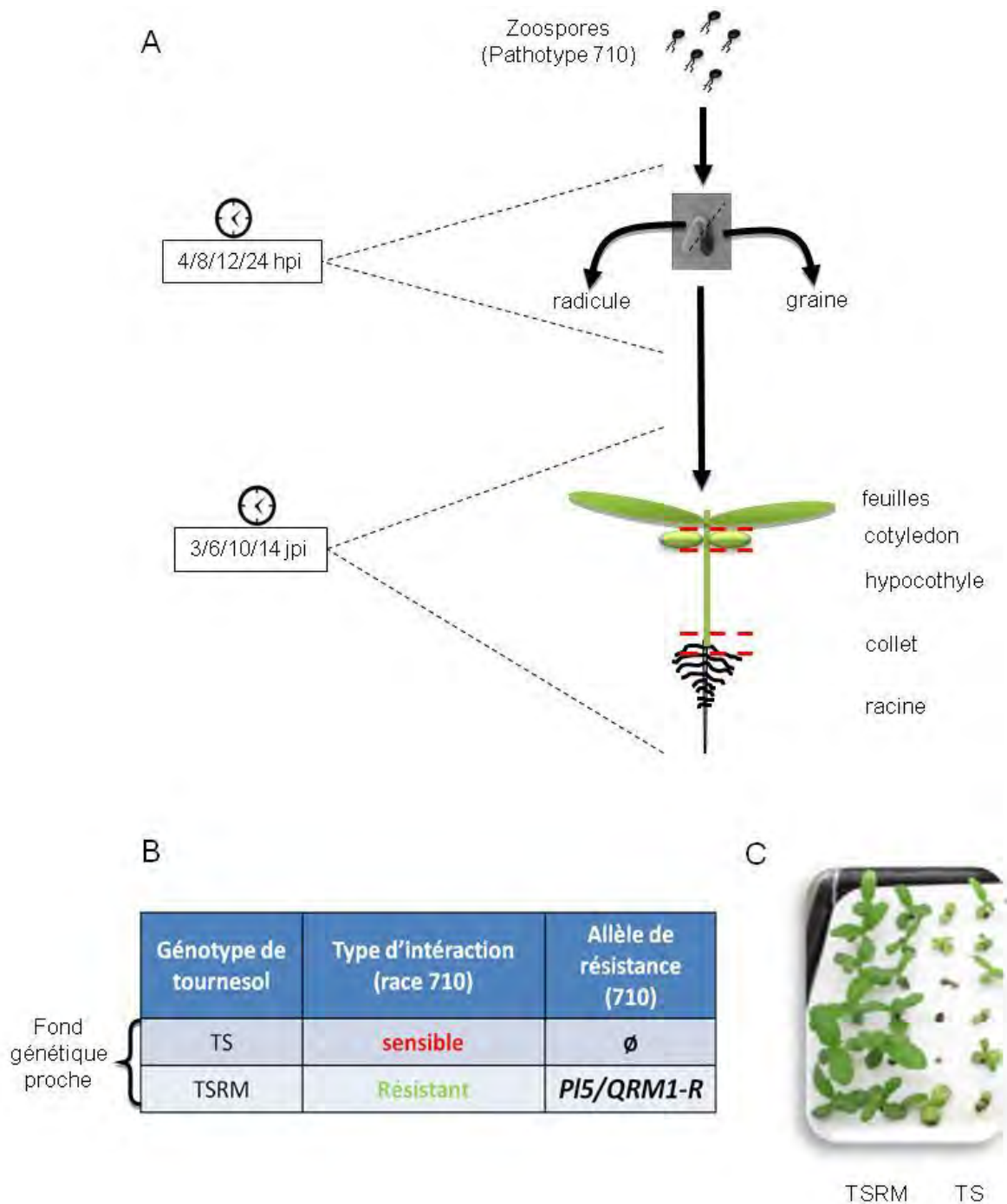


Figure 30: Plan expérimental visant à mesurer l'expression de gènes de l'agent pathogène et de la plante au cours de l'interaction. (A) Suite à l'infection des racines de plantes par des spores du pathotype 710 de *P. halstedii*, les premiers échantillons (graines et racicules) ont été prélevés à des temps précoces (4, 8, 12, et 24 heures post inoculation (hpi)). D'autres (feuilles, cotylédons, hypocotyles, collet, et racine), ont été prélevés à des temps plus tardifs (3, 6, 10, 14 jour post inoculation (jpi)). (B) Deux génotypes proches de tournesol TS et TSRM ont été utilisés dans cette étude. En condition de culture en terre et en hydroponie (C), TS et TSRM présentent respectivement un phénotype sensible ou résistant vis-à-vis du pathotype 710 de *P. halstedii*.

IV.A.1.2) Méthodes de quantification des données de Q-RT-PCR utilisant le calcul des ΔCt

La quantification par Q-RT-PCR de *P. halstedii* repose sur le calcul du ΔCt qui dépend de deux hypothèses. La première stipule qu'il y a une corrélation négative entre la quantité d'ADNc pour un gène d'intérêt et le nombre de cycles de PCR nécessaire pour dépasser un seuil de fluorescence lors de la PCR quantitative. Cette dernière valeur correspond au Ct (threshold cycle). La deuxième hypothèse suggère un rapport direct avec la quantité de molécules de cDNA présentes dans l'échantillon pour un gène donné, assimilables à la quantité d'ARNm et donc de l'expression d'un gène. Il est donc possible de mesurer l'expression d'un gène à travers son Ct.

La valeur de ΔCt est utilisée pour représenter l'expression relative d'un gène. Celle-ci correspond à la mesure de Ct (nombre de cycles de PCR nécessaires pour dépasser un seuil préalablement établi) pour un gène d'intérêt (dans notre cas le gène référence de *P. halstedii*) à laquelle on soustrait la valeur de Ct moyenne des gènes de référence de la plante. Ainsi le ΔCt représente le niveau d'expression d'un gène d'agent pathogène dans un échantillon normalisé par la quantité de gènes de référence de plante.

IV.A.2. Résultats de la quantification de *P. halstedii* dans le tournesol.

En mettant en parallèle, pour les mêmes échantillons, les résultats obtenus par cette méthode avec des observations en microscopie, (Figure 5 dans Gascuel et al., *in press*) nous avons montré la fiabilité de cette méthode pour décrire quantitativement la colonisation des tissus végétaux par *P. halstedii*. Cette méthode de quantification par Q-RT-PCR constitue donc un outil de choix permettant de remplacer l'observation microscopique pour déterminer la virulence de l'agent pathogène chez un génotype de tournesol.

Si aucune différence de colonisation des racines n'a pu être observée entre TS et TSRM infectés par le pathotype 710 de *P. halstedii* (quantité de pathogène en dessous du seuil de détection), des différences sont apparues au niveau des tissus aériens, hypocotyles et feuilles (Figure 30). A 3 dpi, il n'y a pas de différence significative dans les hypocotyles. Mais de 6 à 14 dpi, c'est à dire du moment où l'agent pathogène arrive dans les tissus aériens jusqu'à la sporulation à 14 dpi, les

valeurs de ΔCt sont significativement supérieures chez TS par rapport à TSRM (Figure A). Également dans les feuilles de tournesol (Figure B). Ces résultats indiquent qu'à partir de 6 dpi dans l'hypocotyle de la plante, la résistance du génotype de tournesol TSRM par rapport au génotype TS se matérialise, chez TSRM, par une expression moindre des gènes de référence de *P. halstedii*, que nous interprétons comme une multiplication moins importante de *P. halstedii* dans les tissus résistants. A 6 dpi, cette différence se caractérise par un ΔCt de l'ordre de 2 (différence d'expression d'un facteur 4 si on considère qu'il y a doublement du nombre de fragment PCR à chaque cycle) et peut atteindre jusqu'à plus de 5 ΔCt à 14 dpi (soit environ de 2^5). Cette diminution du développement de *P. halstedii* chez TSRM se retrouve très marquée dans les feuilles à 10 et 14 dpi (Figure B), de l'ordre de 10 à 12 ΔCt de différence.

Les gènes de référence choisis étant vraisemblablement conservés entre les différents pathotypes de *P. halstedii*, ils pourraient être utilisés pour quantifier le développement d'autres isolats appartenant à d'autres pathotypes, au sein de différents génotypes de tournesol. Il est aussi possible d'utiliser cette méthode pour tester la présence de *P. halstedii* sur les parcelles cultivées et dans les graines de tournesol. La mesure de l'expression de ces gènes pourrait ainsi permettre de compléter les travaux de Loos *et al.*, en 2007 et 2012, visant à contrôler la dissémination de l'agent pathogène par les semences (semences certifiées). Dans ces deux cas, il est possible de réaliser ces mesures directement sur l'ADN extrait à partir d'akènes broyés.

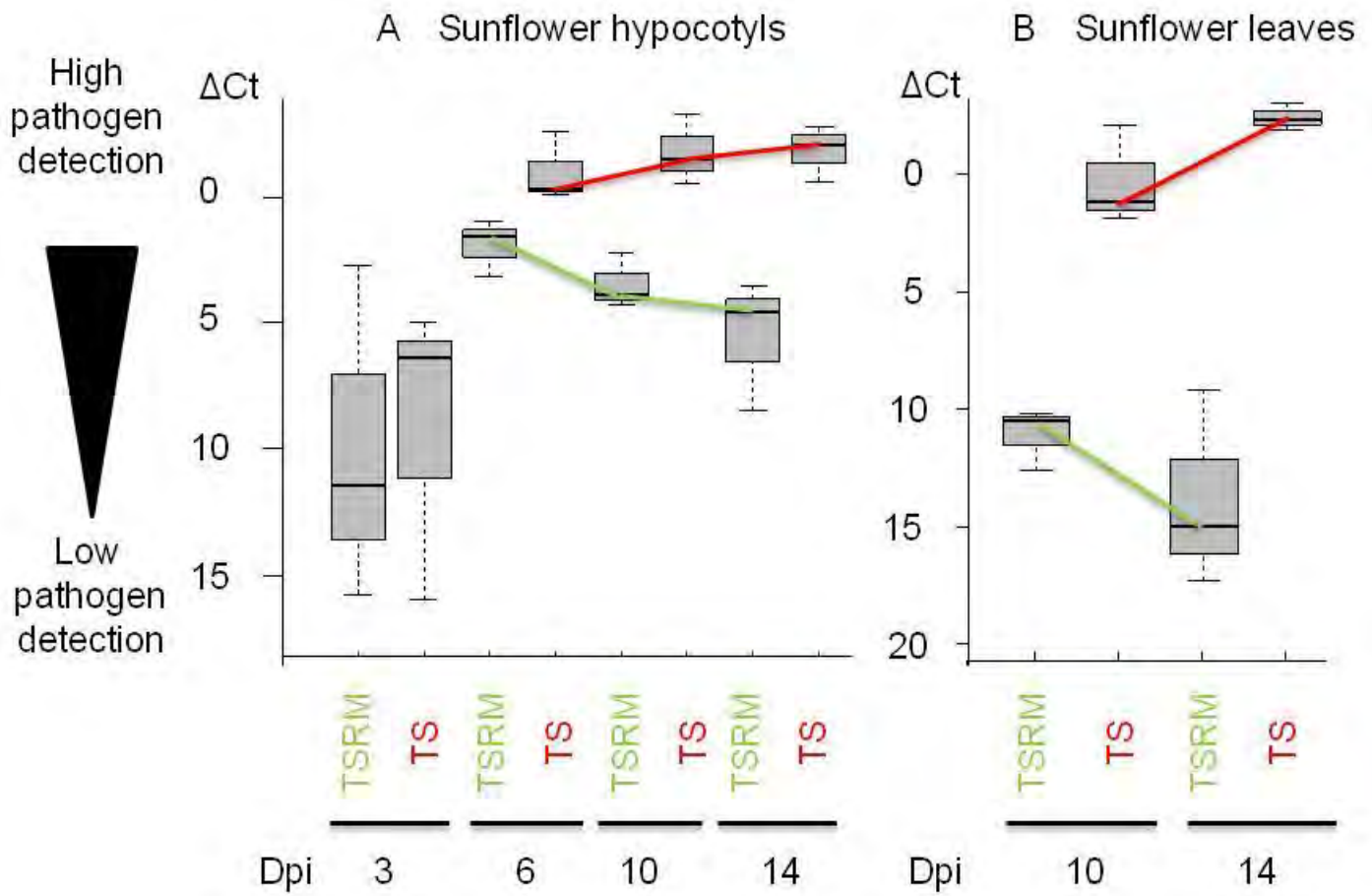


Figure 31: Quantification de *P. halstedii* dans les hypocotyles (A) et les feuilles (B) de tournesol TS et TSRM par mesure de l'expression des gènes de référence codant pour une protéine ribosomale et une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine. Les mesures ont été faites à 3, 6, 10, et 14 Dpi (Days post inoculation). Les données représentent les ΔCt (normalisation des $Ct_{P.halstedii}$ par rapport à la moyenne des $Ct_{ref\ plante}$) des 3 répétitions biologiques effectuées.

IV.B. Quantification de l'expression de gènes de défense chez TS et TSRM en réponse au pathotype 710 de *P. halstedii*.

Au cours de cette expérience, nous avons voulu caractériser la mise en place de mécanismes de défense de la plante, pouvant être à l'origine du ralentissement de croissance de *P. halstedii* observée chez TSRM. Nous avons mesuré l'expression de 4 gènes de défense végétaux dans les mêmes échantillons de cDNAs que précédemment (Figure). Ces gènes, connus pour être induits chez le tournesol lors d'attaques de mildiou (Radwan et al., 2005, 2011), sont :

- hsr203J-like, un marqueur de mort cellulaire programmée chez le tabac et qui a été montré comme induit chez *P. halstedii* lors de sa réaction incompatible avec le tournesol.
- Ha-PR5 (Pathogenesis-related Protein-5) qui code pour une protéine antimicrobienne de type thaumatine-like et Ha-PDF codant pour une défensine tout deux impliqués dans la Résistance Systémique Acquise (SAR).
- Ha-NPR1, l'homologue du gène NPR1 d'*A.thaliana*, qui joue un rôle important pour induire l'expression des gènes de défense PR permettant la transduction du signal Acide Salicylique (SA) (Pieterse and Van Loon, 2004))

A la différence des résultats de Radwan et al., en 2005 et 2011, au sujet des gènes hsr203J-like et Ha-NPR1, nous n'avons pas observé d'expression différentielle chez TS et TSRM et ce, quel que soit le tissu végétal. De plus, pour les gènes de défense PDF (défensine) et PR5, nous avons confirmé une induction des gènes dans l'hypocotyle chez la plante TS sensible contrairement aux résultats de Radwan et al., en 2011 qui observait une induction de ces gènes uniquement dans le cadre de l'interaction incompatible. Cette induction chez les plantes sensibles TS est surtout visible aux temps tardifs de la cinétique, lorsque l'agent pathogène est présent en grande quantité dans la plante toute entière. Ces résultats laissent penser que les gènes de défense étudiés chez le tournesol ne sont certainement pas directement liés à la résistance de TSRM mais à d'autres mécanismes responsables du retard de croissance observé chez le génotype résistant TSRM.

Une autre hypothèse est que l'expression de ces gènes ne serait pas détectable chez TSRM du fait d'une trop faible quantité de *P. halstedii* dans les tissus de la plante. Nous pouvons donc conclure

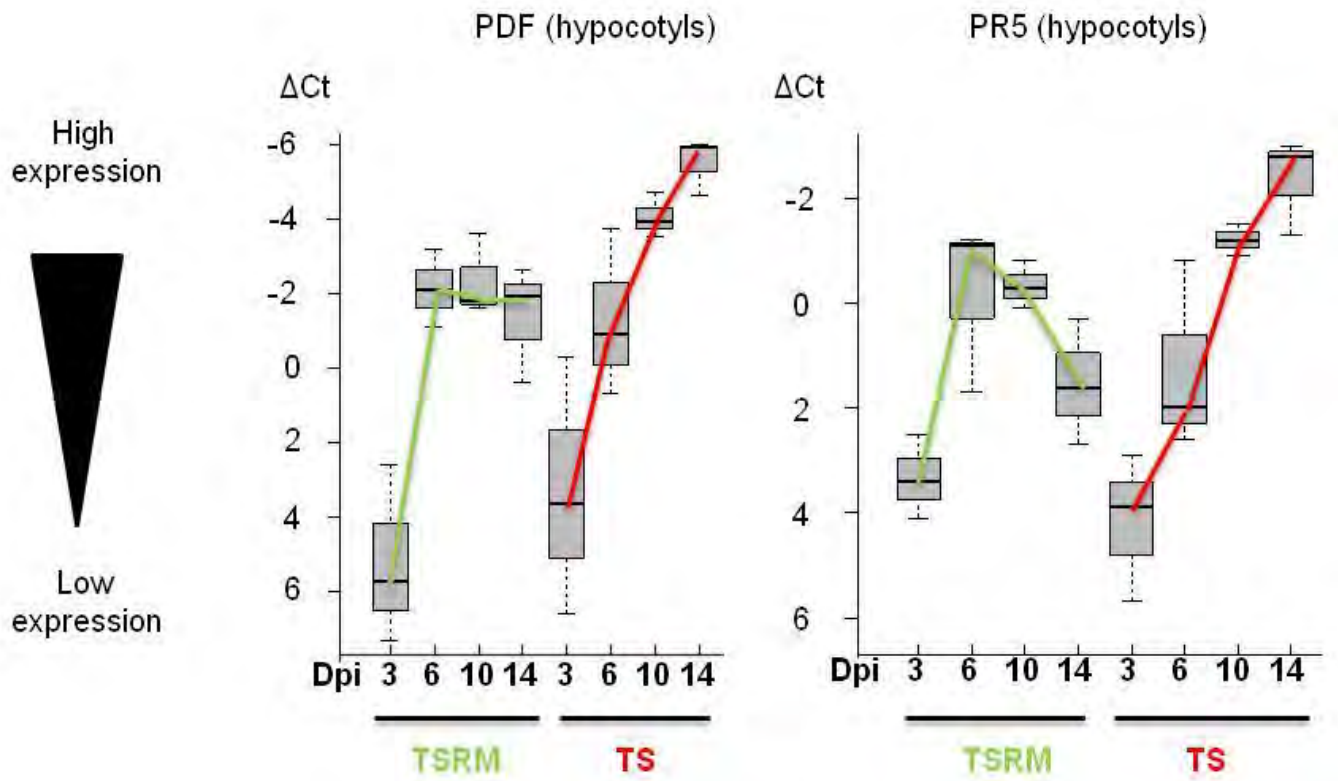


Figure 32 : Mesure de l'expression des gènes de défense PDF (A) et PR5 (B) dans les hypocotyles de tournesol TS et TSRM. Les mesures ont été faites à 3, 6, 10, et 14 Dpi (Days post inoculation). Les données représentent les ΔCt (normalisation des Ct_{def} par rapport à la moyenne des $Ct_{ref\ plante}$) des 3 répétitions biologiques effectuées.

qu'aucun des 4 gènes testés ne représente de bons marqueurs de défense dans notre pathosystème, lignées TS et TSRM infectées par le pathotype 710 de *P. halstedii*.

Pour identifier l'arsenal défensif déployé par la plante contre *P. halstedii*, il serait intéressant de comparer de façon globale l'expression des gènes des lignées de tournesol TS et TSRM en conditions infectées et en conditions non infectées. Pour cela plusieurs méthodes existent. Premièrement, l'utilisation de biopuces à ADN permet de quantifier par hybridation l'expression de gènes dont on connaît la séquence. Lorsque l'on ne connaît pas la séquence des gènes dont on souhaite mesurer l'expression, il est possible de séquencer sans a priori les ARNm produits par les deux organismes en interaction. On considère alors que le taux d'expression d'un gène est proportionnel au nombre de fois où l'ARNm correspondant a été séquencé (technologie RNA-seq). Cette méthode permet ainsi de mesurer l'expression de gènes inconnus tout en acquérant leurs séquences. Ces données peuvent par la suite être utilisées pour annoter un génome.

Pour l'étude des mécanismes de défense de la plante, nous avons comparé la production de molécules anti-microbiennes de type phytoalexines dans le cadre d'interactions compatibles et incompatibles. Les premiers résultats obtenus n'ont pas montré une production plus importante dans le cadre de l'interaction incompatible entre la variété de tournesol TSRM et le pathotype 710 de *P. halstedii*, suggérant que d'autres mécanismes seraient responsables de la résistance de TSRM. A l'inverse la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) semble être induite spécifiquement chez TSRM lors de son interaction avec le pathotype avirulent 710 de *P. halstedii*.

V. Conclusion.

Cette étude nous a permis d'améliorer nos connaissances globales sur l'interaction entre *P. halstedii* et le tournesol. Nous avons également développé un pathosystème modèle entre le pathotype 710 de *P. halstedii* et les lignées quasi isogéniques de tournesol TS et TSRM ou d'autres couples de lignées quasi-isogéniques en cours de construction dans l'équipe. La mise en place d'outils de microscopie et de biologie moléculaire ainsi que la caractérisation fine de ce pathosystème permettent d'étudier l'implication des effecteurs de *P. halstedii* sur la virulence de l'agent pathogène (Chapitre III).

Chapitre II: Étude du polymorphisme inter et intra pathotype des effecteurs de *P. halstedii* et définition de marqueurs de pathotypes basés sur des effecteurs polymorphes.

I. Contexte.

Les résistances utilisées pour protéger le tournesol contre *P. halstedii* ont rapidement été contournées par des isolats toujours plus virulents, entraînant des pertes économiques significatives, y compris celles liées au coût de la gestion des gènes de résistance disponibles. L'évolution rapide de la virulence des isolats de *P. halstedii* soulève de nombreuses interrogations concernant les déterminants moléculaires sous-jacents. Aujourd'hui, le spectre d'hôte des isolats de *P. halstedii* est analysé à travers leur profil de virulence sur 15 variétés de tournesols permettant ainsi de les classer en pathotypes (Chapitre I). Ces tests de phénotypage (aussi appelés « tests terre ») permettent de connaître le profil de virulence d'un isolat de *P. halstedii* et sont utilisés dans le cadre du suivi épidémiologique assuré par le GEVES afin d'orienter les agriculteurs sur les variétés de tournesol à utiliser pour lutter contre *P. halstedii*. Cependant, le phénotypage des isolats émergents de *P. halstedii* se fait sur des spores vivantes et nécessite l'utilisation de chambres de cultures en confinement L3 qui, couplée à la durée importante de ces tests (> 4 semaines), rend difficile leur utilisation à grande échelle et limite de ce fait le suivi épidémiologique de la maladie.

A travers l'évolution rapide de la virulence de *P. halstedii*, on assiste à une course à l'armement entre les agents pathogènes et leurs hôtes respectifs. En effet, l'issue de l'interaction entre les deux protagonistes dépend du contenu (i) en effecteurs présents dans le génome de l'agent pathogène et (ii) en gènes de résistance ou de défense présents chez la plante. Notre hypothèse est que, compte tenu des résultats obtenus sur des pathosystèmes analogues, les effecteurs de

P. halstedii joueraient un rôle important dans l'évolution de la virulence du pathogène en permettant de contourner rapidement les résistances utilisées au champ.

Cette hypothèse est appuyée par un polymorphisme en acides aminés plus important chez les effecteurs que chez les non-effecteurs du génome de *P. halstedii*. Nous avons donc utilisé la variabilité des effecteurs pour sélectionner un ensemble de marqueurs moléculaires permettant de constituer un outil de diagnostic des pathotypes de *P. halstedii* qui, par sa rapidité et sa facilité d'utilisation, devrait supplanter les « tests terres ». Ainsi, cet outil devrait faciliter le suivi épidémiologique de l'agent pathogène. De plus, les résultats obtenus lors de l'étude du polymorphisme des effecteurs de *P. halstedii* soulèvent de nombreuses questions quant à l'impact que pourraient avoir ces protéines sur l'évolution de la virulence de *P. halstedii*.

II. Article 2: Polymorphic effectors of the sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*, used as tools for identification of field isolates, suggest a dynamic evolution of pathogen virulence.

(Nous souhaitons soumettre ce manuscrit à « Plant Biotechnology journal » avant ma soutenance. Il est donc possible que le manuscrit final comporte des modifications par rapport à cette version)

Polymorphic effectors of the sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*, used as tools for identification of field isolates, suggest a dynamic evolution of pathogen virulence.

GASCUEL Quentin, BORDAT Amandine, SALLET Erika, POUILLY Nicolas, CARRERE Sébastien, DELMOTTE François, ROUX Fabrice, VINCOURT Patrick* and GODIARD Laurence*.

*co-last authors

Key words: effector polymorphism; *Plasmopara halstedii*; *Helianthus annuus*; pathogen virulence evolution; obligate biotrophe oomycete.

Running title: Effector polymorphism and virulence profile of *P. halstedii*

Abstract (250 words):

The non-model obligate biotroph oomycete *Plasmopara halstedii* causes downy mildew on sunflower crop, *Helianthus annuus*. The differential responses of its interaction with sunflower genotypes led to classify it in pathotypes. During the last 25 years, numerous pathotypes showing increased virulence emerged in crop settings and were responsible for breakdown of sunflower resistance in several areas. Taking advantage of recent available molecular data, we studied the variability among *P. halstedii* pathotypes of effector genes, key players of pathogen virulence in model oomycetes, in order to design molecular typing tools of natural pathogen isolates based on putative virulence genes.

The genetic diversity of 54 putative Crinkler (CRN) or RXLR effector genes identified from transcriptomic data was analysed in genomic data of seven *P. halstedii* pathotypes. Effector genes, and particularly CRN, showed a higher proportion of non-synonymous mutations than random selected non-effector genes, suggesting that they are under selection. Two types of effectors were identified: (I) monomorphic effector genes potentially involved in basal virulence, and (II) polymorphic effector genes potentially involved in host specialization.

Polymorphic effector genes were used to design KASP (Competitive Allele Specific PCR) molecular markers in order to discriminate *P. halstedii* pathotypes by PCR-based tests. Twenty-two non redundant KASP markers were genotyped on 35 isolates belonging to 14 *P. halstedii* pathotypes. A determination key based on eight KASP effector markers is proposed to distinguish 10 out of 14 pathotypes, aiming at rapid pathotype diagnostic of emerging field isolates and better survey of plant resistance breakdown in the field.

Introduction

Sunflower (*Helianthus annuus*) which produces healthy oil is the fourth most widely grown oil crop in the world after oil palm, soybean and rapeseed, but ranks second in European Union. In contrast to other summer and/or oil crops, sunflowers can grow under low inputs (water, soil fertilizers and fungicides). Sunflower total production increased by 32 % over the past 20 years, reaching 38 million tons in 2012 (FAO stat <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>). Downy mildew caused by the oomycete *Plasmopara halstedii* is one of the major diseases affecting sunflower crop production (for a review on *P. halstedii*, see Gascuel *et al.*, in press). *P. halstedii* infection may severely impact sunflower seed yield through either damping off of young seedling, or on-going disease symptoms which in turn induce dwarfing, infertility of heads and reduced plant population. The global impact on yield has been recently estimated to be at 3.5% in the presence of control methods currently deployed (chemical treatments, genetic resistances and crop management), but damage can reach up to 100% in contaminated fields, which may ultimately lead to the abandonment of sunflower cultivation (CETIOM, Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains, www.cetiom.fr). To avoid downy mildew disease occurrence, modern sunflower cultivars carry at least one *PI* gene conferring resistance to downy mildew. However, the recent appearance of new *P. halstedii* isolates showing increased virulence likely explains the breakdown of several *PI* resistance genes used in sunflower hybrids during the last 20 years (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2000; Moinard *et al.*, 2006, Ahmed *et al.*, 2012).

P. halstedii is a biotrophic and homothallic oomycete belonging to the Peronosporales, the largest and most devastating plant pathogen group of oomycetes

including the hemibiotrophs of the genus *Phytophthora*, causing late blight diseases, and an important group of biotroph oomycetes causing downy mildews (Thines and Kamoun, 2010). First described in United States (Nishimura, 1922; Young and Morris, 1927), this disease was then reported worldwide mostly in zones where sunflowers are largely cultivated, that is, in North America and in Europe, especially in France, Germany and Russia. *P. halstedii* has been submitted to quarantine regulation since 1992. *P. halstedii* isolates are classified in pathotypes that are defined by an international nomenclature system based on differential virulence profiles on a set of sunflower inbred lines having different resistance patterns (Gulya *et al.*, 1998, Tourvieille *et al.*, 2012). *P. halstedii* pathotypes have been until now designed by a 3-digit number recently completed to a 5-digit nomenclature (Tourvieille *et al.*, 2012). Pathotype determination of *P. halstedii* isolates is therefore based only on phenotypic tests performed in controlled growth chambers, on seedlings of defined sunflower differential lines, inoculated by the isolate of interest, grown on soil and recorded as resistant (no leaf sporulation) or susceptible (leaf or cotyledon sporulation) two weeks after inoculation (Mouzeyar *et al.*, 1994, Gascuel *et al.*, in press).

Downy mildew was one of the main obstacles to sunflower cultivation for many years, until the discovery and use in cultivated sunflower hybrids of the *Pl 1* dominant resistance gene which protected the crop against pathotype 100, the first pathotype to be referred (Mouzeyar *et al.*, 1995). Because of downy mildew impact on sunflower crop cultivation in France, French Ministry of Agriculture started in 1988 to monitor disease prevalence by collecting *P. halstedii* isolates across all the sunflower crop areas where the disease appeared and characterizing their pathotypes (Ahmed *et al.*, 2012). The number of recorded *P. halstedii* pathotypes raised from 1 in 1987 to 14 in 2011, with an associated increased virulence on the differential sunflower lines used to give them a pathotype name (Ahmed *et al.*, 2012). For each of 14 pathotypes, an isolate was chosen as representative of the pathotype and thereafter called "reference isolate". These 14 reference isolates were classified in three distinct clusters according to 12 CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) or SSCP (single-strand conformation polymorphism) markers designed on *P. halstedii* expressed sequence tags (ESTs) (Delmotte *et al.*, 2008). These clusters could have resulted from three independent *P. halstedii* introductions in France, and inter-cluster recombination could have facilitated the rapid emergence of pathotypes with increased virulence (Ahmed *et al.*, 2012).

Molecular diagnostic tools should be a precise alternative way (i) to rapidly discriminate *P. halstedii* into pathotypes as compared to phenotypic tests handling living spores, and (ii) to follow the emergence of new field isolates.

For their developmental cycle, plant pathogenic oomycetes rely on pathogenicity factors called effectors that modify the metabolism of the host to their benefit and enable pathogenicity (Bozkurt *et al.*, 2012; Pais *et al.*, 2013; Wawra *et al.*, 2012). The role of pathogenic effectors is to suppress plant immunity and to allow infection. Oomycete effectors are secreted by pathogens in plant cell apoplast via haustorial structures, and a signal peptide is usually detected in their N-terminal part (Schornack *et al.*, 2009). In contrast to apoplastic effectors that stay in the apoplastic space (Kamoun *et al.*, 2006), cytoplasmic effectors translocate into host cell cytoplasm and target different subcellular compartment to increase pathogen virulence (Stassen and Van den Ackerveken, 2011). Based on conserved domains, two major classes of cytoplasmic effectors were identified in oomycete genomes, respectively RXLR-dEER for RXLR effectors and LXLFLAK for Crinkler (CRN). These domains are necessary and sufficient for the effectors to be translocated into host cell cytoplasm (Schornack *et al.*, 2010; Whisson *et al.*, 2007). CRN effectors present a characteristic modular structure composed of an N-terminal conserved region including the LXLFLAK motif and extending until an HVLVVVP motif, followed by a variable C-terminal domain (Haas *et al.*, 2009). CRNs are secreted proteins initially described as inducing crinkling and necrosis following by ectopic expression in planta (Torto *et al.*, 2003). The necrotic activity of several CRN has been shown as dependent on their addressing to the nucleus of the host plant but the role of most CRN proteins is still unknown (Schornack *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010; Stam *et al.*, 2013; van Damme *et al.*, 2012). Whereas CRN have been described in all oomycete species, RXLR effectors seem to be restricted to the Peronosporales group (Schornack *et al.*, 2010). Alternative RXLR_like (QXLR, GKLR) translocation motifs have been described in secreted proteins of some oomycetes (Tian *et al.*, 2011; Stassen *et al.*, 2012; Links *et al.*, 2011). Several RXLRs have been reported as being recognized by plant resistance (R) genes or to act as suppressors of plant innate immunity (Bos *et al.*, 2006; Fabro *et al.*, 2011; Vleeshouwers *et al.*, 2008). Direct plant targets of RXLR proteins have been characterized in few cases (Bos *et al.*, 2010; Bozkurt *et al.*, 2012; Saunders *et al.*, 2012; Caillaud *et al.*, 2013).

In a co-evolutionary context, plants molecular mechanisms were selected due to their role in pathogen recognition and resistance mechanisms that in turn, pathogens could suppress depend on their effectors content. This arm race has been illustrated by the zigzag model of plant pathogen interactions (Jones and Dangl, 2006) and fits well to the case of oomycete pathogens (Hein *et al.*, 2009). Repertoires of hundreds of effector proteins, localized either in the plant cell apoplast or cytoplasm have been described in genome of model oomycetes, whatever their life styles and the diseases they conferred : in five hemibiotroph *Phytophthora* species (Tyler *et al.*, 2006; Haas *et al.*, 2009; Kunjeti *et al.*, 2012; Lamour *et al.*, 2012; Stam *et al.*, 2013), in necrotroph pathogens as *Pythium ultimum* (Levesque *et al.*, 2010), and in obligate biotroph oomycetes among Peronosporales and Albuginales (Baxter *et al.*, 2010; Stassen *et al.*, 2012; Links *et al.*, 2011; Kemen *et al.*, 2011).

Studies on the organisation and the dynamic of the effector repertoire at the genome level have been reported for some pathogens, whose genomes have been completely sequenced. A comparison of 19 genomes of *Pseudomonas syringae*, a bacterial pathogen of many crop species, indicated both the presence of conserved (core) effectors and of a variable effector repertoire underlying differences in virulence across host plants, and highlighted the dynamic role of effectors on virulence evolution (Baltrus *et al.*, in 2011). Cytoplasmic effector genes of the oomycete *Phytophthora infestans* have been localized in regions characterized by low gene density and high density of transposable and repeated elements that favour mutations and recombination (Haas *et al.*, 2009; Cooke *et al.*, 2012). In these dynamic repeat-rich regions, accelerated effector gene evolution has been shown to be associated with pathogen virulence adaptation in *Ph. infestans* lineage (Raffaele *et al.*, 2010). The emergence of an aggressive and invasive isolate of the oomycete *Ph. infestans*, breaking down potato blight resistance in Great Britain, has been associated to deletion and acquisition in its effector repertoire, especially RXLRs (Cooke *et al.*, 2012). In addition, molecular variation in a particular effector gene known to be essential in the interaction with the plant can provide insights on the evolution of pathogen virulence. For example, the *ATR13* effector alleles from *Hyaloperonospora arabidopsidis* presented a high level of non-synonymous mutations that altered recognition specificity of the encoded proteins by the Arabidopsis Resistance protein RPP13 (Allen *et al.*, 2008). Additionally, structural variations in the genome could modify either the protein sequences themselves or affect corresponding

gene expression. For example, coordinated transcriptional regulation at the genome level has been shown for *Ph. infestans* effectors (Seidl et al., 2012), and translational recoding processes altering protein synthesis, such as programmed ribosomal frameshifting (PRF), is employed by many economically important plant viruses (Giedroc and Cornish, 2009). Dynamic organization and polymorphism in effector sequences and expression among pathogen isolates could therefore impact pathogen virulence and constitute a melting-pot for new variants involved in host adaptation.

If molecular mechanisms underlying pathogen virulence start to emerge for model oomycete species, those mechanisms in *P. halstedii* are still unknown. In particular, its effector repertoire has just started to be analysed (Gascuel et al., in press). Despite the economic importance of sunflower downy mildew, genomic resources for *P. halstedii* were recently obtained (As sadi et al., 2011, Gascuel et al., in press).

High throughput transcriptomic analyses performed on *P. halstedii* infected sunflower plants allowed the identification of 20 putative effector genes, 5 RXLR and 15 CRN suggesting that *P. halstedii* shares the same type of effectors as found in model oomycetes (As Sadi et al., 2011).

In this study, we present the identification of 54 *P. halstedii* putative effector genes from transcriptomic data, as well as an in-depth analysis of their genetic polymorphism in seven sequenced *P. halstedii* pathotypes representative of the species variability (Delmotte et al., 2008). Effector Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) were used to design 22 KASP (Competitive Allele Specific PCR) markers that were further genotyped to describe the diversity of effectors in a set of 35 isolates belonging to 14 *P. halstedii* pathotypes.

Ten *P. halstedii* pathotypes were discriminated using a combination of eight of these pathotype-specific markers. The putative roles of *P. halstedii* effectors were discussed depending on their polymorphism levels among and within pathotypes. Because polymorphism analyses allowed the identification of effector genes linked to the virulence profile of *P. halstedii*, we proposed to use this approach on putative effector genes as a screen to identify key genes in pathogen virulence. Polymorphism studies on *P. halstedii* effectors suggest a dynamic evolution of pathogen virulence.

Results

- **Selection of *P. halstedii* putative RXLR and CRN effectors**

The strategy we adopted to find putative effectors is summarized in Figure 1. A PSI-TBLASTN (Altschul *et al.*, 1997) search was realized on cDNA databases including *P. halstedii* and *H. annuus* sequences using an annotated oomycete effector gene database generated from Genbank (As-Sadi *et al.*, 2011; Mestre *et al.*, data not shown). PSI-TBLASTN analysis was performed starting from transcriptomic data, in order to work on expressed genes during the interaction and to avoid pseudogenes that would have been selected by genomic data based *in silico* approaches. cDNA consensus sequences present in these databases and named Plhalxxxxxx, resulted from the clustering of ESTs coming from inoculated sunflower and *P. halstedii* spores of the four reference isolates (100, 304, 703, 710) (Mestre *et al.*, data not shown). In order to obtain genomic sequences of each *P. halstedii* pathotype, BLASTN searches were done on draft genomic sequences of the seven *P. halstedii* reference isolates (100, 304, 334, 700, 703, 710, 730), representative of the species variability at the phenotypic level, as defined by Gulya *et al.* (1998). Only genomic sequences were used for further analyses.

Candidate effector genes were selected when their predicted protein sequences fulfilled at least two of the three following criteria: (i) presence of conserved translocation domains, (ii) detection of a signal peptide, as checked with SignalP 3.0 (Bendtsen *et al.*, 2004) and (iii) a size between 50 and 300 amino acids for RXLR and more than 50 amino acids for CRN.

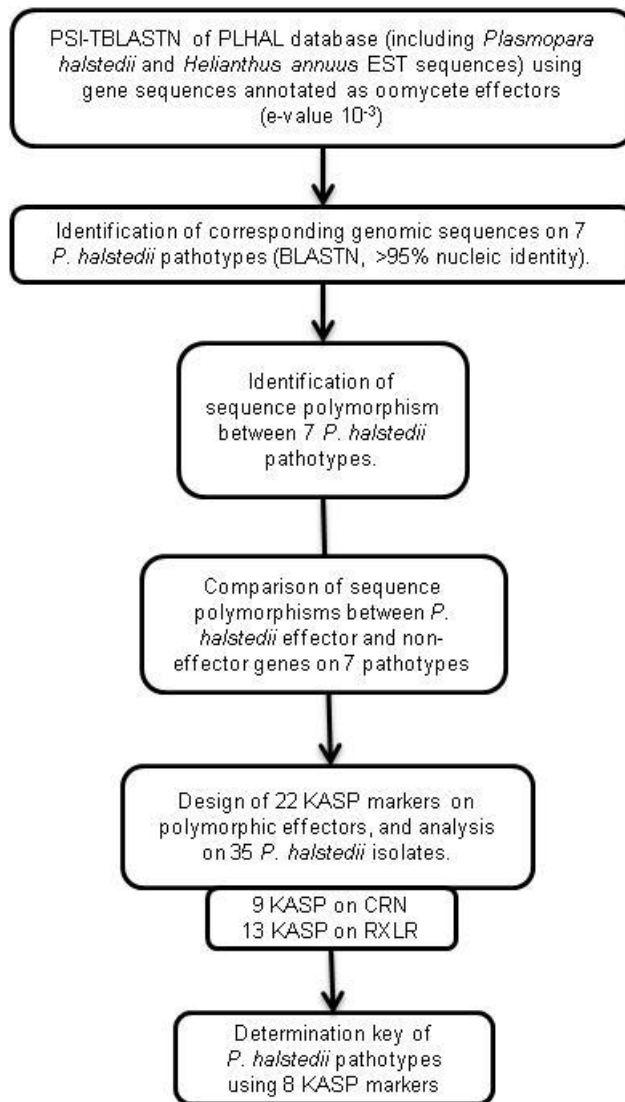


Figure 1 : Workflow of the study. KBioscience Competitive Allele-Specific PCR (KASP).

By this pipeline, we identified 54 putative effector genes, hereafter named 'effectors', with 27 RXLR and 27 CRN listed on the web page https://www.heliagene.org/Web/INRA/Plasmopara_marker/Plasmopara_halstedii_effectors_polymorphism.xml). Amongst the 27 RXLR-type effectors, 11 have the RXLR motif consensus and three present an alternative RXLQ motif. An EER motif was present after the RXLR motif in 11 cases, and 13 effectors presented only the EER motif alone. Amongst the 27 CRN-type effectors, seven have the LXLFLAK motif and six have an alternative LXLSLAK motif, each of them followed by the HVLVVVP consensus. Five CRN present a LXLYLAK domain followed for three of them by the HVLVVVP motif. Other CRN-type effectors have variant motives (table Web). Presence of conserved effector motives found in effectors from other oomycete species, and/or high PSI-TBLASTN values against the oomycete effector database (43 genes show e-values smaller than 10^{-8} , see table Web) suggest that these genes are reliable effector candidates. According to genomic organization, we noticed that four *P. halstedii* effector genes were found on the same genomic scaffold (group 1: PhRXLR05, PhRXLR02.1, PhRXLR02.2 and PhRXLR32; group 2: PhCRN35.1, PhCRN35.2; group 3: PhRXLR31, PhCRN17.4, see table Web).

- ***P. halstedii* effector genes present more non synonymous SNP than random non-effector genes**

Based on the draft genomic sequences of seven *P. halstedii* pathotypes, multifasta and multalin alignments (Corpet *et al.*, 1988) of nucleic acid coding sequences (NA) and corresponding predicted amino acid (AA) sequences are provided for each of the 54 effectors on the following website (See table Web). While 17 effector genes were monomorphic, 37 effector genes (15 RXLR and 22 CRN) exhibited at least one SNP in the set of the 7 sequenced pathotypes. To test whether the patterns of polymorphism observed on the 54 effector genes differs from the patterns of polymorphism observed in the genomic background, we randomly selected 125 non-effector genes (see experimental procedures). The percentage of polymorphic genes is more than two fold higher for the effector genes (68.5 %) than for the

non-effector genes (30.4%). This percentage misestimates both the number of SNP per gene, and the number of SNP per gene size (SNP density). To study polymorphism more accurately, we compute the minimum average distance between two polymorphisms (SNP sparseness) among each polymorphic genes from both classes. In order to stabilize the variance in the two samples (effector and non effector genes), a square-root transformation was done on the raw data $\{\text{length}/(\text{SNP number} + 1)\}$, and the resulting variable is thereafter called “SNP sparseness index”.(Figure 2a, for NA). Compared to effector genes, a higher sparseness of SNPs (i.e. a shorter distance between two SNPs) was found for non-effector genes. A similar analysis performed on AA revealed the distributions of non-synonymous SNPs (Figure 2b). These distributions were found different (Kolmogorov-Smirnoff test, P -value=2.34 E-05 for NA; P -value=3.55 E-04 for AA), showing for effector genes higher frequencies of high polymorphism densities and non synonymous mutations levels. Supporting our method, we also found that the nucleotide diversity (P_i) is more important for effector genes compared to non-effector genes (Figure S1, Table S1).

- ***P. halstedii* effectors present polymorphism in putative Programmed Ribosomal Frameshifting patterns**

For six effectors, a region annotated as protein coding from a unique cDNA molecule resulted from two different successive open reading frames (ORF). This was identically found in the predicted proteins from genomic data of the seven sequenced pathotypes. We first checked that the sequences were correct in the cDNA due to elevated number of 454 sequenced reads, and in the genomic sequences due to a deep HiSeq sequencing. These observations were reminiscent of a nonstandard decoding process used by bacteria and viruses called Programmed Ribosomal Frameshifting (PRF) or programmed transcriptional realignment (PTR) if the transcriptional realignment is required for the expression of a gene (Sharma *et al.*, 2011; Xie, 2013; Giedroca et Cornish, 2009). Without this process, a full length protein cannot be produced. PRF process is based on specific nucleic sequences, like A_AA.A_AA.C (here codons in the initial frame are separated by underscores and dots separate codons in the new frame) (Sharma *et al.*, 2011).

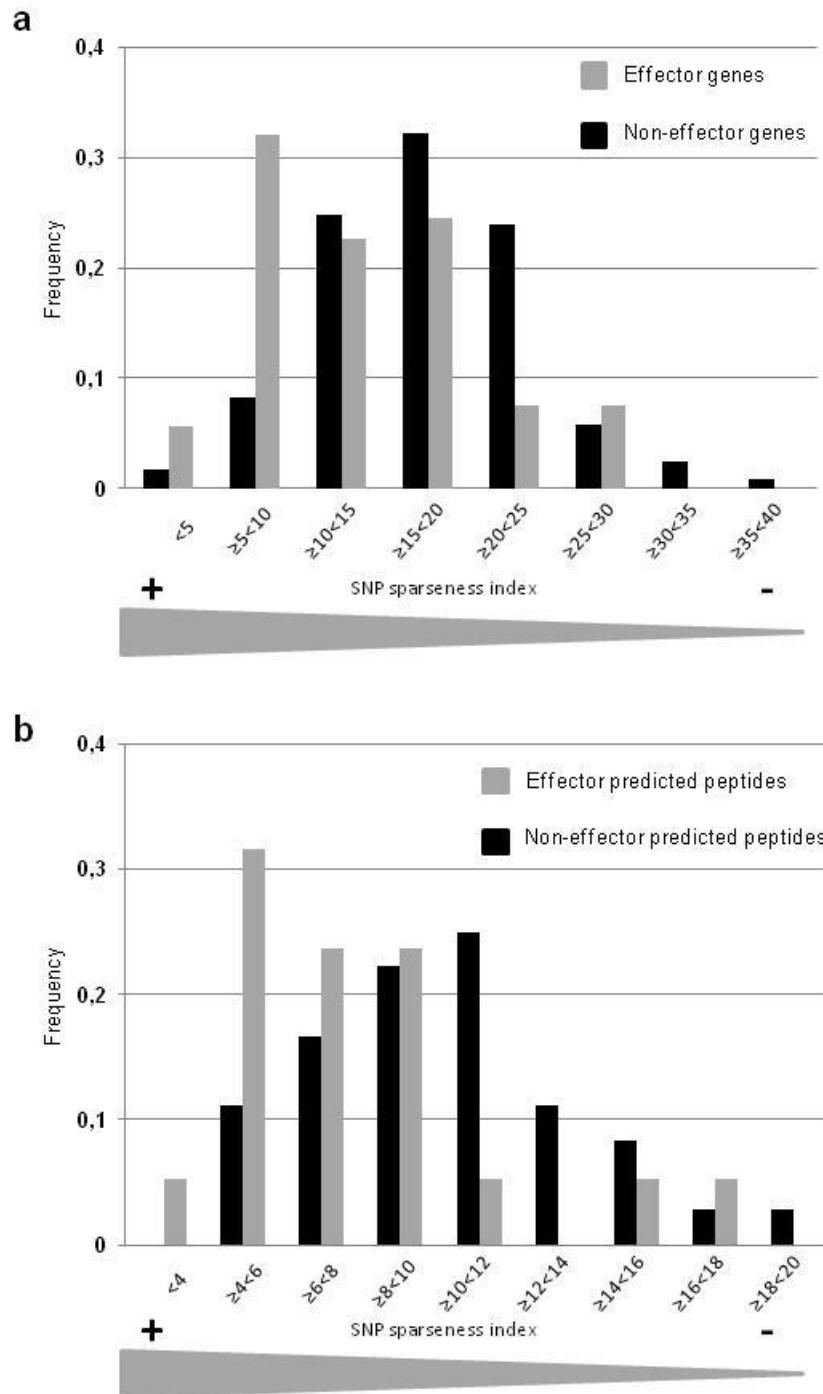


Figure 2: Comparison of polymorphism distributions (represented by sparseness index) in *P. halstedii* effector (grey) and non-effector genes (black). (a) Frequency of genes in each class of SNP sparseness index. (b) Frequency of predicted peptides in each class of polymorphism amino acid sparseness index.

This PRF pattern was found in PhCRN07.3 and PhCRN10.2 *P. halstedii* effectors (see table Web). Interestingly, PhCRN10.2 effector presented the canonical PRF pattern (A_AA.A_AA.C) for all the pathotypes except for pathotype 700 showing a modified PRF pattern (A_AA.G_AA.C), which might disrupt this protein or change amino acid sequence in pathotype 700 (see multalin alignments on the table web). In five other effectors (PhCRN07.2, PhCRN12, PhCRN17.1, PhRXLR18, PhRXLR58), a genomic frameshift was necessary to fit to the complete translated cDNA sequence, but in this case with unpublished PRF patterns. According to their high levels of polymorphism, we concluded that *P. halstedii* effector genes should be good candidates to design markers and to use them as a tool for discriminating pathotypes.

- **Genotyping 35 isolates belonging to 14 *P. halstedii* pathotypes with KASP markers based on effector SNPs**

We then designed KASP markers (KBioscience Competitive Allele-Specific PCR) on polymorphic effectors with the purpose to develop a high throughput genotypic tool for discriminating pathotypes. KASP technology was chosen because it is suitable for every SNP and user-friendly when genomic facilities are available. Out of 34 KASP markers designed on polymorphic effectors and tested on the 14 *P. halstedii* reference pathotype isolates, 22 were selected as non-redundant markers revealing polymorphism on 8 CRN and 8 RXLR effector genes (Table S2, Figure 3).

To take into account possible variation among isolates within a given pathotype and to identify robust pathotype markers, the 22 KASP markers were genotyped on 21 *P. halstedii* additional isolates collected from different locations in France from 1993 to 2007 and belonging to 8 *P. halstedii* pathotypes (Table 1). Representative of pathotype occurrence in France (Ahmed *et al.*, 2012), a total of 1 to 6 isolates including the reference isolate were tested per pathotype. Indeed, the six reference isolates having no partner isolate correspond either to absent (330), rare (300, 307, 707), or recently emerging (730, 774) French pathotypes.

SNP marker	100* ref1	100 h376	300 ref	304* ref	304 h142	304 hb17	307 ref	314 ref	314 hb20	330 ref	334* ref	334 h102	334 h130	700* ref	700 h714	703* ref	703 h392	703 h389	703 hb531	703 hb750	703 hb920	707 ref	710* ref	710 h116	710 hb399	710 hb409	710 hb606	714 ref	714 h115	714 hb619	714 hb740	714 hb745	730* ref	774 ref		
PhCRN02_1	C	C	C	C	C	C	C/T	C/T	C/T	C/T	T	T	T	C/T	C/T	G	G	G	G	G	G	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	C/T	T		
PhCRN07_1.1	A	A	A	A	A	A	G	G/A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
PhCRN20_1	A	A	A	A	A	A	A	A/C	A	C	C	C	C	A/C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
PhCRN30_1.1	A	A	A	A	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
PhCRN30_2.1	T	T	T	T	T	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
PhCRN31_1	G	G	G/A	G	G	G	G	G	G	G	A	A	A	G/A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
PhCRN31_2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	C	C	C	C	G/C	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
PhCRN33_1	T	T	T	T	T	T	T	T	C/T	C/T	C	C	C	C/T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T		
PhCRN34_1	T	T	T	T	T	T	A	T	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
PhXR01_1	T	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
PhXR08_1	A	A	A	A	A	A	A	A/T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
PhXR08_2	T	T	T	T	T	T	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
PhXR08_4	G	G	G	G	G	G	A	A/G	A	A/G	G	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
PhXR15_1	G	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G	A/G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
PhXR15_3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A/G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
PhXR18_1	A	A	A	A	A	A	A	T	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
PhXR31_1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	A	A	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
PhXR31_2	T	T	T	T	T	T	T	C	C	C	C	C	C	T/C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	
PhXR32_2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
PhXR35_1	G	G	G	G	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
PhXR35_2	T	T	T	T	T	T	A	T	T	A	T	T	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
PhXR58_1	T	T	T	T	T	T	T	-	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	

Figure 3: Genotypes of 14 reference isolates (_ref) and 21 geographical isolates of *P. halstedii* with KASP markers based on effector gene SNPs. The DNA base involved in polymorphism is indicated by a specific colour. Heterozygous DNA bases are separated with a slash. (-) sign corresponds to the absence of the indel. Pathotypes with genomic draft sequences (*). Non determined results (nd).

Among the eight pathotypes represented by several isolates, KASP genotyping results revealed two distinct patterns (Figure 3). We defined as « homogeneous » pathotypes five of them for which all isolates had the same genotype for all tested markers (100, 304, 334, 703, 710), and as « heterogeneous » three others in which the genotypes were different depending on the isolate for at least one marker (314, 700 and 714). For example, while the six isolates of pathotype 703 showed no intra-pathotype polymorphism, the six isolates of pathotype 714 presented 5 different allelic profiles.

Similarly, homogeneous and heterogeneous markers for a given pathotype could be distinguished (Figure 3). Only 3 markers (i.e. PhCRN02_1, PhCRN34_1 and PhRXLR35_2) out of the 22 tested were homogeneous for each of the eight multi-isolates *P. halstedii* pathotypes. The 19 others were heterogeneous for at least one of the 8 multi-isolates pathotypes. For example PhRXLR01.1 marker was homogeneous for all pathotypes except 714.

The majority of the effector markers were homozygous in most of the 35 *P. halstedii* isolates. Heterozygosity was observed for the two reference isolates 314 and 700 for five to eight markers, and to a lesser extent for the reference isolates 330 and 714_h745 (three to four markers).

KASP marker PhCRN02_1 revealed amplifications of two different alleles for most isolates (25/35) (Figure 3), suggesting either PCR amplification of paralogs or the positive selection of the heterozygous status at one single locus. One CRN (PhCRN31) and four RxLR (PhRXLR08, PhRXLR15, PhRXLR31, PhRXLR35) genes carry two non-redundant KASP markers per gene showing different allelic combinations among pathotypes. This result suggests that intragenic recombination may have occurred into these five effector genes, resulting in very low linkage disequilibrium (Figure 3).

KASP markers analyses highlighted the great genetic variability of chosen effectors among *P. halstedii* pathotypes. In the following, we aimed to build a molecular key for *P. halstedii* pathotype determination selecting markers homogeneous among all isolates of a given pathotype.

ID	pathotype	localization	Collection date
h376	100	Drôme	1993
h142	304	Gers	2006
h617	304	Puy-de-Dôme	2007
h620	314	Puy-de-Dôme	2007
h102	334	Charente	2004
h130	334	Charente-Maritime	2004
h714	700	Gers	2007
h392	703	Lot-et-Garonne	1993
h389	703	Gers	1993
h531	703	Gers	2007
h750	703	Tarn-et-Garonne	2007
h920	703	Gers	2007
h116	710	Meuse	2004
h399	710	Allier	1993
h409	710	Maine-et-Loire	1993
h606	710	Puy-de-Dôme	2007
h115	714	Charente	2004
h619	714	Puy-de-Dôme	2007
h790	714	Puy-de-Dôme	2007
h740	714	nd	2007
h745	714	nd	2007

Table 1:

- **Construction of key for assistance in pathotype determination:**

Based on KASP genotyping data, a two-level key was constructed in order to improve pathotype identification of field isolates (Figure 4). At the first level (Key 1), three homogeneous markers with no intra-pathotype polymorphism, PhCRN02_1, PhCRN34_1 and PhRxLR35_2, were used. Key 1 separated the 14 *P. halstedii* pathotypes in five groups (group A=100, 300, 304/ group B=307, 700, 703, 730/ group C=314, 710, 714/ group D=330, 707/ group E=334, 774).

At the second level (Key 2), we used homogeneous markers within each group of Key 1, without considering their genotypes in other groups. PhCRN31_1 was used to distinguish pathotypes in group A (i.e. pathotypes 100 and 304 from pathotype 300), PhCRN20_1 and PhRxLR32_2 to distinguish the four pathotypes of group B, PhCRN33_1 and PhRxLR32_2 to distinguish pathotype 710 from other pathotypes of group C. Finally, PhRxLR58_1 and PhCRN20_1 were used to distinguish pathotypes within groups D and E, respectively.

Pathotypes 100 and 304 from group A and pathotypes 314 and 714 from group C could not be separated by the 22 KASP markers tested. Isolate 314_h620 presented a genotypic profile very similar to that of 714_h115 isolate. In this particular case, pathogenic profiles differing only by their pathogenic response on one sunflower differential line RHA-274, phenotyping errors could not be excluded. This highlights the importance of adding 6 new sunflower lines in the classification by infection tests (Tourvieille *et al.*, 2012).

Based on eight KASP markers designed on five CRN and three RXLR effectors, the proposed determination key discriminated 10 *P. halstedii* pathotypes and two groups of two pathotypes, the latter still requiring to be differentiated by phenotyping tests.

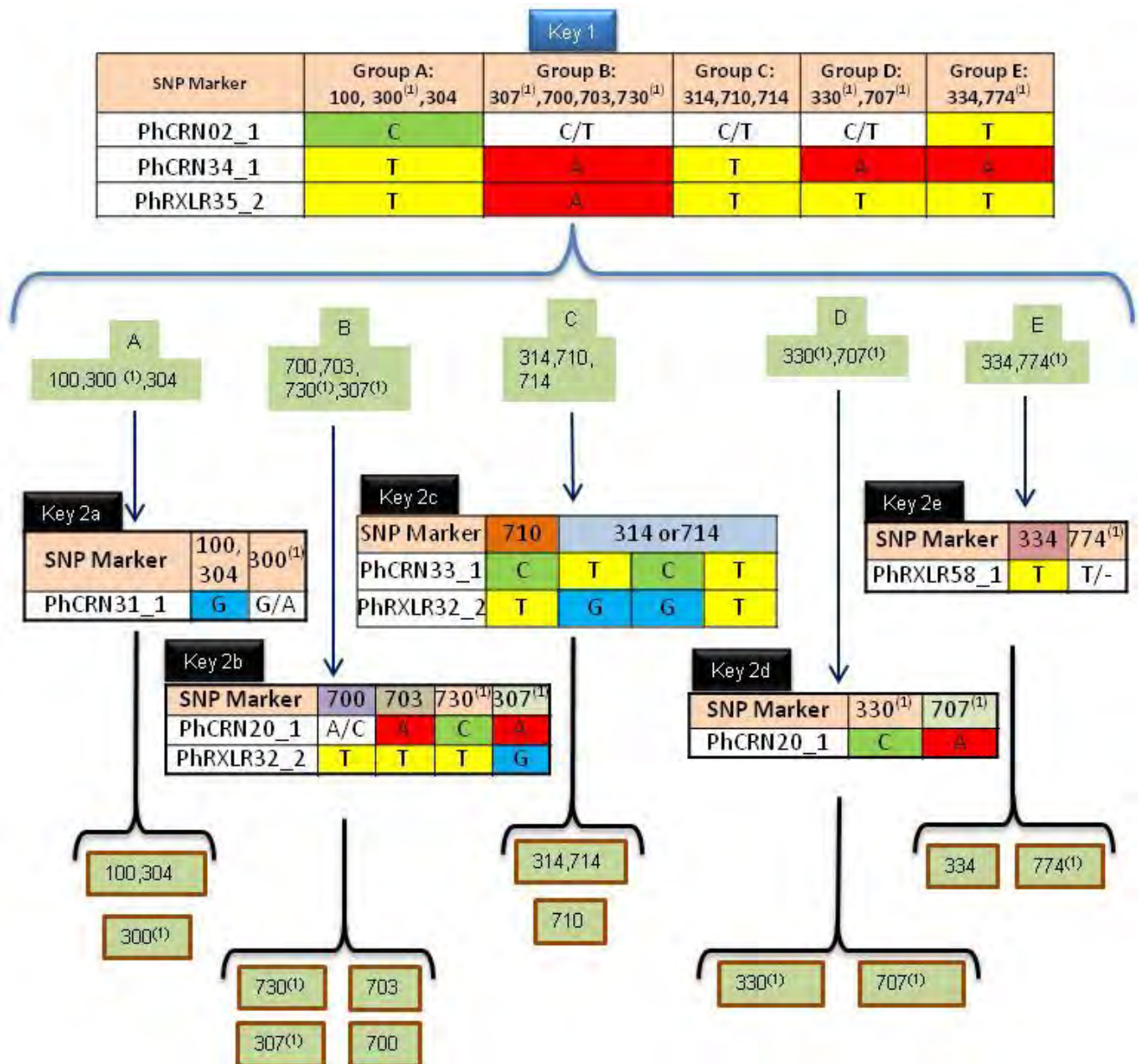


Figure 4 : Determination key of *P. halstedii* pathotypes using KASP markers designed on effector gene SNPs. First level (Key 1) separated the 14 *P. halstedii* pathotypes in 5 groups with 3 markers. Second level (Key 2) used five other markers to distinguish 10 *P. halstedii* pathotypes. 100 and 304, 314 and 714 pathotypes could not be distinguished. ⁽¹⁾ *P. halstedii* pathotypes having only one isolate.

- **Are effector genotyping data linked to virulence profiles of *P. halstedii* pathotypes?**

To test whether an association can be established between effector polymorphisms and virulence profiles of *P. halstedii* pathotypes, we estimated, using the Mantel procedure, the coefficient of correlation between the matrix of pairwise genetic distances between pathotypes calculated from effectors KASP genotyping data, and the matrix of pairwise phenotypic distances between the same pathotypes calculated from their specific responses when interacting with the nine sunflower differential lines (D1 to D9, Figure 5a, Figure S2). Phenotypic distances were significantly correlated with genetic distances (Spearman correlation $\rho = 0.365$, p-value = 0.0066; Figure 5a). Adding the six new sunflower lines recently proposed to be added to international nomenclature (Tourvieille *et al.*, 2012) even led to a stronger correlation between phenotypic and genetic distances (Spearman correlation $\rho = 0.450$, p-value = 0.0003; Figure 5b). This result suggests that effector genotyping data can be representative of *P. halstedii* virulence profiles.

More precisely, we observed a strict association was found in two cases (Figure 6): (i) the susceptibility of the differential line D4 (PMI3) to the pathotypes 334, 710 and 730 was found associated with the presence of an arginine (R) instead of a cysteine (C) in the PhCRN33 sequence (see https://www.heliagene.org/Web/INRA/Plasmopara_marker/Plhal040004_to_PLHAL.all.AA.gif), (ii) the susceptibility of both D7 (HAR4) and D8 (QHP1) to the pathotype 703 was found associated with the presence of a lysine (K) instead of a glutamic acid (E) in the PhRXLR15 sequence (https://www.heliagene.org/Web/INRA/Plasmopara_marker/Plhal011563_to_PLHAL.all.AA.gif). We then considered the genotyping data provided on isolates by the KASP approach as a first step to confirm these putative associations (Figure 6). For the PhRXLR15 effector, the glutamic acid to lysine change was found in the pathotypes 307 and 707, which are also virulent on the D7 and D8 differential lines. For the PhCRN33 effector, the arginine was found in most samples of the 714 pathotypes as well as in the pathotypes 730 and 774, all of these pathotypes being virulent on the line D4. However, these rules could not be applied to the

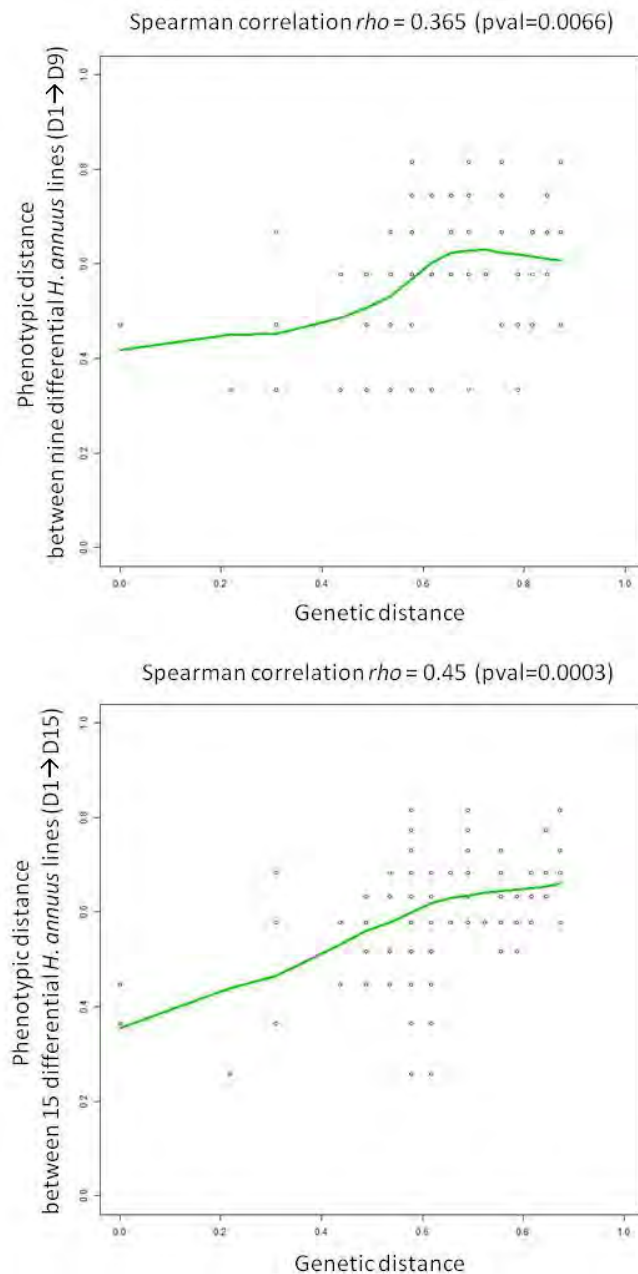


Figure 5 : Correlation between genetic distance and phenotypic distance based on (a) nine differential *H. annuus* lines, and (b) 15 differential *H. annuus* lines. Phenotypic distances between the differential *H. annuus* lines were computed on their virulence profile (presence/absence of symptoms), using the simple matching coefficient (Dillmann *et al.* 1997). Genetic distances between the differential *H. annuus* lines were also computed using the simple matching coefficient, based on 21 KASP markers developed on effector genes (PhCRN02_1 was excluded); for the remaining KASP markers, heterozygous genotypes (<5%) at a given KASP marker were replaced by the most common allele. The relationship between the phenotypic and genetic distance matrices was estimated by the Spearman correlation coefficient according to the Mantel test (10 000 permutations).

heterogeneous pathotype 314 (either R or C in amino acid sequences) and for pathotype 330 which showed heterozygosity at PhCRN33 marker.

While these observations clearly need to be confirmed on larger-scale studies involving more effectors and isolates, our approach led to select potentially key virulence effectors suitable to be evaluated through further functional studies.

A

Effector allele and resistance pattern	100	304	710	730	703	700	334
PhCRN33	B	B	A	A	B	B	A
D4	R	R	S	S	R	R	S
PhRXLR15	B	B	B	B	A	B	B
D7	R	R	R	R	A	R	R
D8	R	R	R	R	A	R	R

B

Marker (SNP) name	100*	100	300	304*	304	304	307	314	314	330	331*	334	334	700*	700	703*	703	703	703	703	703	703	707	730*	730	730	730	730	714	714	714	714	714	714	730*	774
PhCRN33_1	C	C	C	C	C	C	C	C	R	C/R	R	R	R	C/R	C	C	C	C	C	C	C	C	C	R	R	R	R	R	C	R	R	R	R	R	R	R
PhRXLR15_1	E	E	E	E	E	E	K	E	E	E	E	E	E	E/K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	
PhRXLR15_3	K	K	K	K	K	K	E	K	K	K	K	K	K	E/K	E	E	E	E	E	E	E	E	E	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	

Figure 6 : Association between genetic profiles of effector markers (PhCRN33 and PhRXLR15) in *P. halstedii* sequenced pathotypes (100/304/710/730/703/700/334), and resistance (R) or susceptibility (S) profiles of sunflower lines (D4, D7 and D8). For PhCRN33_B marker, 1 represented allele B and 0 represented allele A, and for PhRXLR15_A marker, 1 represented allele A and 0 represented allele B (see Figure 3). Regarding D4_R sunflower line, 1 and 0 respectively represented resistance and susceptibility against corresponding *P. halstedii* pathotype and the opposite for D7_S and D8_S. Thus, allele B of PhCRN33 was strictly associated to D4 resistance against 4 *P. halstedii* sequenced pathotypes, whereas allele A was associated to D4 susceptibility to pathotypes 710, 730 and 334. Allele B of PhRXLR15 was associated to D7 and D8 resistance against *P. halstedii* sequences pathotypes, whereas allele A was associated to D4 susceptibility.

Discussion

The rapid increase of *P. halstedii* virulence illustrated by the occurrence of new pathotypes breaking down *PI* resistance genes, is an important issue for the sunflower crop. Because effector proteins have been characterized as key determinants of pathogen virulence in model oomycetes, we selected *P. halstedii* putative effectors as typing tools for pathotype determination. Here we first showed that these putative effectors are more diverse than randomly selected non-effector genes, which in turn allowed the definition of a set of markers suitable for identification of 10 *P. halstedii* individual pathotypes and two groups of two. We then found a relationship between effector polymorphisms and *P. halstedii* pathotype virulence. Finally, we hypothesized on the identified effectors having a strong impact on virulence.

- **How to select *P. halstedii* reliable effector genes from *in silico* data?**

The 54 effector selected genes have been isolated from 48 different cDNA clusters. Two cDNAs gave seven genomic matches suggesting they corresponded to multigene families, and could also possibly contain pseudogenes. To avoid selecting false negative effectors, we selected effector sequences that fulfilled at least two of the three criteria described in results, allowing a certain degree of freedom in the choice. For example, none of the 27 *P. halstedii* selected CRN-type effectors showed canonical signal peptides, but all of them had high homologies with known CRN from other oomycetes and showed the conserved motives (Haas *et al.*, 2009). CRN effectors from *Phytophthora capsici* did also not contain canonical signal peptides, and were shown to be however translocated to the host cell, suggesting that they were secreted out of the oomycete (Stam *et al.*, 2013). In the case of RXLR-type effectors (i) which are globally less conserved among oomycetes, as suggested by lower PSI-BLAST values, and (ii) whose conserved motifs are smaller than in CRN-type effectors, we considered the signal peptide possession as a good predictor (25 out of 27 selected). Because the ATR5 effector from *Hyaloperonospora arabidopsidis* has been shown to be translocated to the plant cell with the unique EER motif (Bailey *et al.*, 2011), we also kept *P. halstedii* RXLR-type effectors having only the EER motif. Further functional studies are

required to validate the the fact that these effectors are effectively transferred into the plant cells.

- **Invariable and common (core) effectors could be essential for pathogen virulence: A way to find sustainable resistance?**

A subgroup (17 out of 54) of invariable effectors common to 7 *P. halstedii* pathotypes was identified in this study. An extensive work has been performed on effectors from *Pseudomonas syringae* bacteria infecting different plant hosts. A set of *Pseudomonas syringae* core (invariable) effectors were shown to inhibit a general plant response like antimicrobial vesicle trafficking, modulating plant immunity (Lindeberg *et al.*, 2012). Plants could therefore perceive pathogen attack by sensing its own disrupted cellular processes (i.e vesicle trafficking) rather than by effector recognition *per se*. These core effectors might be ancestral and under purifying selection because of their conserved role in pathogen virulence and fitness (Lindeberg *et al.*, 2012).

As previously shown in *Pseudomonas syringae* bacteria (Lindeberg *et al.*, 2012), *P. halstedii* invariable effectors might be involved in basic virulence functions necessary to invade a wide range of sunflower hosts. Further analysis of polymorphism should be done on more isolates of *P. halstedii* to check for the nucleic conservation of invariable effector genes. Similarly, functional studies of *in planta* expression of those invariable effectors may help in identifying plant targets and their corresponding disrupted cellular processes.

Identification of plant resistant genes targeting invariable effector proteins may provide new tools for more sustainable resistances (Birch *et al.*, 2009; Michelmore, 2013).

- ***P. halstedii* polymorphic effector genes presented high rates of non-synonymous mutations.**

Plant pathogen populations could evade host vigilance by three different ways, all based on a polymorphic and dynamic effector system. First, production of new effectors can suppress resistance mechanisms induced by other effectors, as previously shown in the

interaction between *Phytophthora sojae* and soybean (Liu *et al.*, 2011). Secondly, effectors from oomycete or fungi could escape the host vigilance by the appearance of non-synonymous mutations (Allen *et al.*, 2008; Boutemy *et al.*, 2011; Pedersen *et al.*, 2012). Finally, pathogens could modify their effector arsenal to not activate plant immunity system, either by gain and loss of effector genes or by modifying their expression (Cooke *et al.*, 2012; Gilroy *et al.*, 2011; Raffaele *et al.*, 2010).

Polymorphic effectors might be used by various pathogens to disrupt the redundant perception and signalling network developed by plant during evolution to fight off pathogens (Lindeberg *et al.*, 2012; Boller *et al.*, 2009; Wu and Zhou 2013). Contrary to core effectors, polymorphic effectors are directly perceived by the plant recognition system and therefore expected to be under positive selection.

P. halstedii polymorphic effector genes presented higher inter-pathotype variability than non-effector genes, suggesting a dynamic evolution of the effector repertoire with the selection of new alleles enabling to circumvent plant resistance. Studying the molecular evolution of those polymorphic effector genes on a wider set of *P. halstedii* isolates would certainly help in identifying effectors under positive selection.

Non-synonymous polymorphism in effectors could either affect protein function by some amino acid changes directly or give a non functional or truncated protein. Analysing effector genomic sequences, we have noticed 7 cases of putative PRF with two of them having one of the published consensus (Sharma *et al.*, 2011). These PRF putative events were always observed for several pathotypes both in predicted protein sequences from genomic and from cDNA data, which went against sequencing errors. To our knowledge it is the first description of PRF in oomycetes and raises following questions: Are eucaryotic oomycetes sharing PRF with procaryotes? Can we identify new candidate PRF pattern specific to oomycetes? If polymorphisms are detected in the PRF site, does it impact the expression of the corresponding genes among pathotypes?

The localization of several effectors within the same genomic scaffold is consistent with organisation of pathogenic island found in phytopathogenic bacteria *Pseudomonas syringae* (Alfano *et al.*, 2000), and with oomycete effector gene clusters (Haas *et al.*, 2009). Moreover, this *P. halstedii* putative pathogenicity island could suggest common evolution and role in pathogen virulence of the four RXLR, as described in *Ph. infestans* pathogenic island.

- **Genotyping of multi-isolates pathotypes highlighted a complex and dynamic pool of *P. halstedii* effectors.**

Assuming that effectors play a crucial role in the virulence of a given pathotype, it could have been expected to find low intra-pathotype polymorphism for a large proportion of variable effectors. However, many effector genes were found to exhibit intra-pathotype polymorphisms, suggesting that not all the polymorphic effectors contributed equally to the pathogenicity profile of *P. halstedii*. Based on the pathogenicity profile as phenotypically described today, we hypothesize that (i) the “homogeneous” effectors might play a particular role in virulence specificity, (ii) the contribution of “heterogeneous” effectors would constitute a basis for further virulence evolution..

We observed a link between the emergence date of *P. halstedii* isolates and the genotypic variability. Indeed *P. halstedii* pathotypes 100/710/703 first described in France (from 1966 to 1989, Ahmed *et al.*, 2012) present homogeneous genotypes, pathotypes 700/314/714 that appeared more recently (from 1995 to 2002) were found as heterogeneous. The heterogeneity of these latter pathotypes could be due to a higher genome plasticity, by activation of transposable elements (TEs) and DNA recombination, as previously shown in gene sparse regions of *Ph. infestans* genome containing effector genes (Haas *et al.*, 2009; Rafaele *et al.* 2010).

Similar changes in *P. halstedii* may have been a source of genome variability, which in turn may have produced new effector alleles. Associated with a fitness increase of the pathotype isolate, those new effector alleles would have been rapidly selected especially in presence of a strong selective pressure exerted by sunflower *PI* resistance genes.

- **Use of inter pathotype polymorphism in building a molecular key for assistance in pathotype determination.**

One of our objectives was to construct a determination key with markers designed on effectors, to identify through genotyping the pathotype of any *P. halstedii* isolate sampled in

field. We found markers for which intra-pathotype homogeneity suggested an association between the corresponding effectors and the pathotype virulence profile. Conversely, genotypic heterogeneity of isolates belonging to pathotypes 314, 700, and 714 prevented the use of several markers for the determination key.

Because the level of intra-pathotype homogeneity remains unknown for the 6 pathotypes presenting only one isolate, the profile of those pathotypes have to be considered cautiously. Nonetheless, the determination key allowed the identification of 10 *P. halstedii* pathotypes on a total of 14. Despite the identification of SNP on genomic data, pathotypes 100 and 304 could not be distinguished one from the other with the set of KASP marker used, but pathotype 100 has nearly disappeared (Ahmed *et al.*, 2012). The high level of intra-pathotype heterogeneity for pathotypes 314 and 714 may explain why they were also indistinguishable in the determination key.

Compared to previous work (Delmotte *et al.*, 2008), we therefore proposed a set of easy-handling molecular tools to determine more efficiently *P. halstedii* pathotypes. Collecting new isolates for mono-spore pathotypes should be used to validate the proposed markers. Finally, search for new homogeneous markers differentiating unseparated pathotypes should improve the determination key.

Today most studies highlight the role of a particular effector in the understanding of the issue of plant –pathogen interactions. Here we propose an alternative based on a more global scale, by trying to find an association between the affiliation of a set of *P. halstedii* isolates and the genotypic profiling of these isolates with markers designed on putative effectors. Our results suggest that pathotype virulence facing a plant genotype resulted from a complex combination of pathogen effectors. Conserved effectors could be involved in common and important virulence functions probably linked with host specialization whereas highly dynamic polymorphic effectors could play a role in breaking down host resistance and could be key actors of *P. halstedii* virulence evolution.

Experimental procedures:

- **Pathotypes of *Plasmopara halstedii* isolates:**

For each of the 14 *P. halstedii* pathotypes, one reference isolate was collected, and maintained by INRA Clermont-Ferrand (UMR INRA-Université Blaise Pascal - 1095). In addition to reference isolates, twenty-one geographical isolates (Table 1) collected from sunflower fields in different locations in France, were obtained from INRA Clermont-Ferrand and DNA obtained from INRA Bordeaux using DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen) from isolated spores collected from a susceptible sunflower line (GB) (Delmotte *et al.*, 2008). Pathotypes of *P. halstedii* isolates were determined following Mouzeyar *et al.* (1994), using the international nomenclature based on 3 digits (Figure S1, Gascuel *et al.*, in press). Plants were identified as susceptible or resistant depending on presence or absence of sporulation on leaf surfaces (Gulya *et al.*, 1998).

- **Genomic draft of seven *P. halstedii* pathotypes:**

Sequencing library were constructed using the TruSeq DNA sample prep kit. Draft genomic sequences were obtained by Illumina HiSeq 2000 sequencing of genomic DNA (DNeasy Plant Mini Kit Quiagen) extracted from spores at 100X for pathotype 710 and at 50X for pathotypes 100, 304, 334, 700, 703 and 730. Clusters smaller than 500 nt were removed from the assembly.

- **Comparison of the levels of polymorphism between *P. halstedii* putative effectors and non-effector genes:**

All polymorphism studies were based on gene coding sequences (CDs) and their corresponding predicted peptides. To select *P. halstedii* non-effector genes, we screened the EST databases (As-sadi *et al.*, 2011;) with the following four criteria: (i) the cDNA clusters contained reads from the libraries of the pathotypes 100, 304, 703, 710, (ii) they had an INTERPRO annotation, (iii) their hit definition contained the word “Phytophthora” and (iv) the cluster length was comprised between 300 and 2300 bp (2300 bp being the average length of the *P. halstedii* effectors plus two standard deviations). From 2933 EST clusters, 150 were randomly chosen. Finally, we checked that no EST being annotated as effector was

present in this subset. The same procedure as for the effector genes was applied to identify the NA and AA polymorphisms between the genomic sequences of the seven pathotypes with available genomic drafts. In order to measure the level of polymorphism, we counted the number of SNP within the alignment of genomic sequences for which at least six out of the seven pathotypes were known. To estimate polymorphism levels, we divided the maximum length of the conserved alignment between the six or seven pathotypes by the number of SNPs or amino acid changes plus one. This index measuring therefore the minimum SNP sparseness. For the AA polymorphism, we considered only the genes exhibiting a NA polymorphism. A square root transformation was found efficient to stabilize the variance between the two samples and was applied, resulting in the SNP sparseness index (Figure 2). We compared the distributions by a Kolmogorov-Smirnoff test in R (`ks.test`), and the means by a t-test.

- **Genotyping with the Competitive Allele-Specific PCR (KASP):**

Primers for KASP markers (Table S1) were designed with BatchPrimer3 V1.0 to choose allele-specific primers and allele-flanking primers (<http://probes.pw.usda.gov/batchprimer3/>).

Amplification reactions were done with 3µl of KASP V4.0 2X Master mix (LGC Genomics , Herts, UK) 1µl ultrapure water, 2µl DNA (1ng/µl for DNA of isolates and 0.5ng/µl for DNA of reference isolates), and 0.07µl of primers mix (12µM of each allele-specific primer, carrying standard FAM or VIC compatible tails, and 32µM of allele-flanking primer). PCR programs used are described in Table S1 legend.

Amplifications were done on [GeneAmp® PCR System 9700](#) (Applied BioSystems). Endpoint fluorescence was read using a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied BioSystems), monitored by SDS 2.3 software with allelic discrimination under ROX conditions. For some markers, allelic discrimination of some samples needed manual annotation. We performed at least two amplification runs for each marker to validate the results.

- **Statistical analyses**

Mantel analysis was performed with the mantel function of ecodist R package, using 21 KASP markers (heterozygous genetic marker PhCRN02_1 has been removed due to high heterozygosity) and 13 pathotypes (pathotype 714 was excluded due its heterogeneity).

Aknowledgements:

We thank Sylvie Richart-Cervera (INRA SAVE, Bordeaux, France) for providing DNA from *P. halstedii* isolates collected and their pathotype determined by Denis Tourvieille and colleagues (INRA Clermont-Ferrand, France), Jérôme Gouzy (LIPM bioinformatic team, Toulouse, France) and common logistic LIPM Services. This work was supported by the French Laboratory of Excellence project "TULIP" (ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02).

Table web 1

https://www.heliagene.org/Web/INRA/Plasmopara_marker/Plasmopara_halstedii_effectors_polymorphism.xml.

Description of the 54 putative effectors identified on *P. halstedii* genomes. This table gives informations about the cDNA sequences used to find genomic sequences of seven *P. halstedii* pathotypes, effector conserved motives, signal peptide predictions, alignment of nucleic (NA) and amino acid (AA) sequences, the identification of SNPs, the KASP markers used.

Pi	LOG	gene class
0,00701	-2,154281982	non-effector gene
0,0002	-3,698970004	non-effector gene
0,00122	-2,913640169	non-effector gene
0,00267	-2,573488739	non-effector gene
0,00077	-3,113509275	non-effector gene
0,00351	-2,454692884	non-effector gene
0,00041	-3,387216143	non-effector gene
0,0011	-2,958607315	non-effector gene
0,00025	-3,602059991	non-effector gene
0,0005	-3,301029996	non-effector gene
0,00241	-2,617982957	non-effector gene
0,00139	-2,8569852	non-effector gene
0,00066	-3,180456064	non-effector gene
0,00041	-3,387216143	non-effector gene
0,00559	-2,252588192	non-effector gene
0,00099	-3,004364805	non-effector gene
0,00045	-3,346787486	non-effector gene
0,00076	-3,119186408	non-effector gene
0,00082	-3,086186148	non-effector gene
0,00199	-2,701146924	non-effector gene
0,00065	-3,187086643	non-effector gene
0,00133	-2,876148359	non-effector gene
0,00056	-3,251811973	non-effector gene
0,00055	-3,259637311	non-effector gene
0,00154	-2,812479279	non-effector gene
0,00121	-2,91721463	non-effector gene
0,00133	-2,876148359	non-effector gene
0,00084	-3,075720714	non-effector gene
0,00106	-2,974694135	non-effector gene
0,0008	-3,096910013	non-effector gene
0,00087	-3,060480747	non-effector gene
0,00082	-3,086186148	effector gene
0,00051	-3,292429824	effector gene
0,00079	-3,102372909	effector gene
0,00047	-3,327902142	effector gene
0,00097	-3,013228266	effector gene
0,00183	-2,73754891	effector gene
0,00127	-2,896196279	effector gene
0,00268	-2,571865206	effector gene
0,00195	-2,709965389	effector gene
0,00099	-3,004364805	effector gene
0,00035	-3,455931956	effector gene
0,00126	-2,899629455	effector gene
0,00029	-3,537602002	effector gene
0,00039	-3,408935393	effector gene
0,00207	-2,684029655	effector gene
0,00146	-2,835647144	effector gene
0,00112	-2,950781977	effector gene
0,00141	-2,850780887	effector gene
0,00262	-2,581698709	effector gene
0,00367	-2,435333936	effector gene
0,00063	-3,200659451	effector gene
0,0009	-3,045757491	effector gene
0,00173	-2,761953897	effector gene
0,00062	-3,207608311	effector gene
0,00174	-2,759450752	effector gene
0,00043	-3,366531544	effector gene
0,00399	-2,399027104	effector gene
0,00269	-2,57024772	effector gene
0,0054	-2,26760624	effector gene
0,0015	-2,823908741	effector gene
0,00175	-2,756961951	effector gene
0,00533	-2,273272791	effector gene
0,00093	-3,031517051	effector gene
0,00342	-2,465973894	effector gene
0,00155	-2,809668302	effector gene

Table S 1 : Pi value.

Marker (SNP) name	polymorphism	PCR program	Specific FAM primer	Specific Vic primer	Flanking primer
PhCRN02_1	C/T (462)	B	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGA GGGAATCAATGTGCAGT	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGGAATCAAT GTGCAGC	CGGAAGGAGACGATAACA GC
PhCRN07.1_1	A/G (561)	B	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAA GACGCCAAGAAAACAAG	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAAGACGCCAA GAAAACAAA	AGACTCGAACAGCCCCACAG T
PhCRN07.1_1	A/G (561)	A	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAA GACGCCAAGAAAACAAG	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAAGACGCCAA GAAAACAAA	AGACTCGAACAGCCCCACAG T
PhCRN12_1	T/C (382)	A	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTG CTCGAGTAAAAAATGGC	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTTGTCTGAG TAAAAAATGGT	GCACCAACGATCGCATAGA T
PhCRN20_1	A/C (484)	B	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAG TCATTGGTGGGCTTG	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCAGTCATTGGT GGGCTTT	TTTCTCGAGCCATTCTCACC
PhCRN30.1_1	A/G (258)	B	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCC CGGAACCAACC	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCGCCGAACCA CCACT	TAAAGTGGGATTCAAGTG C
PhCRN30.2_1	A/T (597)	A	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTG CAAAGCAACCACGA	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCAAAGCAA CCACGT	GAAAAGGAGTGTCTCCACC A
PhCRN31_1	A/G (51)	B	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTG AACTGAGGGGAGTTTA	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGAACCTGAG GGGAGTTTG	GGTCTGGCATAACCTCAA A
PhCRN31_2	C/G (1023)	A	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTT ATGTGACCTTCGCACAG	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTATGTGAC CTTCGCACAC	TGCTTACCCCAATAAACC A
PhCRN33_1	C/T (702)	B	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTC TCGGTATTTGATTGGATAAGAC G	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTCTCGGTATTT GTATTGGATAAGACA	TCCCGACCTTCGT CATAGTT
PhCRN34_1	A/T (388)	A	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGG AATAATCGCCAACACATTCACT	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGAATAATCGC CAACACATTCACA	ACCACATTGGGCTGTCTGA T
PHRXLR01_1	C/T (457)	B	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTTT TAATCAACGCGTAATGT	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTTTAATCAAC GCGTAATGC	GCAAGTATCAGCGACAAT G
PHRXLR08_1	A/T (733)	B	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGC AGCTGATGAGCGATA	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCACTGATG AGCGATT	GCTGTTTTCGACATCATCTT G
PHRXLR08_2	C/T (769)	A	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGA TGATGTCGAAAACAGCTT	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTATGATGTCGA AAACAGCTC	CAGCAATTTTGTTAGCATT CA
PHRXLR08_4	A/G (1007)	A	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGT TTCTGACGCTCTGATCC	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAAGTTTCTGA CGCTCTGATCT	CGACTACTCCAATCCTGTC G
PhRXLR15_1	A/G (240)	B	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGC ATCTTCTCTGCAATTTTC	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCATCTTCTCC TGCAATTTT	ACCGATATGTTGCCAAGA G
PhRXLR15_3	G/A (327)	B	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGA GGTATTCTCCATTATAATCTC	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGAGGTATTCT CCATTATAATCTT	ATGCAAGGAGAGATGCGA TT
PhRXLR18_1	A/T (131)	A	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCG TTATCATGTCTGTGGCA	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTCTGTATCAT GTCTGTGGCT	GGCCAACGTTTGTGAACT T
PhRXLR31_1	C/T (112)	A	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTTT AAGCCGACGCAAAA	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTTAAGCCGA CGCAAAG	TACGATGAAAGGTCGCAAT C
PhRXLR31_2	A/T (394)	A	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCA CTTGCTGTTGCGTCT	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCACTTGCTGT TGCCTCA	CAAGATGCACAAGACGAG GA
PhRXLR32_2	G/T (669)	A	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTC GGTTGGTAAAAGWG	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTCCGGTTGGT GAAAAGWT	ATGTGCTCTGCTTTTGAGC
PhRXLR35_1	A/G (406)	A	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTC CAAAACAAAGCGAATCG	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTCCAAAACAAA GCGAATCA	CGCTTGAATCGATACCTT CT
PhRXLR35_2	A/T (409)	A	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCA AACAAAGCGAATCRTCA	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTCCAAAACAAAG CGAATCRTCA	CGCTTGAATCGATACCTT CT
PhRXLR58_1	/T (597)	A	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAA GCACCAAGGCAATTTTG	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAAGCAACAGG CCAATTTT	CAACGTGCTGATTTGAGG A

Table S 2 : Description of effector polymorphisms and primers used for KASP markers. Two PCR programmes were tested with each marker in order to choose the best one. Both PCR amplification programme began with pre-denaturation at 94°C for 15 min, followed by 11 cycle of, denaturation at 94°C for 20s, annealing using touchdown at 65°C to 57°C for programme A and 62°C to 54°C for programme B, losing 0.8°C per cycle in both programmes, elongation at 72°C for 45s. 25 cycles of denaturation at 94°C for 20s and annealing at 50°C for 30s were added.

Sunflower differential line		14 <i>P. halstedii</i> pathotypes													
Identification	Sunflower genotype	100 10	300 10	304 10	307 51	314 30	330 42	334 53	700 60	703 60	707 71	710 60	714 71	730 60	774 73
D1	Ha-304 (GB)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
D2	RHA-265	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
D3	RHA-274	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
D4	PM3	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
D5	PM17	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S
D6	803-1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
D7	HAR-4	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R
D8	QHP1	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R
D9	Ha-335	R	R	S	S	S	R	S	R	R	S	R	S	R	S
D10	Y7Q	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	R	S	R	S
D11	PSC8	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
D12	XA	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
D13	PSS2RM	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	R	S	R	S
D14	VAQ	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S
D15	RHA419	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Figure S 1 : *P. halstedii* pathotypes are defined according to an international nomenclature based on the virulence profile of a given isolate on 15 differential lines (D1-D15) selected according to their resistance patterns (Gulya *et al.*, 1998, Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2012). Resistance (R) and susceptibility (S) were defined by the absence or presence of disease symptoms and sporulation on leaves 2-3 weeks after inoculation of sunflower root seedlings, grown in soil (Mouzeyar *et al.*, 199). A triplet coding system was initially set up on nine sunflower lines (D1–D9, Gulya *et al.*, 1998), but the occurrence of new *P. halstedii* pathotypes led to the addition of six other sunflower lines (in dark grey) and to a five-digit coding system (D10–D15, Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2012). The phenotyping results on each triplet of sunflower differential lines give the pathotype digit values. If the first differential line of a set of three is susceptible, a value of ‘1’ is assigned to the pathotype. If the second line is S, a value of ‘2’, and, for the third line, a value of ‘4’. When the line is resistant, a value of ‘0’ is assigned to the pathotype. The virulence code is additive within each set. For example, virulence code 710 is explained by ‘7’ (S for D1–D3, 1 + 2 + 4 = 7), ‘1’ (S for D4) and ‘0’ (R for D7–D9).

References

- Adhikari, B.N., Hamilton, J.P., Zerillo, M.M., Tisserat, N., Lévesque, C.A. and Buell, C.R. (2013). Comparative genomics reveals insight into virulence strategies of plant pathogenic oomycetes. *PLoS One*. **8**, e75072.
- Ahmed, S., Tourvieille de Labrouhe, D and Delmotte, F. (2012). Emerging virulence arising from hybridisation facilitated by multiple introductions of the sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*. *Fungal Genet. Biol.*, **49**, 847-855.
- 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 in pl. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 4856–4861.
- Allen, R., Meitz, J., and Baumber, R. (2008). Natural variation reveals key amino acids in a downy mildew effector that alters recognition specificity by an *Arabidopsis* resistance gene. *Mol. plant* . **9**, 511–523.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A, Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402.
- As-sadi, F., Carrere, S., Gascuel, Q., Hourlier, T., Rengel, D., Le Paslier, M.-C., Bordat, A., Boniface, M.C., Brunel, D., Gouzy, J., Godiard, L. and Vincourt, P. (2011). Transcriptomic analysis of the interaction between *Helianthus annuus* and its obligate parasite *Plasmopara halstedii* shows single nucleotide polymorphisms in CRN sequences. *BMC Genomics*. **12**, 498-513.
- Bailey, K., Cevik, V., Holton, N., Byrne-Richardson, J., Sohn, K. H., Coates, M., Woods-Tör, A., Aksoy, H. M., Hughes, L., Baxter, L., Jones, J. D. G., Beynon, J., Holub, E. B., and Tör, M. (2011). Molecular cloning of ATR5(Emoy2) from *Hyaloperonospora arabidopsidis*, an avirulence determinant that triggers RPP5-mediated defense in *Arabidopsis*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **24**, 827–838.
- Baltrus, D. a, Nishimura, M.T., Romanchuk, A., Chang, J.H., Mukhtar, M.S., Cherkis, K., Roach, J., Grant, S.R., Jones, C.D. and Dangl, J.L. (2011). Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *PLoS Pathog.* **7**, e1002132.

- Baxter L, Tripathy S, Ishaque N, et al. (2010). Signatures of Adaptation to Obligate Biotrophy in the *Hyaloperonospora arabidopsidis* Genome. *Science*. **330**, 1549–1551
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., and Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* **340**, 783–795.
- Birch, P. R. J., Armstrong, M., Bos, J., Boevink, P., Gilroy, E. M., Taylor, R. M., Wawra, S., Pritchard, L., Conti, L., Ewan, R., Whisson, S. C., van West, P., Sadanandom, A., and Kamoun, S. (2009). Towards understanding the virulence functions of RXLR effectors of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *J. Exp. Bot.* **60**, 1133–1140.
- Boller, T. and Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**, 379–406.
- Bos, J. I. B., Armstrong, M. R., Gilroy, E. M., Boevink, P. C., Hein, I., Taylor, R. M., Zhendong, T., Engelhardt, S., Vetukuri, R.R., Harrower, B., Dixelius, C., Bryan, G., Sadanandom, A., Whisson, S.C., Kamoun, S. and Birch, P.R.J. 2010. *Phytophthora infestans* effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:9909-9914.
- Bos, J. I. B., Kanneganti, T.-D., Young, C., Cakir, C., Huitema, E., Win, J., Armstrong, M.R., Birch, P.R.J. and Kamoun, S. 2006. The C-terminal half of *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* 48:165-176.
- Boutemy, L.S., King, S.R.F., Win, J., Hughes, R.K., Clarke, T. a, Blumenschein, T.M. a, Kamoun, S. and Banfield, M.J. (2011). Structures of *Phytophthora* RXLR effector proteins: a conserved but adaptable fold underpins functional diversity. *J. Biol. Chem.* **286**, 35834–35842.
- Bozkurt, T.O., Schornack, S., Win, J., Shindo, T., Ilyas, M., Oliva, R., Cano, L.M., Jones, A.M.E., Huitema, E., van der Hoorn, R. a L., and Kamoun, S. (2011). *Phytophthora infestans* effector AVRblb2 prevents secretion of a plant immune protease at the haustorial interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 20832–20837.
- Bozkurt, T.O., Schornack, S., Banfield, M.J., and Kamoun, S. (2012). Oomycetes, effectors, and all that jazz. *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**: 483–492.

- Caillaud, M.-C., Asai, S., Rallapalli, G., Piquerez, S., Fabro, G. and Jones, J. D. G. (2013). A downy mildew effector attenuates salicylic acid-triggered immunity in Arabidopsis by interacting with the Host Mediator Complex. *Plos Biology* 11:e1001732. Published online.
- Cooke DEL, Cano LM, Raffaele S, et al. (2012) Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the irish potato famine pathogen. *PLoS Pathog.* **8**, e1002940.
- Corpet F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* **16**, 10881-10890.
- Delmotte, F., Giresse, X., Richard-Cervera, S., M'baya, J., Vear, F., Tourvieille, J., Walser, P., and de Labrouhe, D.T. (2008). Single nucleotide polymorphisms reveal multiple introductions into France of *Plasmopara halstedii*, the plant pathogen causing sunflower downy mildew. *Infect. Genet. Evol.* **8**, 534–540.
- Dillmann, C., Bar-Hen, A., and Guerin, D. (1997). Comparison of RFLP and morphological distances between maize *Zea mays* L. inbred lines. Consequences for germplasm protection purposes. *Theor. Appl.* **95**, 92–102.
- Dong S, Stam R, Cano LM, J. Song, Sklenar, J., Yoshida, K., Bozkurt, T. O., Oliva, R., Liu, Z., Tian, M., Win, J., Banfield, M. J., Jones, a. M. E., van der Hoorn, R. A. L., and Kamoun, S. (2014). Effector Specialization in a Lineage of the Irish Potato Famine Pathogen. *Science.* **343**, 552–555.
- Fabro, G., Steinbrenner, J., Coates, M., Ishaque, N., Baxter, L., Studholme, D. J., Koerner, E., Allen, R.L., Piquerez, S.J.M., Greenshields, D., Lei, R., Badel, J.L., Caillaud, M.C., Sohn, K.H., Van den Ackerveken, G., Parker, J.E., Beynon, J. and Jones, J.D.G. (2011). Multiple candidate effectors from the oomycete pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis* suppress host plant immunity. *PLoS Pathog.* 7:e1002348. Published online.
- Gascuel, Q., Martinez, Y., Boniface, M.-C., Vear, F., Pichon, M., Godiard, L. The sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*. *Mol. Plant Pathol.* in press.
- Giedroc, D.P. and Cornish, P. V (2009). Frameshifting RNA pseudoknots: structure and mechanism. *Virus Res.* **139**, 193–208.
- Gilroy, E.M., Breen, S., Whisson, S. C., Squires, J., Hein, I., Kaczmarek, M., Turnbull, D., Boevink, P. C., Lokossou, A., Cano, L. M., Morales, J., Avrova, A. O., Pritchard, L., Randall, E., Lees, A., Govers, F., van West, P., Kamoun, S., Vleeshouwers, V. G. a a, Cooke, D. E. L., and Birch, P. R. J. (2011). Presence/absence, differential expression and sequence polymorphisms between PiAVR2 and PiAVR2-like in *Phytophthora infestans* determine virulence on R2 plants. *New Phytol.* **191**, 763–776.

- Goritschnig, S., Krasileva, K. V., Dahlbeck, D. and Staskawicz, B.J. (2012). Computational Prediction and Molecular Characterization of an Oomycete Effector and the Cognate Arabidopsis Resistance Gene. *PLoS Genet.* **8**, e1002502.
- Gulya, T.J., Tourvieille de Labrouhe, D., Masirevic, S., Penaud, A., Rashid, K. and Viranyi, F. (1998). Proposal for the standardized nomenclature and identification of races of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). In: *Sunflower Downy Mildew Symposium, Proceedings of Sunflower Downy Mildew Symposium, Fargo, ND, USA*, pp. 130–136.
- Haas, B.J., Kamoun, S., Zody, M.C., Jiang, R.H.Y., Handsaker, R.E., Cano, L.M., Grabherr, M., Kodira, C.D., Raffaele, S., Torto-Alalibo, T., Bozkurt, T.O., Ah-Fong, A.M.V., Alvarado, L., Anderson, V.L., Armstrong, M.R., Avrova, A., Baxter, L., Beynon, J., Boevink, P.C., Bollmann, S.R., Bos, J.I.B., Bulone, V., Cai, G., Cakir, C., Carrington, J.C., Chawner, M., Conti, L., Costanzo, S., Ewan, R., Fahlgren, N., Fischbach, M.A., Fugelstad, J., Gilroy, E.M., Gnerre, S., Green, P.J., Grenville-Briggs, L.J., Griffith, J., Grünwald, N.J., Horn, K., Horner, N.R., Hu, C., Huitema, E., Jeong, D., Jones, A.M.E., Jones, J.D.G., Jones, R.W., Karlsson, E.K., Kunjeti, S.G., Lamour, K., Liu, Z., Ma, L., Maclean, D., Chibucos, M.C., McDonald, H., McWalters, J., Meijer, H.J.G., Morgan, W., Morris, P.F., Munro, C.A., O'Neill, K., Ospina-Giraldo, M., Pinzón, A., Pritchard, L., Ramsahoye, B., Ren, Q., Restrepo, S., Roy, S., Sadanandom, A., Savidor, A., Schornack, S., Schwartz, D.C., Schumann, U.D., Schwessinger, B., Seyer, L., Sharpe, T., Silvar, C., Song, J., Studholme, D.J., Sykes, S., Thines, M., van de Vondervoort, P.J.I., Phuntumart, V., Wawra, S., Weide, R., Win, J., Young, C., Zhou, S., Fry, W., Meyers, B.C., van West, P., Ristaino, J., Govers, F., Birch, P.R.J., Whisson, S.C., Judelson, H.S. and Nusbaum, C. (2009). Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature*, 461, 393–398.
- Hein, I., Gilroy, E.M., Armstrong, M.R., and Birch, P.R.J. (2009). The zig-zag-zig in oomycete–plant interactions. *Mol. Plant Pathol.* **10**, 547–562.
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*. **444**, 323–329.
- Kale, S.D., Gu, B., Capelluto, D.G.S., Dou, D., Feldman, E., Rumore, A., Arredondo, F.D., Hanlon, R., Fudal, I. and Rouxel, T. (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. *Annu. Rev. Phytopathol.* **44**, 41–60.
- Kemen E, Gardiner A, Schultz-Larsen T, et al. (2011). Gene gain and loss during evolution of obligate parasitism in the white rust pathogen of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biol.* **9**, e1001094.

- Kunjeti, S.G., Evans, T.A., Marsh, A.G., Gregory, N.F., Kunjeti, S., Meyers, B.C., Kalavacharla, V.S. and Donofrio, N.M. (2012). RNA-Seq reveals infection-related global gene changes in *Phytophthora phaseoli*, the causal agent of lima bean. *Mol. Plant Pathol.* **13**, 454–466.
- Lamour, K. H., Mudge, J., Gobena, D., Hurtado-Gonzales, O. P., Schmutz, J., Kuo, A., Miller, N. a, Rice, B. J., Raffaele, S., Cano, L. M., Bharti, A. K., Donahoo, R. S., Finley, S., Huitema, E., Hulvey, J., Platt, D., Salamov, A., Savidor, A., Sharma, R., Stam, R., Storey, D., Thines, M., Win, J., Haas, B. J., Dinwiddie, D. L., Jenkins, J., Knight, J. R., Affourtit, J. P., Han, C. S., Chertkov, O., Lindquist, E. a, Detter, C., Grigoriev, I. V, Kamoun, S., and Kingsmore, S. F. (2012). Genome sequencing and mapping reveal loss of heterozygosity as a mechanism for rapid adaptation in the vegetable pathogen *Phytophthora capsici*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **25**, 1350–1360
- Leonelli, L., Pelton, J., Schoeffler, A., Dahlbeck, D., Berger, J., Wemmer, D.E. and Staskawicz, B. (2011). Structural elucidation and functional characterization of the *Hyaloperonospora arabidopsidis* effector protein ATR13. *PLoS Pathog.* **7**, e1002428.
- Lévesque CA, Brouwer H, Cano L, et al. (2010) Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. *Genome Biol.* **11**, R73.
- Lindeberg, M., Cunnac, S. and Collmer, A. (2012). *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in end less arguments. *Trends Microbiol.* **20**, 199–208.
- Links, M.G., Holub, E., Jiang, R.H.Y., Sharpe, A.G., Hegedus, D., Beynon, E., Sillito, D., Clarke, W.E., Uzuhashi, S. and Borhan, M.H. (2011). De novo sequence assembly of *Albugo candida* reveals a small genome relative to other biotrophic oomycetes. *BMC Genomics.* **12**, 503-515.
- Liu, T., Ye, W., Ru, Y., Yang, X., Gu, B., Tao, K., Lu, S., Dong, S., Zheng, X., Shan,W., Wang, Y. Dou, D. (2011). Two host cytoplasmic effectors are required for pathogenesis of *Phytophthora sojae* by suppression of host defenses. *Plant Physiology*, **155**, 490–501
- Louvet J, Kermaal JP (1966). Le mildiou menace-t-il la culture du tournesol en France? *C R Acad Agric*, **52**, 896-902
- Mann, R. a *et al.* (2013). Comparative genomics of 12 strains of *Erwinia amylovora* identifies a pan-genome with a large conserved core. *PLoS One.* **8**, e55644.
- Michelmore, R.W., Christopoulou, M., and Caldwell, K.S. (2013). Impacts of resistance gene genetics, function, and evolution on a durable future. *Annu. Rev. Phytopathol.* **51**, 291–319.
- Moinard, J., Mestries, E., Tourvieille de Labrouhe, D., A. PENAUD (2), Walser, P., Pinochet, X., Thiery, C., Dordolo, M., Marage, G. (2009). Gestion durable du risque mildiou du tournesol: influences

des facteurs agronomiques et des choix variétaux sur le développement quantitatif et qualitatif de l'inoculum. AFPP–9 ème Conférence internationale sur les maladies des plantes tours

- Mouzeyar, S., Delabrouhe, D.T. and Vear, F. (1994). Effect of host–race combination on resistance of sunflower, *Helianthus annuus* L., to downy mildew *Plasmopara halstedii*. *J. Phytopathol.* **141**, 249–258.
- Mouzeyar, S., Roeckel-Drevet, P., Gentzbittel, L., Philippon, J., Tourvieille De Labrouhe, D., Vear, F., Nicolas, P., (1995). RFLP and RAPD mapping of the sunflower PI1 locus for resistance to *Plasmopara halstedii* race 1. *Theor Appl Genet.* **91**, 733-737.
- Nishimura, M. (1922) Studies in *Plasmopara halstedii*. *J. Coll. Agric. Hokkaido Imp.Univ.* **XI** (Pt 3), 185-210.
- Oh, S.K., Young, C., Lee, M., Oliva, R., Bozkurt, T.O., Cano, L.M., Win, J., Bos, J.I.B., Liu, H.Y., van Damme, M., Morgan, W., Choi, D., van der Vossen, E.G.A., Vleeshouwers, V.G.A.A. and Kamoun, S. 2009. In planta expression screens of *Phytophthora infestans* RXLR effectors reveal diverse phenotypes, including activation of the *Solanum bulbocastanum* disease resistance protein Rpi-blb2. *Plant Cell* **21**: 2928–2947.
- Pais, M., Win, J., Yoshida, K., Etherington, G.J., Cano, L.M., Raffaele, S., Banfield, M.J., Jones, A., Kamoun, S., and Go Saunders, D. (2013). From pathogen genomes to host plant processes: the power of plant parasitic oomycetes. *Genome Biol.* **14**, 211-221.
- Pedersen, C. *et al.* (2012) Structure and evolution of barley powdery mildew effector candidates Structure and evolution of barley powdery mildew effector candidates. *BMC Genomics*, **13**, 694-714.
- Quinn, L., O'Neill, P. a, Harrison, J., Paskiewicz, K.H., McCracken, A.R., Cooke, L.R., Grant, M.R. and Studholme, D.J. (2013). Genome-wide sequencing of *Phytophthora lateralis* reveals genetic variation among isolates from Lawson cypress (*Chamaecyparis lawsoniana*) in Northern Ireland. *FEMS Microbiol. Lett.* **344**, 179–185.
- Raffaele, S., Farrer, R. A., Cano, L. M., Studholme, D. J., Maclean, D., Thines, M., Jiang, R. H. Y., Zody, M. C., Kunjeti, S. G., Donofrio, N. M., Meyers, B. C., Nusbaum, C., and Kamoun, S. (2010). Genome Evolution Following Host Jumps in the Irish Potato Famine Pathogen Lineage. *Science.* **330**, 1540-1543.
- Saunders, D. G. O., Breen, S., Win, J., Schornack, S., Hein, I., Bozkurt, T. O., Champouret, N., Vleeshouwers, V.G.A.A., Birch,, P.R.J., Gilroy, E.M. and Kamoun, S. (2012). Host Protein BSL1

- Associates with *Phytophthora infestans* RXLR Effector AVR2 and the *Solanum demissum* Immune Receptor R2 to Mediate Disease Resistance. *Plant Cell* **24**:3420-3434.
- Schorneck, S., Huitema, E. (2009). Ten things to know about oomycete effectors. *Mol. Plant Pathol.* **10**, 795–803.
- Schorneck, S., van Damme, M., Bozkurt, T.O., Cano, L.M., Smoker, M., Thines, M., Gaulin, E., Kamoun, S., and Huitema, E. (2010). Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 2–7.
- Seidl, M.F., Van den Ackerveken, G., Govers, F., and Snel, B. (2012). Reconstruction of oomycete genome evolution identifies differences in evolutionary trajectories leading to present-day large gene families. *Genome Biol. Evol.* **4**: 199–211.
- Sharma, V., Firth, A.E., Antonov, I., Fayet, O., Atkins, J.F., Borodovsky, M. and Baranov, P. V (2011). A pilot study of bacterial genes with disrupted ORFs reveals a surprising profusion of protein sequence recoding mediated by ribosomal frameshifting and transcriptional realignment. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 3195–3211.
- Stam, R., Jupe, J., Howden, A.J.M., Morris, J. a, Boevink, P.C., Hedley, P.E. and Huitema, E. (2013). Identification and Characterisation CRN Effectors in *Phytophthora capsici* Shows Modularity and Functional Diversity. *PLoS One.* **8**, e59517.
- Stassen, J.H.M., Seidl, M.F., Vergeer, P.I.M.W.J., Nijman, I.J., Snel, B., Cuppen, E. and Ackerveken, G.V.A.N.D.E.N. (2012). Effector identification in the lettuce downy mildew *Bremia lactucae* by massively parallel transcriptome sequencing. *Mol. Plant Pathol.* **13**, 719-731.
- Tian, M., Win, J., Savory, E., Burkhardt, A., Held, M., Brandizzi, F. and Day, B. (2011). 454 Genome Sequencing of *Pseudoperonospora cubensis* Reveals Effector Proteins with a QXLR Translocation Motif. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **24**: 543-553.
- Torto, T. A., Li, S. A., Styer, A., Huitema, E., Testa, A., Gow, N. A. R., van West, P. and Kamoun, S. (2003). EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora*. *Genome Res.* **13**: 1675-1685.
- Tourvieille de Labrouhe, D., Pilorgé, E., Nicolas, P. (2000). *Le mildiou du tournesol*. Editions Quae.
- Tourvieille de Labrouhe, D., Walser, P., Joliovot, D., Roche, S., Serre, F., Delmotte, F., Bordat, A., Godiard, L., Vincourt, P. and Vear, F. (2012). Proposal for improvement of sunflower downy mildew race nomenclature. In: Proceedings of the 18th International Sunflower Conference, Mar del Plata, Argentina, March 2012, pp. 322–327. Paris: International Sunflower Association

- Tyler, B.M., Tripathy, S., Zhang, X., Dehal, P., Jiang, R.H.Y., Aerts, A., Arredondo, F.D., Baxter, L., Bensasson, D., Beynon, J.L., Chapman, J., Damasceno, C.M.B., Dorrance, A.E., Dou, D., Dickerman, A.W., Dubchak, I.L., Garbelotto, M., Gijzen, M., Gordon, S.G., Govers, F., Grunwald, N.J., Huang, W., Ivors, K.L., Jones, R.W., Kamoun, S., Krampis, K., Lamour, K.H., Lee, M.-K., McDonald, W.H., Medina, M., Meijer, H.J.G., Nordberg, E.K., Maclean, D.J., Ospina-Giraldo, M.D., Morris, P.F., Phuntumart, V., Putnam, N.H., Rash, S., Rose, J.K.C., Sakihama, Y., Salamov, A.A., Savidor, A., Scheuring, C.F., Smith, B.M., Sobral, B.W.S., Terry, A., Torto-Alalibo, T.A., Win, J., Xu, Z., Zhang, H., Grigoriev, I.V., Rokhsar, D.S. and Boore, J.L. (2006). Phytophthora genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science*, **313**: 1261–1266.
- van Damme, M., Bozkurt, T. O., Cakir, C., Schornack, S., Sklenar, J., Jones, A. M. E. and Kamoun, S. (2012). The Irish Potato Famine Pathogen *Phytophthora infestans* Translocates the CRN8 Kinase into Host Plant Cells. *PLoS Pathog.* **8**: e1002875.
- Wawra, S., Belmonte, R., Löbach, L., Saraiva, M., Willems, A., and van West, P. (2012). Secretion, delivery and function of oomycete effector proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**: 685–691
- Vleeshouwers, V.G. a a et al. (2008). Effector genomics accelerates discovery and functional profiling of potato disease resistance and phytophthora infestans avirulence genes. *PLoS One* **3**: e2875.
- Wu, Y. and Zhou, J.-M. (2013). Receptor-like kinases in plant innate immunity. *J. Integr. Plant Biol.* **55**: 1271–1286.
- Xie, P. (2013) A dynamical model of programmed -1 ribosomal frameshifting. *J. Theor. Biol.* **336**: 119–131.
- Yin, W., Dong, S., Zhai, L., Lin, Y., Zheng, X. and Wang, Y. (2013). The *Phytophthora sojae* Avr1d gene encodes an RxLR-dEER effector with presence and absence polymorphisms among pathogen strains. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **26**, 958–968.

III. Lecture critique:

Quand nous avons débuté cette étude, parmi les vingt effecteurs putatifs identifiés chez *P. halstedii*, sept CRN présentait du polymorphisme au niveau de leur séquence en acides aminés (As-sadi et al., 2011). Nous avons donc cherché à identifier de nouveaux effecteurs candidats à partir de données transcriptomiques plus larges, par PSI-TBLASTN sur la base d'effecteurs connus chez d'autres oomycètes. Ce sont finalement 27 CRN et 27 RxLR putatifs exprimés par l'agent pathogène au cours de son interaction avec la plante qui ont été identifiés.

Notre objectif initial étant de mettre en place un outil de diagnostic à partir de marqueurs moléculaires identifiés sur des gènes d'effecteurs, nous avons analysé le polymorphisme de ces gènes grâce aux données génomiques de sept pathotypes. Les résultats montrent que la densité de SNPs (représentée par la distance moyenne entre deux SNP dans un gène) est plus importante chez les effecteurs comparativement à une sélection aléatoire de 125 gènes non-effecteurs (représentatifs du génome et considérés sous sélection neutre). Ces résultats suggèrent que les gènes d'effecteurs sont globalement sous sélection positive. Toutefois, le nombre de génomes séquencés n'était pas statistiquement suffisant dans cette étude pour déterminer, pour chaque gène et avec les outils adéquats (ex : D de Tajima ou Ka/Ks), le type de sélection auquel il avait été soumis. Deux catégories de gènes se dégagent de ces analyses : (i) les gènes conservés (monomorphes) probablement impliqués dans des fonctions de base de la virulence de *P. halstedii*, et (ii) les gènes polymorphes potentiellement impliqués dans la spécialisation à l'hôte qui seraient à l'origine des différents profils de virulence.

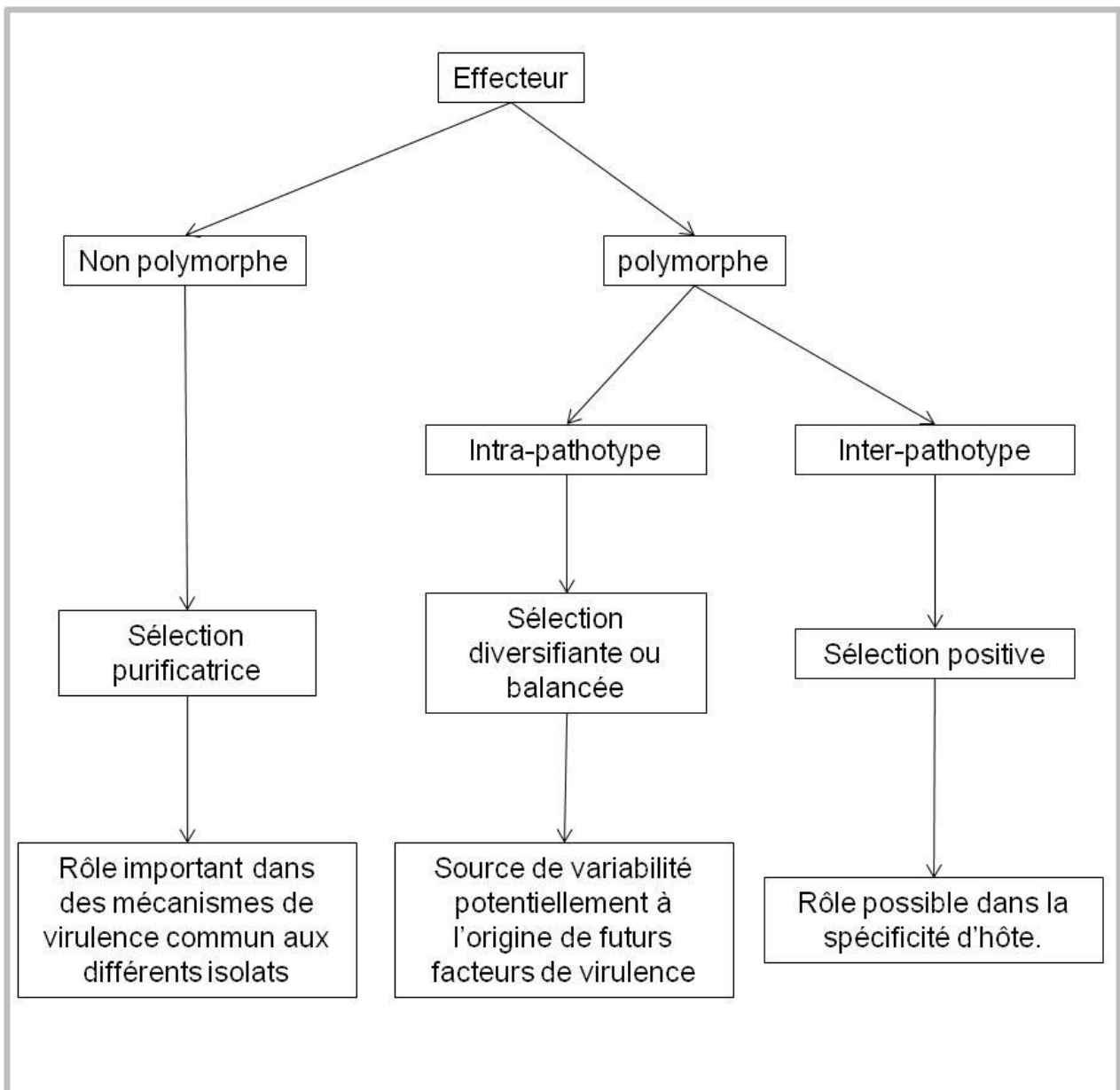
Du fait que les effecteurs étudiés aient été identifiés à partir de données de transcriptomique des pathotypes 710, 304, 703, et 100 de *P. halstedii*, séquencées par la technologie 454, ils ne représentent pas l'ensemble des effecteurs portés par les génomes des différents pathotypes de *P. halstedii*. Il serait donc intéressant d'identifier le répertoire total des effecteurs de *P. halstedii* à partir des données génomiques acquises sur 7 pathotypes, dont le pathotype modèle 710 (Chapitre III).

Pour créer une clé de détermination des pathotypes de *P. halstedii* qui pourrait être utilisée comme outil de diagnostic, l'identification de marqueurs de virulence fiable nécessite d'étudier le polymorphisme intra-pathotype. Par ailleurs, un polymorphisme de type intra-pathotype ne peut vraisemblablement pas être considéré comme en relation directe avec la spécificité de virulence,

et ne peut donc pas être utilisé comme marqueur de ce pathotype.

Une analyse plus poussée de ce polymorphisme utilisant 22 marqueurs KASP sur 35 isolats géographiques appartenant à 14 pathotypes de *P. halstedii* a alors permis de mettre en évidence du polymorphisme intra-pathotype pour plusieurs marqueurs, en particulier chez les trois pathotypes 700, 314, et 714 pour la première fois recensés respectivement en 1995, 2001, et 2002. Ainsi, pour un pathotype donné, nous pouvons distinguer deux types d'effecteurs polymorphes : (i) les effecteurs ne présentant pas de polymorphisme intra-pathotype et dont on pense qu'ils pourraient être liés au profil de virulence spécifique et (ii) les effecteurs présentant du polymorphisme intra-pathotype qui pourraient être une source de polymorphisme à l'origine de la création d'allèles apportant, dans certains environnements, un gain pour la valeur adaptative de *P. halstedii* (Cf Encadré 1). La sélection par l'environnement des isolats portant ces nouveaux allèles pourrait être à la base de l'émergence de nouveaux pathotypes de *P. halstedii*.

Parmi les 22 marqueurs KASP étudiés nous en avons sélectionné 8 permettant de distinguer 10 pathotypes sur les 14 identifiés en France lors du début de l'étude. Ces résultats posent des bases solides pour la création d'un outil de diagnostic que nous souhaiterions utiliser à terme pour discriminer la totalité des pathotypes auxquels appartiennent les isolats de *P. halstedii* prélevés au champ. Le remplacement des tests de phénotypage (« tests terre ») réalisés sur les hôtes différentiels de tournesol par cet outil pour identifier les pathotypes de *P. halstedii* devrait grandement faciliter le suivi épidémiologique de la maladie. Ce dispositif pourrait aussi intéresser les professionnels désireux d'améliorer la détection des pathotypes de *P. halstedii* présents sur leurs parcelles pour pouvoir anticiper le choix des semences utilisées. Néanmoins l'amélioration de cette clé de détermination nécessite l'augmentation du nombre d'isolats pour lesquels sont disponibles des données génomiques de qualité. Cette étude est en cours dans le cadre d'un projet ANR débuté en 2014 dans l'équipe. Dans un premier temps, cela permettrait de valider l'absence de polymorphisme intra-pathotype de ces 8 marqueurs sur l'ensemble des pathotypes que l'on souhaite discriminer. De plus, il est nécessaire d'identifier de nouveaux marqueurs à partir d'effecteurs polymorphes pour permettre à cette clé de détermination de distinguer l'ensemble des pathotypes de *P. halstedii*.



Encadré 1

IV. Conclusion.

Outre la mise en place d'une base solide pour la création d'une clé de détermination des pathotypes de *P. halstedii*, cette étude met en lumière les divers rôles que semblent avoir les effecteurs dans la virulence de l'agent pathogène. Pour corroborer les hypothèses énoncées dans ce chapitre, il semble nécessaire d'approfondir (i) l'étude de l'évolution des effecteurs de l'agent pathogène et (ii) le rôle fonctionnel de ces protéines.

Chapitre III: Identification et études fonctionnelles des effecteurs de pathogénicité de *P. halstedii*, l'agent pathogène responsable du mildiou chez le tournesol *H. annuus*.

I. Contexte.

Les premières données de séquences de *P. halstedii* ont été obtenues dans l'équipe par séquençage d'ADNc (As-sadi et al., 2011). Malgré les avantages qu'offrent ces données de transcriptomique (Chapitre II) celles-ci ne suffisent pas à identifier l'ensemble des effecteurs présents au sein du génome de *P. halstedii*. En effet, l'identification d'effecteurs à partir de données transcriptomiques n'est pas optimale pour les raisons suivantes: (i) la technologie 454 ne permet pas l'obtention d'une quantité suffisante de séquences de bonne qualité. Cette technique présente un taux d'erreurs non négligeables qui peut fausser les résultats dans les études de polymorphisme (Chapitre II); (ii) l'utilisation de données transcriptomiques permet d'accéder essentiellement aux gènes fortement exprimés dans les échantillons récoltés.

De plus, les ARNm ayant été extraits à partir de plantes infectées, les séquences obtenues proviennent du tournesol et de *P. halstedii* sans qu'il ne soit possible d'en déterminer avec certitude l'origine par des analyses bio-informatiques (As-sadi et al., 2011). Des données transcriptomiques complémentaires générées en 2009 dans le cadre d'une AIP Bio-Ressources INRA intitulée « Génomique des populations de *Plasmopara* » ont été associées aux premières données. Les cDNAs séquencés proviennent d'ARN messagers isolés de plantes infectées et de spores isolées de quatre pathotypes différents (100, 304, 703 et 710) de *P. halstedii* (Mestre et al., soumis). Les clusters de séquences de ces quatre pathotypes ont été assemblés globalement ce qui ne nous permet pas de connaître précisément la séquence de chaque pathotype. Une première base de données appelée PLHAL+, construite à partir de l'ensemble des séquences

obtenues, regroupe 80 354 contigs avec 130 678 singletons. Une seconde base de données contenant uniquement des séquences d'oomycètes (triées par homologie avec des séquences génomiques de *P. halstedii*) a été créée à partir des séquences PLHAL+, elle contient 17417 regroupements de séquences contigües ou clusters (Mestre et al., data not shown). Grâce au séquençage génomique du pathotype 710 par HiSeq Illumina, et à la définition du protéome de la souche par le service bio-informatique du LIPM en 2012, nous avons entrepris d'établir une liste exhaustive des effecteurs de *P. halstedii* basée (i) sur la recherche de séquences homologues aux effecteurs d'autre oomycètes (Chapitre II), et (ii) sur la présence de motifs protéiques conservés (RxLR-dEER et LxLFLAK-HVLVVVP).

Chez les oomycètes, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle des effecteurs en tant que facteurs de virulence, mais l'activité moléculaire de ces protéines reste largement inconnue aujourd'hui. De plus, la plupart des biotrophes obligatoires ne se cultivent pas en dehors de la plante ; il est par conséquent impossible, dans ces conditions, de sélectionner une souche d'intérêt sur un milieu sélectif. Cette caractéristique rend toute manipulation génétique extrêmement difficile, et les rares tentatives de transformation de spores de *P. halstedii* se sont révélées instables car les constructions de gènes introduites étaient perdues d'une génération à l'autre (Hammer et al., 2007).

Nous avons donc mis au point sur le tournesol des outils permettant l'analyse fonctionnelle des effecteurs putatifs de *P. halstedii* afin de confirmer leur rôle dans l'interaction plante-pathogène, en tant que facteur de virulence ou d'avirulence. L'étude fonctionnelle de ces protéines a pour but d'identifier au travers de diverses expérimentations, (i) où ces effecteurs interagissent, (ii) avec quelles cibles, et (iii) de quelles manières (activité de ces protéines) ils auront un impact sur l'immunité végétale. La compréhension des mécanismes moléculaires qui font de ces effecteurs des facteurs de virulence importants pour l'agent pathogène est nécessaire pour évaluer la durabilité des résistances ciblant ces protéines. En effet, cela permet d'estimer le nombre de mutations nécessaires pour contourner la résistance de la plante et leur coût sur la valeur adaptative (« fitness ») de l'agent pathogène (Cf IV.C. introduction générale). Plus ce coût est élevé, plus la résistance est susceptible d'être durable.

Les résultats obtenus sur 6 effecteurs RXLR et CRN de *P. halstedii* mettent en lumière une

diversité de localisation subcellulaire qui suggère des rôles différents des effecteurs testés dans la virulence de l'agent pathogène. L'induction spécifique de nécroses chez la variété de tournesol TSRM résistante a permis de proposer quatre effecteurs du pathotype 710 de *P. halstedii* comme gènes d'avirulence putatifs dirigés contre le gène de résistance *PI5*. Néanmoins de nouvelles expérimentations sont nécessaires pour déterminer plus en détail le rôle de ces protéines dans la virulence de *P. halstedii*, tel que l'impact de la surexpression ou de l'extinction de l'effecteur sur le développement de l'agent pathogène.

II. Manuscrit: Inventory and functional analysis of RXLR and CRN pathogenicity effectors of *Plasmopara halstedii*, the obligate biotrophic oomycete responsible for downy mildew in Sunflower, *Helianthus annuus*.

(Les résultats de ce chapitre ont été rédigés pour faire l'objet d'une publication que nous soumettrons dès que nous aurons apporté des éléments complémentaires)

Inventory and functional analysis of RXLR and CRN pathogenicity effectors of *Plasmopara halstedii*, the obligate biotrophic oomycete responsible for downy mildew in Sunflower, *Helianthus annuus*.

Abstract

Plasmopara halstedii is an obligate biotroph oomycete causing downy mildew disease on sunflower, an economically important cultivated crop. Disease symptoms observed in fields, plant dwarfism, leaf bleaching, sporulation and production of infertile flowers impair strongly seed yield. *P. halstedii* pathotypes are defined by their divergent virulence profiles in a set of sunflower differential hosts carrying different *PI* Resistance genes, not yet cloned. Number of pathotypes increased to 16 during the last 25 years in France, concomitantly with the breakdown of *PI* resistance loci used in fields. Studying disease infection mechanisms and pathogen molecular determinants is a prerequisite for deciphering plant sustainable resistance.

In silico analyses (Patscan and PSI-TBLASTN) on the genome of *P. halstedii* pathotype 710 led to identification of hundreds putative RXLR and CRN effectors genes potentially expressed in sunflower infected tissues according to transcriptomic data. In order to decipher the functional role of *P. halstedii* effectors, transient expression in sunflower was performed with selected putative effectors fused to GFP. Confocal microscopy highlights the high diversity of effector subcellular localization (Nucleus, cytoplasm, vesicles and plasma membrane). Moreover four effectors expressed in sunflower (2 CRNs and 2 RXLRs) induced necrosis at a significant higher level than GFP alone. The necrosis levels were significantly higher when these four effectors were expressed in the leaves of the resistant TSRM sunflower line compared to TS susceptible line, suggesting that they could be recognized as avirulence genes by the *PI5* resistance gene present in TSRM.

Introduction

Helianthus annuus (sunflower), Asteraceae, is a field crop cultivated mostly in Russia, Ukraine and European Union (EU) (Romania, Bulgaria, Spain and France) notably in poor land without irrigation because it needs not much water and chemical inputs in contrast to other oil crops. Sunflower is the fourth most widely grown oil crop in the world after oil palm, soybean and rapeseed, but second in the European Union, produces healthy oil rich in unsaturated fatty acids, mainly used for food (Human and animals) and oleochemical industries. Total sunflower production increased worldwide by 32 % over the past 20 years, reaching 38 million tons in 2012 (FAOSTAT).

Many oomycetes are known as plant pathogens drawing their nutrients from host (Thines and Kamoun, 2010). For this purpose obligate biotrophs filamentous organisms like downy mildews used infection structures named haustoria to release effectors proteins (Morgan and Kamoun, 2007). Effectors are secreted in the apoplast where they could play multiple roles in the establishment of the interaction between the plant and the oomycete. Other effectors (cytoplasmic effector) could be translocated (Kale et al., 2010; Petre and Kamoun, 2014) into plant cell cytoplasm to modify plant processes resulting in remobilization of plant nutrients toward the pathogen, and inhibition of pathogen perception by plant Pattern Recognition Receptors (PRRs) (Han and Jung, 2013; Macho and Zipfel, 2014) and the defence mechanisms resulting (Göhre and Robatzek, 2008). This suppression of plant defences induced susceptibility and compatibility of the interaction is named Effector-Triggered-Susceptibility (ETS) (Morgan and Kamoun, 2007). Alternatively, plants can recognize effectors as non-self (avirulence protein) leading to the activation of its defences and to the incompatibility of the interaction named Effector Triggered Immunity (ETI). These complex mechanisms were described in the simplified zig-zag model (Jones and Dangl, 2006; Hein et al., 2009).

Cytoplasmic effectors have been found in all genomes of plant pathogen oomycetes sequenced to date (Tyler et al., 2006; Haas et al., 2009; Kunjeti et al., 2012; Lamour et al., 2012; Stam et al., 2013b; Baxter et al., 2010; Stassen et al., 2012; Links et al., 2011; Kemen et

al., 2011a; Lévesque et al., 2010). The sequencing of two oomycete genomes in particular, those of *Ph. infestans* and *Hyaloperonospora arabidopsidis* led to the genomic localization of effector repertoire and highlighted effector role in the evolution of oomycete pathogenicity (Haas et al., 2009; Baxter et al., 2010). Indeed, in the large genome of *Phytophthora infestans* (240 Mb), most of the 563 cytoplasmic effector genes are found in regions characterized by low gene density and high density of transposable and repeated elements (Haas et al., 2009; Cooke et al., 2012). These genomic regions are supposed to favour mutations and recombinations in effector genes (Raffaele et al., 2010), that could play a role in pathogen evolution (Pais et al., 2013; Adhikari et al., 2013; Cooke et al., 2012; Baltrus et al., 2011; Krasileva et al., 2011; Goritschnig et al., 2012; Yin et al., 2013; Dong et al., 2014).

In oomycetes, two classes of cytoplasmic effectors were characterized. The RxLR family of cytoplasmic effectors is defined by the RxLR-dEER motif necessary and sufficient to translocate into host cells (Birch et al., 2009). LxLFLAK motif provides the same functions in CRN (Crinkling and Necrosis) effectors (Schornack et al., 2010). Although RxLR and CRN effectors are expected to present in their N-terminal region a signal peptide allowing them exiting the oomycete cell, there are reports of CRNs not containing canonical signal peptides being translocated to the host cell (Stam et al., 2013b). A third class of oomycete cytoplasmic effector characterized by a cysteine-histidine-x-cysteine (CHxC) motif in their N-terminal part was identified in the oomycete *Albugo laibachii* (Kemen et al., 2011a).

In plant cells, effector proteins were found to be targeted in various subcellular compartments like nucleus, cytoplasm and plasma membrane, according to their function in pathogen virulence (Caillaud et al., 2012; Stam et al., 2013a) but effector plant targets were identified only in few cases. Several RxLRs have been reported as being recognized by plant resistance (R) genes or to act as suppressors of plant innate immunity (Bos et al., 2006; Fabro et al., 2011; Vleeshouwers et al., 2008). Indeed most oomycete Avr proteins characterized belong to the RxLR effector family (Jiang and Tyler, 2012). To date, direct plant targets of RxLR proteins have been characterized for *Ph. infestans* Avr3a (Bos et al., 2010a), Avrblb2 (Bozkurt et al., 2011) and AVR2 (Saunders et al., 2012), and *Hyaloperonospora arabidopsidis* HaRxL44 (Caillaud et al., 2013). *Phytophthora infestans* RxLR effector PexRD2 was shown to interact with a MAPKKK in host cell cytoplasm suppressing plant immune

signalling (King et al., 2014). Stabilization of host E3 ligase CMPG1 by *Ph. infestans* AVR3a RxLR effector suppresses program cell death (so called Hypersensitive response) induced by INF1 (infestin) perception in *Nicotiana benthamiana* (Bos et al., 2006, 2010a). But AVR3a is also able to induce hypersensitive response in plant carrying the associated R3a resistance gene (Bos et al., 2006). This illustrates that, depending on plant resistance gene content, the same effector could act as a suppressor or as a signal inducer of plant cell immunity.

CRN effectors were first identified for their ability to induce plant cell death and defence reaction (Torto et al., 2003; Dodds et al., 2009). But Liu *et al.*, in 2011 found CRN effectors of *Phytophthora sojae* that were able to suppress cell death, fitting better the biotrophic lifestyle of the pathogen. The necrotic activity of several CRN has been shown as dependent on their addressing to the nucleus of the host plant (Schornack et al., 2010). 36 types of CRN C-terminal domains and 8 additional singletons in *Ph. infestans* were described in *Ph. infestans* (Haas et al., 2009), most of which are also found in other *Phytophthora* species (Stam et al., 2013b). However, most of these domains do not seem to correspond to any known function, and the role of most CRN proteins is still unknown. Exceptions include *Ph. infestans* CRN8, that shows kinase activity *in planta* and is important for full virulence (van Damme et al., 2012) and two CRN effectors from *Ph. sojae* that were shown to be involved in pathogen virulence and in the induction or suppression of plant cell death (Haas et al., 2009; Liu et al., 2010; Stam et al., 2013a).

The oomycete *Plasmopara halstedii* is the causal agent of downy mildew on *H. annuus* (Berl. & De Toni 1988) as *Pseudoperonospora cubensis*, on cucurbit (Savory et al., 2011; Burkhardt and Day, 2013), *Plasmopara viticola* on grape (Gessler et al., 2011), and *Hyaloperonospora arabidopsidis* on the model plant *Arabidopsis thaliana* (Coates and Beynon, 2010). This pathogen presents a highly complex life style with multiple structures of infection and dissemination (Gascuel *et al.*, *in press*). Oomycete, despite their morphological similarity with fungi, form a distinct group in which *P. halstedii* belongs to the family of Peronosporaceae.

H. annuus and *P. halstedii* are both originated from North America where a co-evolution took place (Heiser, 2007). Significant yield loss is caused by this disease mainly characterized by dwarf phenotype and infertile capitulum (Gascuel *et al.*, *in press*). Furthermore, *P. halstedii* present a complex life style, in which sexual and asexual reproductions form a fertile ground for pathogen evolution. Discovered in France around 1960, its impact and propagation was initially restricted by chemical control (polluting and expensive), spreading the fungicide “mefenoxam”. However resistant pathotypes to this fungicide appeared during the last decade (M.L. Molinero-Ruiz, M.M. Cordón-Torres and J.M. Melero-Vara, 2008). In France, Sixteen pathotypes of *P. halstedii* were defined on the basis of their divergent virulence profile on a set of 9 differential sunflower hosts carrying different *PI* resistance genes (for a review on *P. halstedii*, see Gascuel *et al.*, *in press*).

In order to stem the disease, two types of genetic resistances were identified. First, complete race-specific resistances (qualitative) conferred by *PI* (*P. halstedii* resistance locus) plant loci were found within wild ecotypes and used in the development of resistant varieties of *H. annuus*. Often organized into clusters, *PI* genes of sunflower are located on Linkage Group 1 (LG1) (*PIArg*; *PI13* and *PI16*) (Dussle *et al.*, 2004), LG8 (*PI1*, *PI2*, *PI6* and *PI7*) and LG 13 (*PI5* and *PI8*) (Wieckhorst *et al.*, 2010). Some of these loci contain several genes encoding Toll/interleukin-1 receptor-nucleotide-binding site-leucine-rich repeat (TIR-NBS-LRR) (*PI1/PI2/PI6* and *PI7* region) (Bert *et al.*, 2001) or CC-NBS-LRR (*PI5/PI8* and *PI21* region) proteins (Radwan *et al.*, 2004, 2005a). Generally, NBS-LRR genes show three distinct regions: a variable N-terminus, a nucleotide binding site (NBS) and a leucine rich repeat (LRR) (Marone *et al.*, 2013; Michelmore *et al.*, 2013). These families of protein represent the majority of R-genes identified today. In many incompatible interactions, such resistant (R) proteins are involved in recognition of pathogen avirulence protein triggering plant defenses and often the hypersensitive reaction (HR), a localized programmed cell death preventing pathogen colonization. But, despite HR-like responses were described in the case of *PI8* locus and the race 300 of *P. halstedii* (Radwan *et al.*, 2003), no *PI* gene and no avirulence gene have been yet characterized in sunflower downy mildew interactions.

A quantitative resistance to downy mildew has also been reported in sunflower responsible for a reduction of disease symptoms. It is conferred by three QTL: two minor QTL on Linkage

Group (LG) 8 and 7 and a major QTL, explaining 38% of resistance, named QRM1 (Quantitative Resistance to Mildew 1) was localized on LG10 (Vear et al., 2008). They do not co-localize with any *Pl* locus. Positional cloning of QRM1 has been started based on DNA-based polymorphic markers and a BAC library of XRQ line carrying QRM1-R.QRM1 is currently localized on a 1,5 cM interval, and a map-based cloning approach is underway (Vincourt et al., 2012).

Pl resistances, although effective against a few pathotypes of *P. halstedii*, have been overcome with the apparition of novel virulent pathotypes of the pathogen since 1988 (16 in France (Delmotte et al., 2008; CETIOM), 35 worldwide). The lack of sunflower genome available (in progress) due to its size and complexity, and the absence of cloned plant resistant gene, are the reasons for which we chose to focus on *P. halstedii* effectors. Recently, we identified 54 putative Crinkler (CRN) or RXLR effector genes using PSI-TBLASTN analyses on transcriptomic data from four *P. halstedii* pathotypes (Gascuel et al., chapitre II). We investigated the genetic diversity of those genes in seven *P. halstedii* reference pathotypes for which genomic data were available. Our results highlight that *P. halstedii* repertoire of effector genes present a complex organisation with non-polymorphic genes and highly polymorphic genes. All together, these genes could play an important role in pathogen virulence.

Here we aimed to make an exhaustive list of *P. halstedii* effectors based on *in silico* searches on the genome of *P. halstedii* pathotype 710. Effector searches based on sequence homology (PSI-TBLASTN) and conserved functional motives (Patscan) were done and led to the identification of hundreds candidate effector genes, mostly CRN, and RxLR.

The functional roles of eight *P. halstedii* effectors, 2 CRN and 6 RXLR, were investigated by transient expression *in planta* in sunflower leaves using an agroinfection method we have developed. A high diversity of subcellular localization was found for *P. halstedii* effector proteins. Moreover, four effectors, 2 CRN and 2 RXLR, induced necrosis in resistant sunflower leaves, their potential roles as avirulence genes are discussed.

Results:

Identification of *P. halstedii* putative effectors (Workflow Figure 1).

An exhaustive list of *P. halstedii* putative effector genes was searched from the sequenced genome of the 710 pathotype. This pathotype was chosen as a model because it is strongly present in France and revealed PI5, PI6 and QRM1 resistances. Quality of genome assembly are described in Figure 1. Previously estimated around 100 Mbp by flux cytometry (data not shown), a 70 Mbp genomic alignment was obtained, and should correspond to the major part of the genome deprived of highly repeated elements. Genome annotation was done using available transcriptomic data (As sadi et al., 2011; Mestre et al., data not shown). 41 702 putative peptides, corresponding to the proteome of pathotype 710, were predicted from the genome (see M&M). Among them 5735 were predicted as secreted proteins because of signal peptide detection (Interproscan annotation) and 12 536 putative proteins had an interpro annotation (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

The 710 *P. halstedii* complete proteome (41 702 peptidess) was screened by PSI-TBLASTN, in order to find the proteins showing sequence homology with known oomycete effectors (CRN, RxLR; see M&M). 219 CRN and 46 RxLR were identified (Figure 2). By Patscan analysis, we looked for *P. halstedii* proteins with translocation motives conserved in oomycete CRN and RxLR cytoplasmic effectors (ref pour CRN, Tyler et al., 2006; Rehmany et al., 2005). List of motives used are provided in Table 2. Using canonical LxLFLAK or LxLSLAK motifs (Table 1 confidence levels annotated as “very good”) 21 putative CRN having an HVLVVVP motif were identified in *P. halstedii* proteome. Nevertheless, if we broaden the search to less canonical CRN motifs (Mismatch allowed), a total of 143 putative CRNs were found (Table 1 confidence levels annotated as “good” or “medium”). Among all of them, a signal peptide was detected on 61

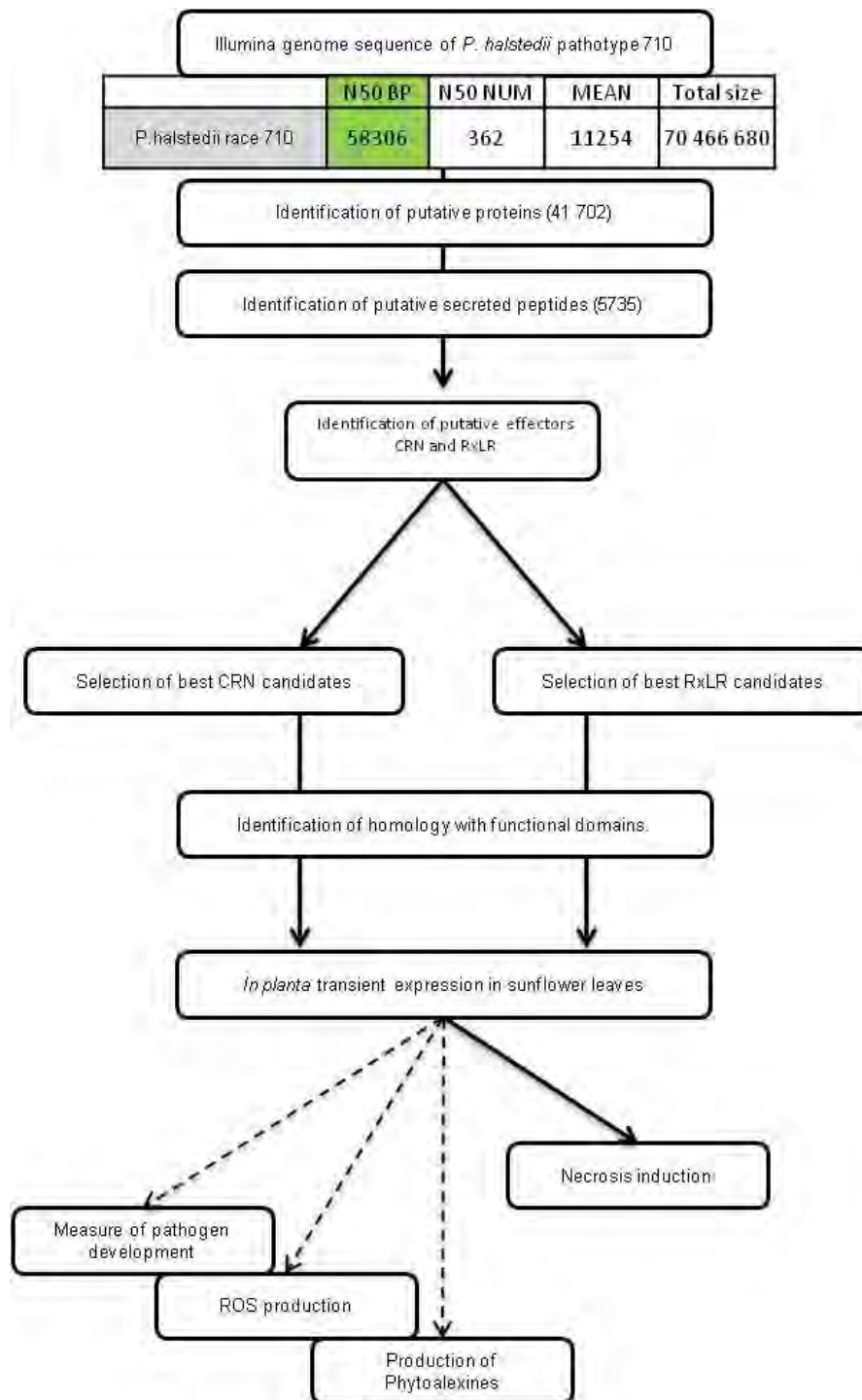


Figure 1: Workflow. N50 BP: Contig length such that using equal or longer contigs produces half the bases of the assembly (nt). N50 NUM: Number of contigs longest than N50 (i.e. number of contigs covering 50% of assembly). MEAN: Contig length average (nt). Total size: Assembly size (nt)

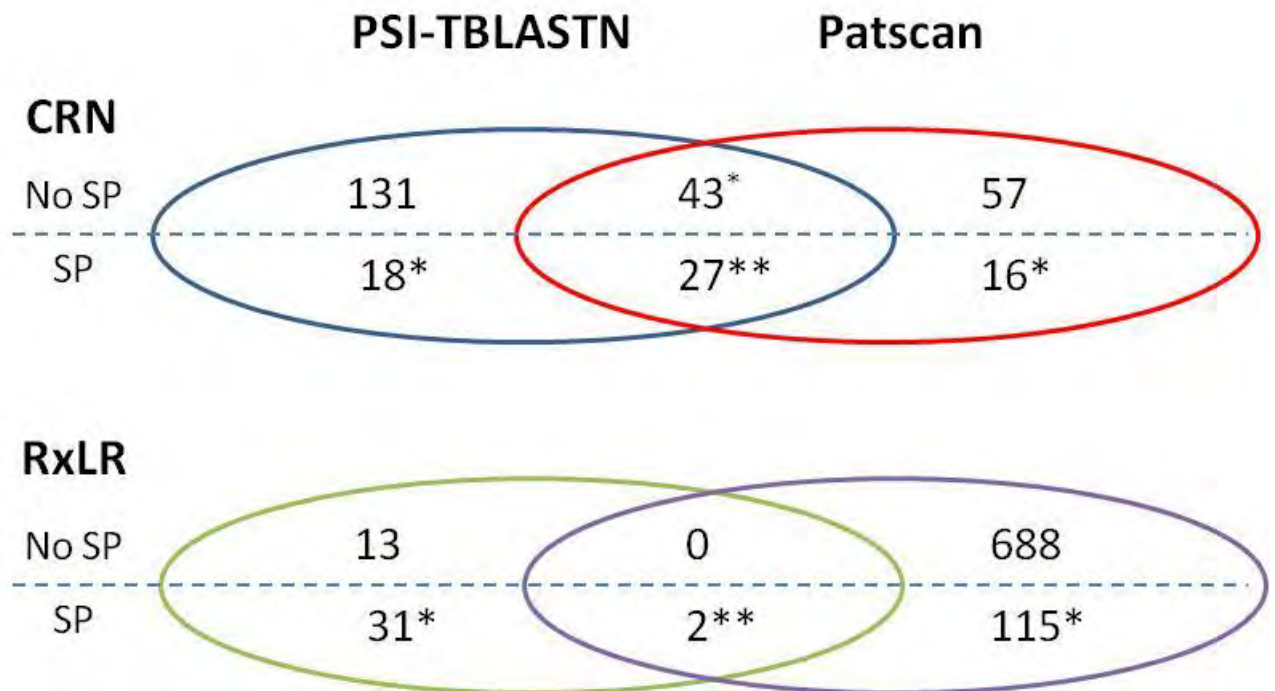


Figure 2: Venn diagram showing the number of *P. halstedii* candidates CRN and RxLR effector genes found by PSI-TBLASTN analysis (left circle), patscan analysis (right circle), or both (interaction between both circles), in the 710 pathotype of *P. halstedii*. In each category, were distinguished proteins with (SP) or without (no SP) signal peptide. Level of confidence $\phi < **$.

putative CRN (Figure 2). According to RxLR-type effectors, 42 putative effectors were identified with the strict RxLR-dEER motif in *P. halstedii* proteome. But if we search variant motives with mismatch in RxLR and dEER motif (Table 1 confidence levels annotated as “good”), we could find 805 putative RxLR including 117 with a signal peptide detected by Interproscan annotation (Figure 2).

Comparing both PSI-TBLASTN and patscan methods, 70 CRN and only 2 RxLR *P. halstedii* candidate effector proteins were identified in common (Figure 2).

The CHxC class of oomycete cytoplasmic effector characterized in the oomycete *Albugo laibachii* was searched in *P. halstedii* (Kemen *et al.*, 2011). Patscan analysis revealed 37 CHxC putative effectors in *P. halstedii* 710 proteome, among which five present a signal peptide.

Structure and functional domains of *P. halstedii* effectors

The total effector predictions from *P. halstedii*, *i. e.* 292 predicted CRN and 849 RxLR proteins were examined with Interpro software in order to reveal putative functional domains. Not surprisingly, the proportion of putative *P. halstedii* effector proteins with an interpro annotation did not exceed 16% for CRN and 30% for RxLR regardless of *in silico* analysis (data not shown). Regardless of the type of analysis, the proportion of effector genes with Interpro annotation is higher for RxLR compared to CRN. This trend is much the same if we take into account only effector genes with signal peptide. Compared to PSI-TBLASTN, PATSCAN method gives a higher rate of *P. halstedii* effector genes with interpro annotated functional domains, mainly for RXLRs.

Figure 3 describes the type of Interpro annotation domains and their occurrence in *P. halstedii* putative RxLR effectors found by Patscan and PSI-TBLASTN. Most domains were grouped under the term “other or unknown domains” because they were not related to putative virulence functions. Functional domains with Interpro annotation that could be related to virulence were grouped by general functions: (i) signal transduction, (ii) protein degradation, (iii) protein-protein interaction, (iv) transport, (v) regulation of gene expression, and (vi) retrotransposase activity. Some domains couldn't be grouped with others like ribonuclease domain, a domain

Proteic domains found on *P. halstedii* RXLR effectors

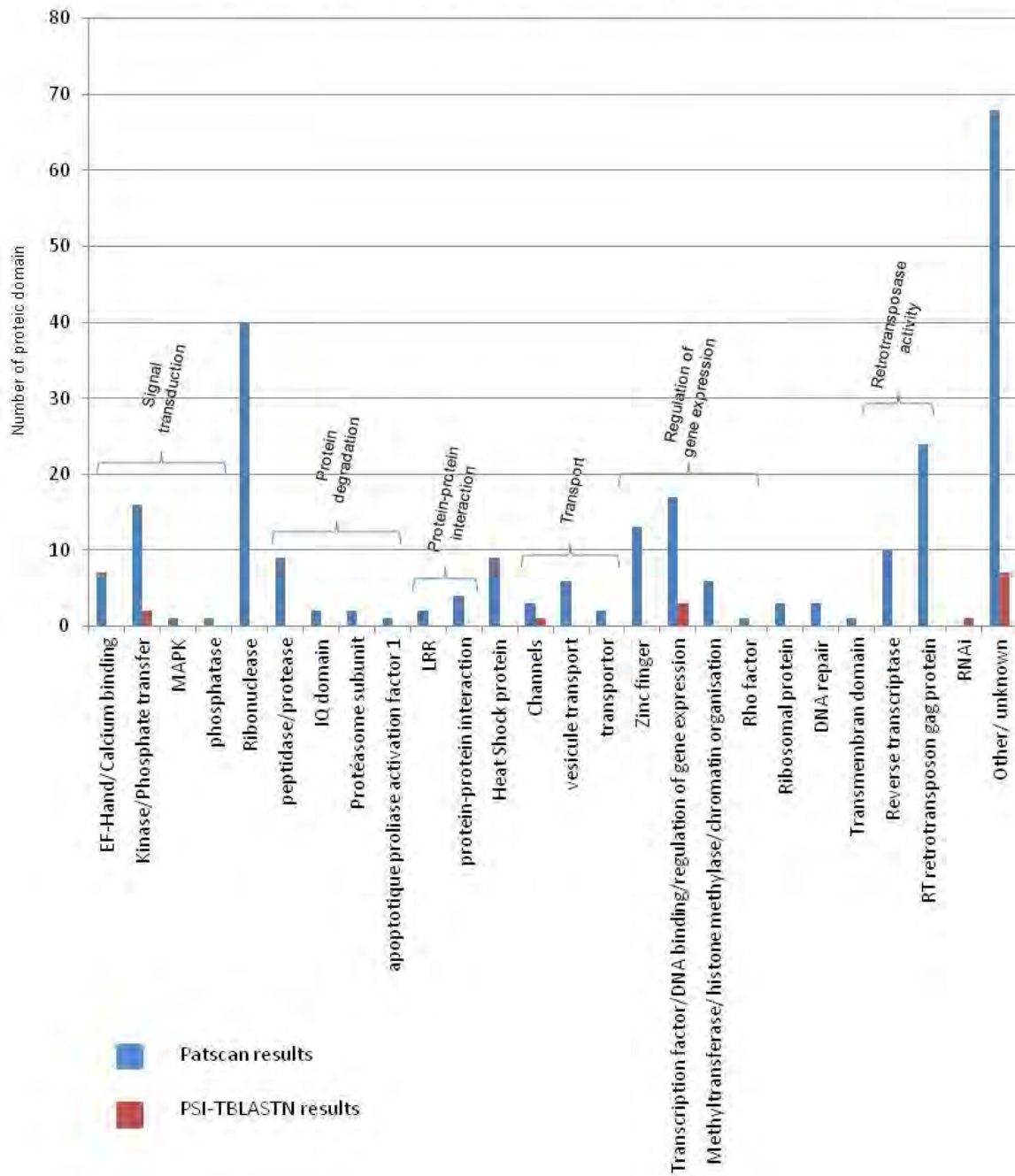


Figure 3: Proteic domains of *P. halstedii* RxLR effectors found by Patscan or PSI-TBLASTN analysis.

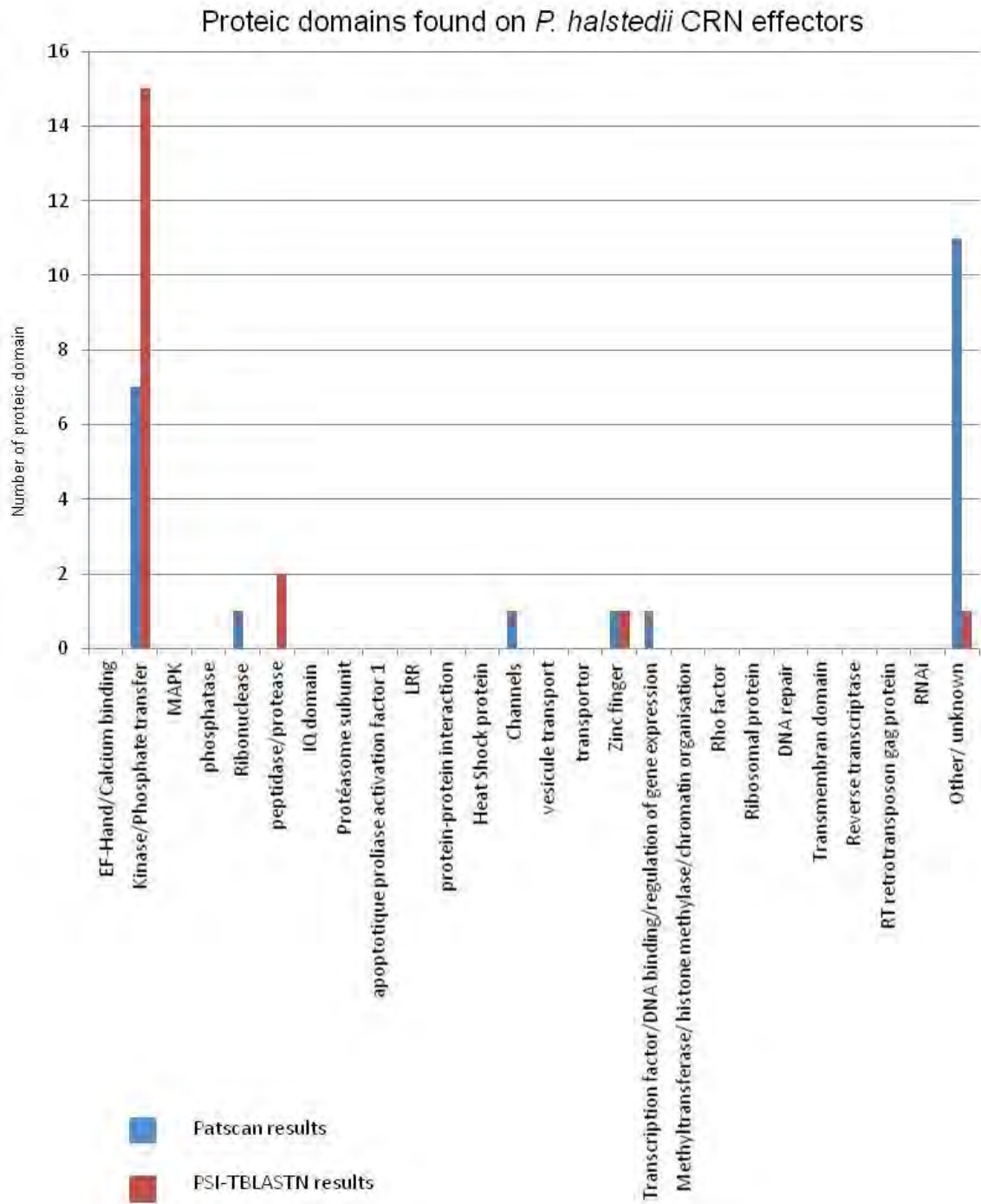


Figure 4: Proteic domains of *P. halstedii* CRN effectors found by Patscan or PSI-TBLASTN analysis.

surprisingly highly represented in RXLRs. On Figure 4 the same analysis was done on CRN effectors with a lower number of domains than RxLR effectors, with a domain represented at a high frequency kinase-phosphate transporter.

Subcellular localization of *P. halstedii* effectors.

Based on the presence of (i) signal peptide, (ii) translocation domain, and (iii) similarity with oomycete effector genes we selected some *P. halstedii* genes as potentially functional effector candidates. Among them, 13 effectors (11 RXLR and 2 CRN) were cloned and used for functional studies in sunflower (Table S1). TS and TSRM near isogenic sunflower lines were used in transient expression assays because TS is susceptible to *P. halstedii* pathotype 710 (no *Pl* gene) whereas TSRM is resistant because of introgression of *PI5* resistance gene in TS genotype. In epidermal cells of TS and TSRM leaves, transient expression of GFP fused to the 35S promoter leads to the fluorescence of nuclei and cytoplasmic compartments (Figure 5), as observed in *Nicotiana benthamiana* leaves (data not shown). The subcellular localization of six putative effector proteins was determined in sunflower leaves by transient expression of GFP constructs *in planta* (Figure 5). The size of the fusion between effector proteins and GFP expressed in sunflower leaves was checked by western blot analysis for both plant genotypes and confirmed the absence of cleavage between the effector and GFP (Figure 5). GFP fusions before or after the effector were tested for three effectors and the best combinations were further analysed.

Different subcellular localizations were observed for *P. halstedii* effectors fused to GFP (Figure 5). Similar subcellular localizations were observed in TS or in TSRM sunflower leaves (data not shown). PhRXLR48::GFP gave a bright fluorescence in cytoplasm and nucleus, like native GFP. Three of them, the CRN PhCRN37 and 2 RXLRs, PhRXLR02.1 and PhRXLR06, were localized in or close to the sunflower nucleus. *P. halstedii* effector PhCRN37 was localized into the plant nucleoplasm whereas PhRXLR02.1 was located in the nucleoplasm and in the nucleolus where it gave a brighter signal, suggesting a higher concentration of the fusion protein in the nucleolus. PhRXLR06 was localized in unidentified putative organelles around the nucleus that might be endoplasmic reticulum vesicles.

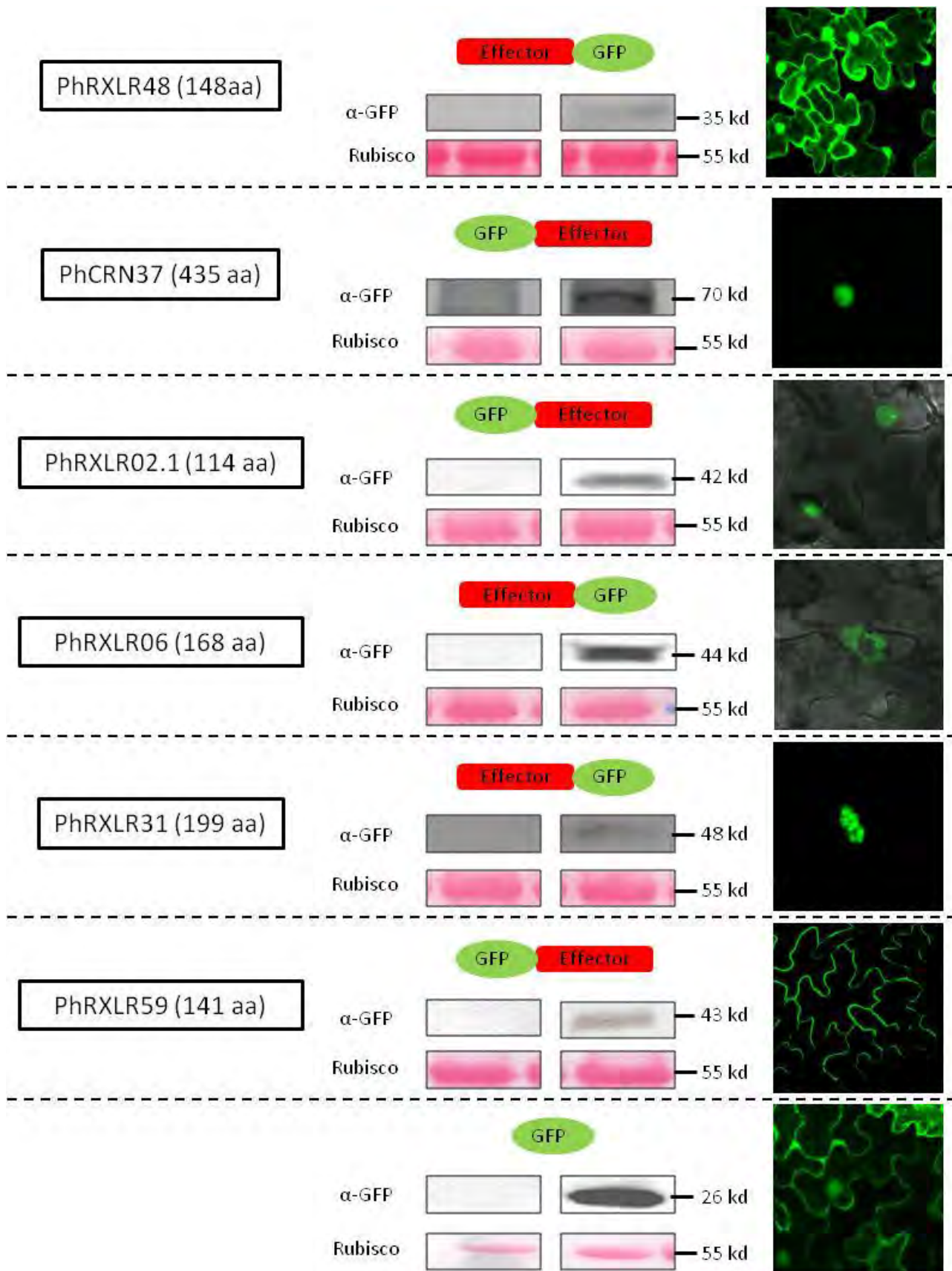


Figure 5: Subcellular localization of effectors fused to GFP and expressed transiently in sunflower leaves. Western Blot were done to check the fusion between GFP and effector proteins.

The effector protein PhRXLR31 fused to GFP showed fluorescence in the cytoplasm, in coalescent unidentified granules. Transient expression of the same construct in *N. benthamiana* showed a dynamic movement of these cytoplasmic granules (data not shown). In that specific case, the presence of the signal peptide of the PhRXLR31 effector in the GFP fusion could be responsible for the subcellular localization observed. Surprisingly, PhRXLR59 fused to GFP was located on the plasma membrane of the plant cell. In all other GFP constructs, the signal peptide of the effector was removed.

Four *P. halstedii* putative effectors induce necrosis in the resistant TSRM sunflower line.

The effect of transient overexpression of each effector fused to GFP was estimated in sunflower leaves using a rating scale from zero (no necrosis) to 5 (a dry necrosis extending all over the infiltrated area) (Figure 6a). Four effectors among the 7 expressed in sunflower (2 CRNs and 5 RXLRs) induced necrosis at a significant higher level than GFP alone: 2 *P. halstedii* CRN, PhCRN37 (Figures 5 and 6A), and PhCRN38 whose localization is still unknown (Figures 6B), and 2 RXLRs, PhRXLR31 (Figures 5 and 6C) and PhRXLR48 (Figure 5). The necrosis levels were significantly higher when these four effectors were expressed in the leaves of the resistant TSRM sunflower line compared to TS susceptible line, suggesting that they could be recognized as avirulence genes by the *P15* resistance gene present in TSRM.

Discussion

Comparison between PSI-TBLASTN and PATSCAN analyses.

Interestingly, most of the *P. halstedii* CRN effectors were identified from PSI-TBLASTN analysis compared to Patscan analysis (Figure 2). But if we consider only CRN proteins with signal peptide detected by SignalP3.0, the numbers of CRN effectors identified in common in both analyses is higher than the number of CRN specific to each analysis. The 70 CRNs found in common with both analyses could be considered as good candidates.

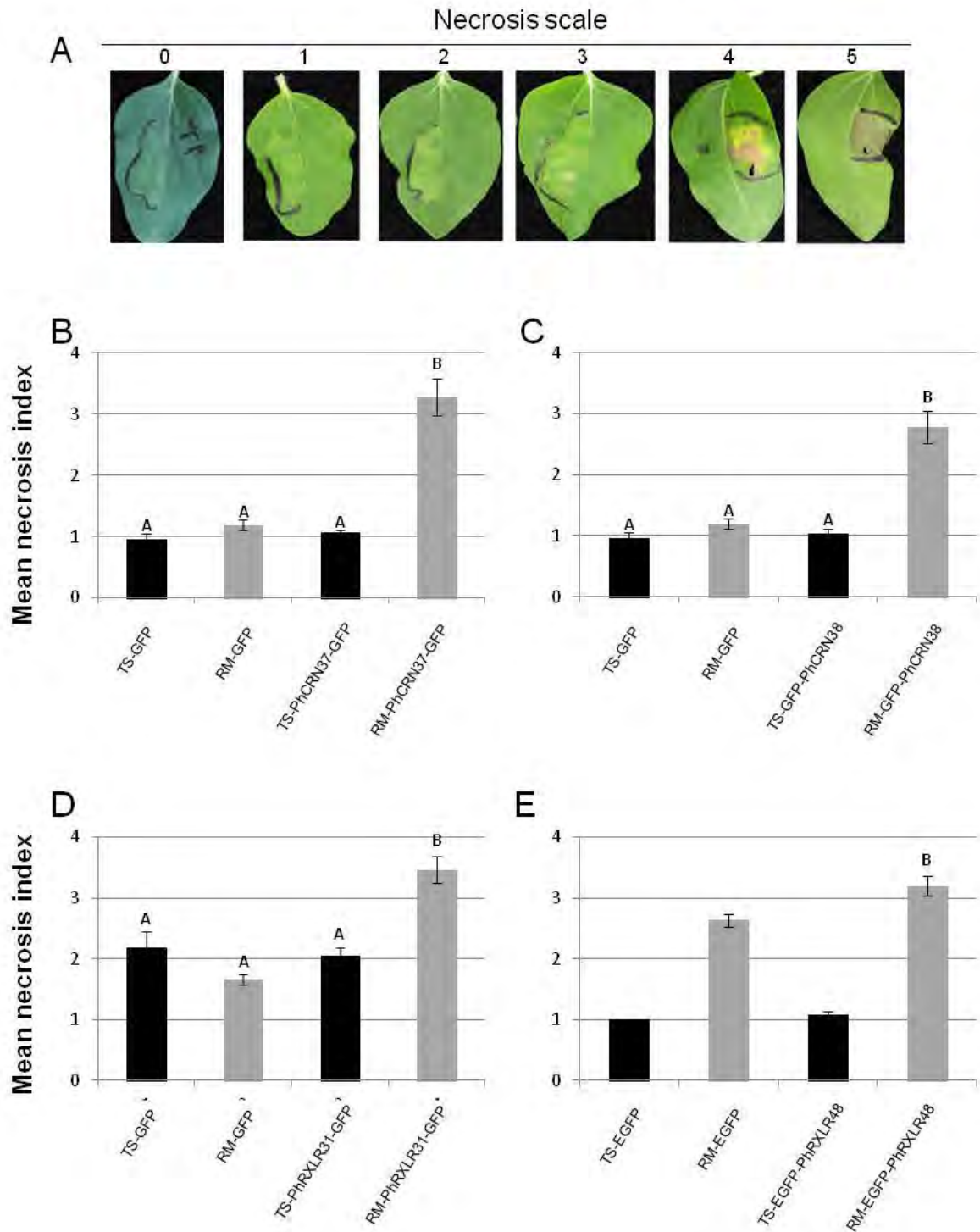


Figure 6: Induction of necrosis by transient expression of *P. halstedii* effectors in sunflower leaves. (A) Necrosis index represent the level of observed symptoms from 0 to 5. (B-D) Mean of necrosis index for each effector. Error bar represent the standard error. Student test showed that necrosis induced by *P. halstedii* effectors were more important on TSRM plants compared to TS plants and control construction.

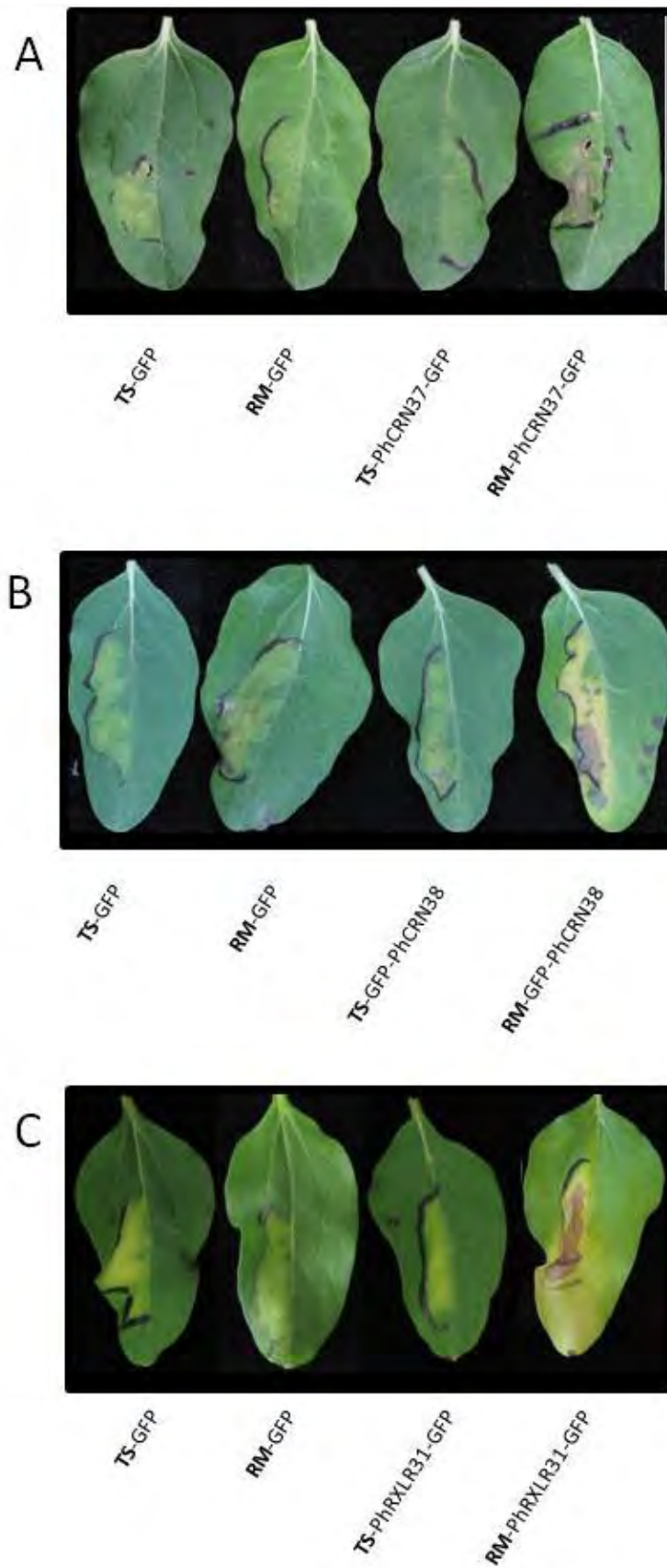


Figure 7: Photography of necrosis induced by transient expression of *P. halstedii* effectors in sunflower leaves.

Despite the importance of signal peptide to deliver *P. halstedii* effectors in apoplastic area, most of them don't present a signal peptide detected by usual softwares (Interproscan). Among the full length CRN proteins identified in *Phytophthora capsici* genome, 58% have a canonical signal peptide (Stam et al., 2013b). We could hypothesis either that canonical signal peptide is not the only way by which the pathogen secrete peptides, or effectors without signal peptide could correspond to pseudogenes. Alternatively, other consensus signal peptide specific to *P. halstedii* or other unknown mechanisms might be used to secrete these proteins.

Conversely, despite the important list of oomycete effectors used for the PSI-TBLASTN search, RxLR *P. halstedii* putative effector proteins were mostly found by patscan analysis. Only 2 genes found by both PSI-TBLASTN and Patscan analysis. For functional studies, we favoured effector candidates which presented several effector characteristics (Signal peptide, translocation domain, homology with oomycete effectors)

These results suggest that *P. halstedii* RxLR genes were very specific to this pathogen, whereas *P. halstedii* CRNs would be more conserved among different oomycete species, as already mentioned (Hein et al., 2009; Haas et al., 2009; Fabro et al., 2011; Links et al., 2011). These results are consistent with the fact that CRN are considered as an ancestral class of effector specific to oomycetes (Schornack et al., 2010). We may hypothesize that CRN could be involved in mechanisms common to all oomycetes, whereas, RxLR could be more implicated in host specificity isolates and pathogen virulence evolution. Moreover, the large number of RxLR candidates could be due to the expansion of this effector family as described for *Phytophthora infestans* RxLR (Haas et al., 2009). Therefore, it could be expected that the specificity of interaction between *P. halstedii* pathotypes and sunflower genotypes is more associated with RXLR than with CRN effectors.

The fact that we found by PSI-TBLASTN, effector candidates without canonical translocation domains, also suggest that research of new conserved motifs could be done on *P. halstedii* secreted proteins using MEME algorithms (Bailey et al., 2006, 2009). All together, these results highlight the difficulty of identifying true effectors from sequence data.

Effector gene expression levels as a way to select true effector genes

One way to identify true effector genes is to measure their expression. We actually dissected the interaction between *P. halstedii* and sunflower in time and space to find when and where effector genes are expressed and thus suggest their role in pathogen virulence. Contrary to expression levels of pathogen reference genes which were reproducible, expression of effector genes showed a high variability between the three biological repetitions that makes the results poorly usable (data not shown). This high variability could be due to the difficulty to synchronize the developmental stages of *P. halstedii* during its interaction within the plant. Nevertheless, we checked that the effector genes used in our functional studies were expressed at early stages of the interaction, in sunflower infected roots and hypocotyls. Further experiments should be necessary to identify other effector candidates, in particular strongly expressed genes during the interaction.

Global analysis of *P. halstedii* effector functional domains.

Prediction of effector functions could be done through analysis of the effector protein structure predicted from amino acid sequence. During the protein annotation process, we found domains which could be involved in various cellular processes. A higher proportion of conserved functional domains were found in RxLR genes compared to CRN.

Among RxLR genes, we found signal transduction domain like EF-Hand, Kinase or MAPK suggesting their role in inhibition of plant signal pathways. Indeed, RxLR effector proteins could inhibit induction of plant defenses through direct interaction with plant proteins which are involved in danger signal transduction, or with calcium signal. For a comparison, the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* secretes the AvrPiz-t effector which inhibits PAMP by interacting with the RING E3 ubiquitin ligase APIP6, leading to their mutual degradation (Park et al., 2012). *P. halstedii* putative RXLRs which were identified with predicted Zinc finger and other motives involved in DNA binding or histone organization could modulate plant gene expression. To a lesser extent, effector candidates showed domains usually conserved among channels, transporters and proteins involving in vesicle transport, suggesting a hypothetical role of inhibiting the delivery of antimicrobial compounds to

infection site (Lindeberg et al., 2012). Surprisingly, we found lots of ribonuclease domains among *P. halstedii* putative RXLR effectors. In 2013, Pliego *et al.*, found two effectors, BEC1011 and BEC1054, with ribonuclease domains from barley powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *Hordei*). Nevertheless, the catalytic sites necessary for ribonuclease activity were not conserved suggesting they could play another role as RNA binding. We also found domains related to reverse transcriptase that could result from retrotransposon activity which could be intense in genomic region where effector genes were supposed to be localized. Insertions of these domains could have disrupted the function of the putative effectors.

Among the few functional domains found in CRN, almost all were kinase domains. More precisely, all functional domains of CRN effectors identified by both Patscan and PSI-TBLASTN analysis were kinase domains (data not shown). Few CRN functions have been described but *Ph. infestans* CRN8 shows kinase activity *in planta* and is important for full virulence (van Damme et al., 2012). Nevertheless, lots of functional domains identified in CRN and RxLR effector candidate genes present unexpected function in pathogen virulence and it cannot be excluded that they don't correspond to real effectors.

Surprisingly, we identified more predicted functional domains conserved within C-terminal protein domains of RxLR genes compared to CRN whereas CRN effector seems to be more conserved among oomycete genomes (Schornack et al., 2010).

Subcellular localization of 6 *P. halstedii* effectors in sunflower

In planta transient expression into sunflower leaves has not been routinely applied because of the lack of efficient protocol and difficulties with infiltration, especially due to the structure of the leaf and the thickness of the epidermis. A method of transient transformation of detached sunflower leaf discs infiltrated *under vacuo* with *Agrobacterium tumefaciens* has been indeed proposed in order to overcome structural leaf problems and low bacterial transformation efficiencies (Manavella and Chan, 2009). The adaptation of this protocol to transient transformation of sunflower leaves of entire plants was a prerequisite for functional studies on *P. halstedii* effectors, and especially to test their recognition with uncloned sunflower Resistance genes. Moreover, *P. halstedii* having a

restricted host range to *Helianthus* species, from the *Compositae* family, transient expression of its effectors in *Nicotiana benthamiana* would not respond to questions related to host specificity and recognition.

A way to give a hint to effector function is to localize the pathogen protein in plant cells. Among the six proteins we have localized, various localizations were found allowing speculations on effector function, notably by comparison with localization of other microorganism effectors.

Two *P. halstedii* effectors, PhCRN37 and PhRXLR02.1, were localized in the sunflower cell nucleus. Nuclear localization of oomycete CRN effectors is frequent. For example all CRNs identified in *Phytophthora capsici* were localized in the *N. benthamiana* cell nucleus (Stam et al., 2013b, 2013a). Nuclear localization in *N. benthamiana* has been reported as essential for the necrotic function of CRN effectors from *Ph. infestans* and *Aphanomyces euteiches* (Schornack et al., 2010). Among the 49 *H. arabidopsidis* RxLR effectors studied, 33% of HaRxLs were exclusively found in *A. thaliana* cell nucleus (Caillaud et al., 2012). PhCRN37 and PhRXLR02.1, two *P. halstedii* effectors localized in the nucleus, are predicted by PSORT (Prediction of Protein Localization Sites, version 6.4) to have a nuclear localization (Certainty=0.6 for PhCRN37 and 0.91 for PhRXLR02.1) because of 2 to 3 nuclear targeting signals in the predicted proteins (KRKR, KRRK, RHKK, KKRH). Interestingly, PhCRN37 from *P. halstedii* and CRN2 from *Ph. Infestans* both having the CRN DXZ domain presented the same subcellular localization respectively in *H. annuus* and *N. benthamiana* suggesting common role in pathogen virulence (Table 1; Schornack et al., 2010).

The different intranuclear localization of effectors could also give us information about effector functions. Plant cell nucleus could be divided in two prominent compartments, the nucleolus and the nucleoplasm. The nucleolus is mainly involved in transcription of ribosomal RNA genes, maturation of precursor rRNA, and assembly of ribosomal subunit (Shaw and Brown, 2012). The nucleoplasm is the place of gene transcription, and contains most DNA material, transcription factors, and proteins involved in DNA and RNA synthesis. Like bacterial TAL effectors, nuclear localization of oomycete effectors could promote pathogen virulence by activating or suppressing expression of host genes respectively involving in plant susceptibility or resistance. Even if TAL effectors act directly on gene

promoters, other bacterial effectors involved in plant gene expression target nuclear components. For example, the *Ps. syringae* T3E HopU1 is able to suppress plant immune responses (Jeong et al., 2011; Nicaise et al., 2013). Its activity likely interferes with translation of plant defense related RNAs, interacting in plant nucleus with the GRP7 glycine-rich RNA-binding protein. Nucleolar localization suggests that oomycete effectors could target rRNA biosynthesis, like CRN1_719 from *H. arabidopsidis* and PhRXLR02.1 from *P. halstedii* (Stam et al., 2013b). Nevertheless, other biological processes could be targeted by oomycete effectors, including biogenesis, transport, RNAs splicing and transcriptional gene silencing (Rodor et al., 2010).

Localization of the PhRXLR59 putative effector was found in sunflower plasma membrane. Because trans-membrane proteins like PRRs constitute the first level of microbe recognition in plant in PTI, membrane localized effectors might target PRRs and be involved in disrupting plant immunity. Oomycete RXLR effectors could directly target PRRs associated proteins to inhibit induction of plant immune signal (Caillaud et al., 2012). The role of effector targeting the plasma membrane in pathogen virulence was confirmed with *Arabidopsis* lines expressing HaRxLR77 which were more susceptible than wild type to *H. arabidopsidis* (Caillaud et al., 2012). HaRxLR77 was suggested to prevent exocytosis of defence components or endocytosis of PRR that activate PTI responses. For example, the AVRblb2 RXLR effector from *Ph. infestans* interferes with vesicle trafficking to prevent secretion of host cysteine protease C14 (Bozkurt et al., 2011). Indeed, 26% of *H. arabidopsidis* RxLRs were localized in plant membrane trafficking network components (Caillaud et al., 2012): 18% in endoplasmic reticulum, 6% on plasma membrane and 2% in the plant tonoplast. Interestingly, *Ph. sojae* Avh241 RxLR was suggested to interact with plant immune system, either recognized by the plant upon plasma membrane localization leading to plant cell death, or promoting infection regardless of its subcellular location (Yu et al., 2012).

P. halstedii putative effectors PhRXLR06 were found on unknown cytoplasmic bodies mostly close to the nucleus of sunflower cells. In *Nicotiana benthamiana*, and at a lesser extent in sunflower, PhRXLR31 fused to GFP was found in cytoplasmic bodies showing a rapid movement. It still cannot be excluded that the presence of the signal peptide in the

PhRXLR31::GFP construct could be responsible for the moving subcellular localization, and possibly for induction necrosis in TSRM background. Constructs without signal peptide should be tested to eliminate this hypothesis. In order to identify the nature and the role of the moving cytoplasmic bodies, fine time laps observation could be used.

Both localizations of PhRXLR06 and PhRXLR31 could impair vesicular trafficking like bacterial effectors HopM1 (Lindeberg et al., 2012). PhRXLR31 had a Coil-Coil domain suggesting it could interact with other proteins. PhRXLR06 protein was predicted to have an EF-hand domain involved in Ca²⁺ ion binding and found in calcium binding proteins. Interestingly, it is known that calcium signaling could be involved in danger signal transduction during PTI and ETI (Cheval et al., 2013). Thus, we can hypothesize that PhRXLR06 could interfere with calcium signaling to inhibit the transduction of danger signal following pathogen perception. Nevertheless, these mechanisms are not yet described for oomycete effectors and further analyses are required to identify PhRXLR31 and PhRXLR06 functions in sunflower cells. Interestingly, effector subcellular localization could be modified by protein polymorphism. For example, mutations on ATR13^{Maks9} and HaRxL45^{Emoy2} alleles could exclude them from *N. benthamiana* nucleolus (Caillaud et al., 2012). Also, whereas HaRxL9^{Emoy2} allele is localized in cytoplasm and nucleus, HaRxL9^{Noco2} is restricted to cytoplasmic localization in *N. benthamiana* cells. It could be interesting to check the subcellular localization of *P. halstedii* polymorphic effector genes identified by Gascuel *et al.*, in preparation (Chapter II).

Collectively, these diversified *P. halstedii* effector subcellular localization suggest that these proteins used different strategies mediated by different enzymatic activities, in order to prevent plant defense mechanisms.

Four *P. halstedii* effectors induced necrosis specifically in leaves of resistant TSRM sunflower line.

Following *in planta* transient expression of *P. halstedii* effectors, we first focused on induction of necrosis in the infiltrated area because it is an easy observable phenotype. Nevertheless, contrary to strong and rapid necrosis induction by expression of *Ph. infestans* effectors in *N. benthamiana*, we were compelled to phenotype a lot of plants using a scale to

describe sunflower necrosis. Necroses being well developed between 10 to 13 days post infiltration (dpi). In order to measure plant cell necrosis before it occurs, we set up in sunflower ion leakage assays, known to be proportional to cell death. But this method felt probably due to the structure of sunflower leaves, which seemed to be less permeable to ions. The structure of sunflower leaves could also be the reason why the symptoms are only visible at later time points in comparison to *N. benthamiana* (scored around 5 dpi). Another way to find avirulence effector is the reduction of pathogen growth in plants which expressed candidate avirulence protein.

Nevertheless, we identified four *P. halstedii* putative effectors which induced necrosis only on TSRM resistant lines suggesting their role during the interaction between *P. halstedii* pathotype 710 and *H. annuus* having *PI5* resistance gene. They are good candidates to be avirulence genes, but further experiments involving allelic forms of the pathotype not recognized by *PI5*, or mutated versions should be necessary to conclude. Unfortunately gain of function experiments are nearly impossible to set up in *P. halstedii* in which transformation was shown to be not stable (Hammer et al 2007). It should also be interesting to look at allelic forms of the necrotizing effectors from different pathotypes (100, 304, 703) that are also avirulent towards *PI5* resistance gene, and if they are polymorphic, to test them by Agroinfiltration *in planta*.

Both *P. halstedii* CRN expressed in sunflower leaves induced necrosis. PhCRN37 and PhCRN38 presented respectively in their C-terminal part, the DXZ and DBF modular domains identified within *Ph. Infestans* effectors (Haas et al., 2009). *Ph. Infestans* effectors having DXZ or DBF domains induce necrosis in *N.benthamiana* (Haas et al., 2009), necroses were similarly induced by the expression of PhCRN37 and PhCRN38 in sunflower leaves. These results suggest that necrotic induction ability is conserved in DXZ and DBF modular domains of CRN effectors from *P. halstedii* and *Ph. Infestans*.

Fitting better the biotrophic lifestyle of the pathogen and despite the avirulence role of these genes in TSRM sunflower, we hypothesized that the original role of *P. halstedii* effectors is probably more that of virulence factor. In order to validate the role of effector candidate genes in pathogen virulence, various methods could be used. A strategy could be the identification of *P. halstedii* effector proteins acting as virulence factor through: (i) the

identification of effectors which induce pathogen growth when they are expressed in plant cells, or (ii) the identification of effector genes which inhibit pathogen growth when they are silenced.

Material and Methods:

Genome sequencing of pathotype 710 of *P. halstedii*: DNA isolated from spores with Qiagen DNeasy protocol

Preliminary draft genomic sequences of *P. halstedii* were obtained following Illumina HiSeq 2000 sequencing of genomic DNA at 100X coverage. Assemblies featured as follows, after removing clusters smaller than 500 nt: (Num: 7276, N50bp: 56667, N50num: 376). Comparison of cDNA sequences to draft genomic sequences was performed with Genome Threader v.1.3.1 (-dpminintronlen 39 -exdrop 1 -gcmincoverage 50).

Genome annotation and *In silico* peptide prediction:

In silico prediction of peptides from *P. halstedii* genomes was done in three steps. First EST data assembled by FramDP (<https://iant.toulouse.inra.fr/FrameDP/>) were used in Eugene software to: (i) train the software and find putative coding regions, and (ii) to map EST on genome assembly. A third method by blastx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) which search similarities with two libraries of protein, was used to annotate putative peptide on *P. halstedii* genomes. The first bank was the SWISS-PROT database (548 238 peptides) contains high-quality annotation, is non-redundant and cross-referenced to many other databases. The second library was constructed with oomycete specific sequences from NCBI, and *Albugo candida*, *Phytophthora ramorum* and *Pythium ultimum* genomes (transposase removed). The three data were integrating by Eugene software (<http://eugene.toulouse.inra.fr/>) to identified putative peptides in *P. halstedii* genome.

PSI-TBLASTN and Patscan analyses for effector identification:

PSI-TBLASTN (PSSM) was performed *P. halstedii* genome using the annotated sequences for RXLR and CRN effectors available at NCBI in March 2010 completed by oomycete effectors identified since and functionally validated, as models and blastpgp software (2.2.26) with the following arguments: Expectation value (e): 1e-4, Filter query sequence with SEG (F): False, e-value threshold for inclusion in multipass model (h): 1e-4 , Maximum number of passes to use in multipass version (j): 10.

Effector cloning:

Single strand cDNA from *P. halstedii* race 710 was used as matrix to amplify putative effectors, with Finnzymes' Phusion High-Fidelity Taq DNA polymerase. Primers were designed for later use of the cloning method "golden gate". The oligonucleotides used for the following plasmid construction are documented (Table S2). PCR products were purified on agarose gel with Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) and cloned in pKS Bluescript (Stratagene) (carries a gene for resistance to Kanamycin) using SmaI (Figure S1). All recombinant plasmids were purified with Promega Wizard Plus SV Mini-Prep, checked on agarose gel after restriction analysis and used to transform Escherichia Coli DH5 α (bacteria without antibiotic resistance).

The pKS plasmids containing the putative effectors were then fused in frame to a peptidic tag GFP and cloned in one step in an expression vector called pCambia (Figure S1), GFP was fused in frame with the effector deleted of its signal peptide in two possible orientations (kindly given by C.Rosenberg, LIPM, Toulouse, France) using the cloning method "golden gate" (Engler et al., 2008, 2009).

Among putative effector genes identified in the genome of *P. halstedii* pathotype 710, ten were successfully cloned, in an expression vector, upstream or downstream of enhanced GFP (GFP) fluorescent tag. The signal peptide detected by SignalP 3.0 was removed from the cloned sequence unless indicated, in order to express only the part of the protein supposed to enter in plant cells. Expression of the construction was under the regulation of a double 35S promoter.

Growth conditions of Sunflower lines.

TS and TSRM, a pair of near-isogenic sunflower lines (NILs), respectively susceptible and resistant to downy mildew, were used. The inbred line TS has no identified *PI* gene and is susceptible to all *P. halstedii* pathotypes. TSRM was obtained by backcrossing of the *PI5* gene from the inbred line XRQ into TS (six back-crosses and two selfings to obtain homozygous *PI5* resistance in a TS genetic background). TSRM presents type II resistance to *P. halstedii* pathotypes 100, 304, 703 and 710, as shown for *PI5* in other genetic backgrounds. Sunflower lines described previously were grown under 16h day period, 80% relative humidity, at 20°C.

Transient expression *in planta* in sunflower leaves.

Agrobacterium tumefaciens (LBA 4404) strain was transformed by electroporation with pBi discount 35S carrying the putative effectors. Culture methods and plant transient assays are derived from Manavella and Chan (2009) and are described in supplementary data (S6). The agrobacteria washed and resuspended at an OD 600nm of 0,5 in infiltration buffer medium were infiltrated by pressure at the lower leaf part in 1 cm² leaf sectors on the two first leaves per plant using a 1ml syringe without a needle.

Subcellular localization of effector candidates.

Three days post infection, leaf discs were harvested filled with water and observed by a Confocal Leica SP2 AOBS.

Western analyses of GFP fusion proteins

Western blot analyses were done with the Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-rad) and the 4–15% Mini-PROTEAN® TGX™ Gel. Direct detection of GFP tag was done by mouse anti-GFP antibodies and horseradish peroxidase (HRP) conjugated secondary goat anti-mouse antibody. Visualisation was done by chemiluminescent Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-rad) and a G-box.

Effector name	Protein	cDNA cluster name	Effector family	<i>In silico</i> study	Conserved motives	protein size (AA)	Best Blastp hits with <i>Ph. infestans</i> peptides (E-values \leq 10 ⁻⁴)	Prediction of functional domains	CRN C-ter domain (P value 10 ⁻²⁰)
PhRXLR06	PLHAL710p012846	PhaD04370	RXLR	PAPSI	DEER	151	PITG_06781T0-Phytophthora infestans T30-4 conserved hypothetical protein 214 aa	no hit	no hit
PhRXLR48	PLHAL710p014680	PhaD024201	RXLR	PAPSI	RLLR_EER	143	PITG_07594T0-Phytophthora infestans T30-4 secreted RxLR effector peptide, putative 150 aa	no hit	no hit
PhRXLR02.1	PLHAL710p015480	PhaD02956	RXLR	PAPSI	RSLR_EER	114	no hit	no hit	no hit
PhRXLR32	PLHAL710p015506	PhaD00435	RXLR	PA	EEER	237	no hit	no hit	no hit
PhRXLR06	PLHAL710p081078	PhaD01554	RXLR	PAPSI	DEER	168	no hit	IPR000048: IQ motif, EF-hand binding site	no hit
PhRXLR58	PLHAL710p034393	PhaD27443	RXLR	PAPSI	RFLS_EER	689	PITG_16836T0-Phytophthora infestans T30-4 secreted RxLR effector peptide, putative 190 aa	no hit	no hit
PhRXLR60	PLHAL710p034413	PhaD04968	RXLR	PAPSI	DEER	364	PITG_15038T0-Phytophthora infestans T30-4 secreted RxLR effector peptide, putative 496 aa	no hit	no hit
PhRXLR07	PLHAL710p051866	PhaD002521	RXLR	PAPSI	RILR	119	PITG_00707T0-Phytophthora infestans T30-4 secreted RxLR effector peptide, putative 131 aa	no hit	no hit
PhRXLR31	PLHAL710p052504	PhaD03241	RXLR	PA	DEER	199	no hit	coiled-coil domain	no hit
PhRXLR61	PLHAL710p06178	PhaD11563	RXLR	PA	RSLQ_EER	447	no hit	no hit	no hit
PhRXLR63	PLHAL710p06962	PhaD27542	RXLR	PA	RQLR_DEER	356	no hit	no hit	no hit
PhCRN38	PLHAL710p076644	PhaD00298	CRN	PSI	LESLAK_HVLMVLP	239	PITG_12612T0	Aminoglycoside phosphotransferase	DBF
PhCRN37	PLHAL710p032861	PhaD00548	CRN	PAPSI	LTLYLAK_HVLMVLP	418	PITG_18503T0	no hit	DXZ

Table S1

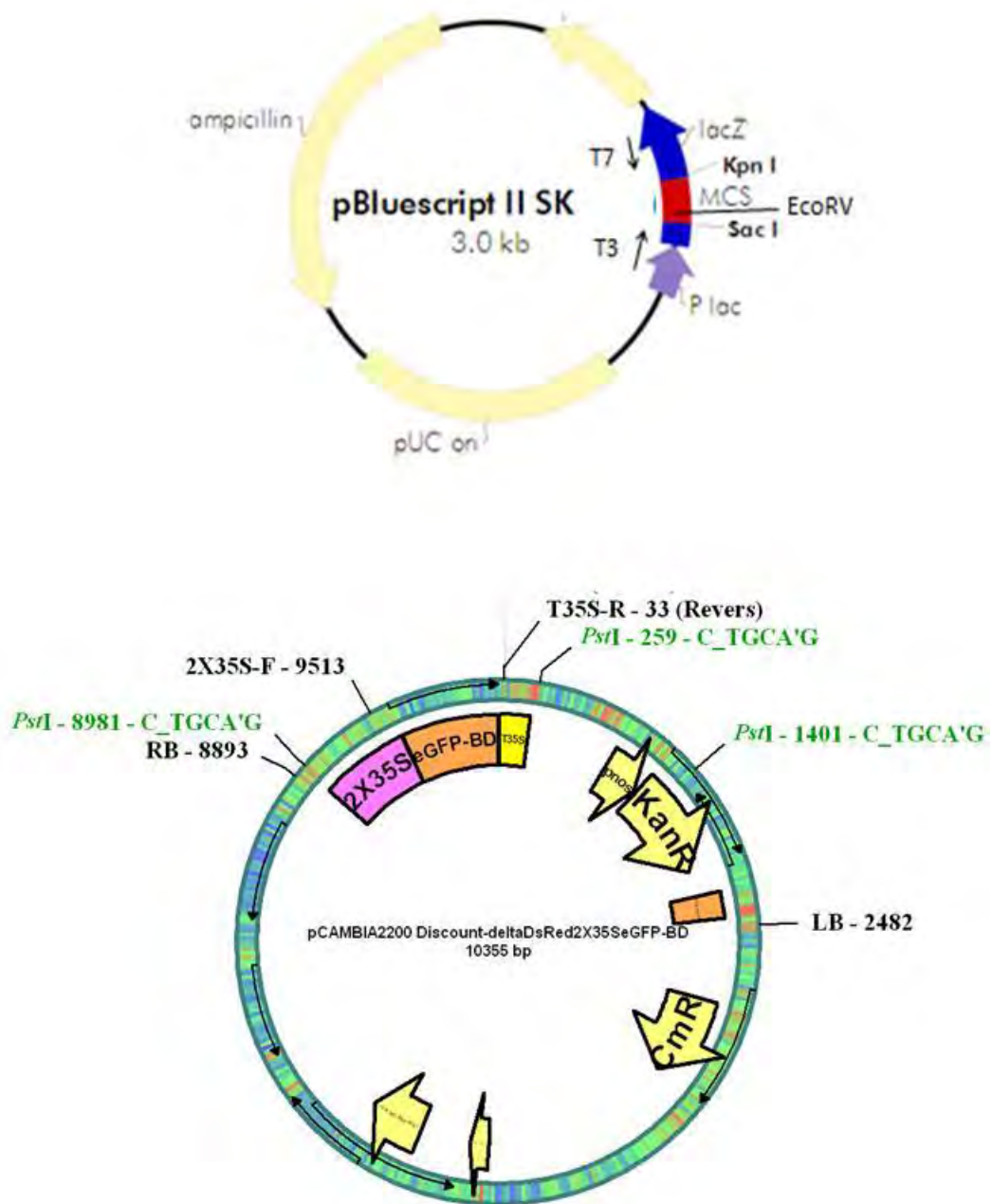


Figure S1

Effector name	Forward primer edge C	Forward primer edge B	Reverse primer edge D	Reverse primer edge C
PhRXLR08	GGTCTCGGGTGGAAATGATGC GTGTGGTTTTGCTTCT	GGTCTCGCAAAATGATGCGT GTGGTTTTGCTTCT	GGTCTCCCCTATCAGACGAC AGGATTGGAAG	GGTCTCCCACCACGACAGAG ATTGGAAG
PhRXLR48	GGTCTCGGGTGGAA7GUCUG AUACCACAUCGACAUC	GGTCTCGCAAA7GUCUGAU ACCACAUCGACAUC	GGTCTCCCCTATCACATACT GTTCCTCCAATCAA	GGTCTCCCACCATACTGTT CCTCCAATCAA
PhRXLR02.1	GGTCTCGGGTGGAA7GUCUA UCACGAAUAACGAUGG	GGTCTCGCAAA7GUCUAUC ACGAAUAACGAUGG	GGTCTCCCCTATCAATACCA ATACCGATGCGAAT	GGTCTCCCACCATAACCAATA CCGATGCGAAT
PhRXLR32	GGTCTCGGGTGGAA7GAUG UUUCUAGCAUCAAGGU	GGTCTCGCAAA7GAUGGUU UCUAGCAUCAAGGU	GGTCTCCCCTATCAAGCATG ACCTGTCTTCATGA	GGTCTCCCACCAGCATGACC TGCTTCATGA
PhRXLR06	GGTCTCGGGTGGAAATGTCTG ACAAATTGGATCCGCAG	GGTCTCGCAAAATGTCTGAC AAATTGGATCCGCAG	GGTCTCCCCTATCAACCAGT TTTTACTGGTACAGTC	GGTCTCCCACCACCAGTTTTT ACTGGTACAGTC
PhRXLR58	GGTCTCGGGTGGAA7GAUGC GAUAGGCUCUUUCCU	GGTCTCGCAAA7GAUGC AUGAGGCUCUUUCCU	GGTCTCCCCTATCACTTAGG TACTAACTGTTCT	GGTCTCCCACCCTTAGGTAC TAACTGTTCT
PhRXLR60	GGTCTCGGGTGGAA7GACAA ACUUAAUUGUAUCAGU	GGTCTCGCAAA7GACAAAC UUAAUUGUAUCAGU	GGTCTCCCCTATCAAGCGGG TACCAATTTTTTCG	GGTCTCCCACCAGCGGGTAC CAATTTTTTCG
PhRXLR07	GGTCTCGGGTGGAA7GA7GC GTTTGAGCTACATCTT	GGTCTCGCAAA7GA7GCGT TTGAGCTACATCTT	GGTCTCCCCTATCATATTCC GAGTTCGCTAAATG	GGTCTCCCACCCTATTCCGAG TTCGCTAAATG
PhRXLR31	GGTCTCGGGTGGAA7GAUG ACAUCAGUCUUGAUUC	GGTCTCGCAAA7GAUGGAC AUCAGUCUUGAUUC	GGTCTCCCCTATCAATGATC ATCAGCAAGAGCTC	GGTCTCCCACCATGATCATC AGCAAGAGCTC
PhRXLR61	GGTCTCGGGTGGAA7GGUCC CCAUUCUCAGACGGA	GGTCTCGCAAA7GGUCC AAUUCUCAGACGGA	GGTCTCCCCTATCAAACGAC AGTTTTTTGCCGCT	GGTCTCCCACCAACGACAGT TTTTTTGCCGCT
PhRXLR63	GGTCTCGGGTGGAA7GCUCU CCACCUCAAUCAAC	GGTCTCGCAAA7GCUCUCC ACCUCAAUCAAC	GGTCTCCCCTATCAAGGCA AAAGTGAAGCTCTT	GGTCTCCCACCAGGCGAGAAA GTGAAGCTCTT
PhCRN38	GGTCTCGGGTGGAA7GTTCC CAGTCGACATTAACGAGAC	GGTCTCGCAAA7GTTCCCA GTCGACATTAACGAGAC	GGTCTCCCCTATCATTGTCAA TCGGGCGAGCTATCGAAG	GGTCTCCCACCCTGTCAATCG GGCAGCTATCGAAG
PhCRN37	GGTCTCGGGTGGAA7GGTGA AGATCGCACGTGATGCG	GGTCTCGCAAA7GGTGAAG ATCGCACGTGATGCG	GGTCTCCCCTATCATAACTTC AGGTTTATAACTGAAC	GGTCTCCCACCAACTTCAGG TTTATAACTGAAC

Table S2.

Références

- Adhikari, B.N., Hamilton, J.P., Zerillo, M.M., Tisserat, N., Lévesque, C.A., and Buell, C.R.** (2013). Comparative genomics reveals insight into virulence strategies of plant pathogenic oomycetes. *PLoS One* **8**: e75072.
- Bailey, T.L., Boden, M., Buske, F. a, Frith, M., Grant, C.E., Clementi, L., Ren, J., Li, W.W., and Noble, W.S.** (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.* **37**: W202–8.
- Bailey, T.L., Williams, N., Misleh, C., and Li, W.W.** (2006). MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Res.* **34**: W369–73.
- Baltrus, D. a, Nishimura, M.T., Romanchuk, A., Chang, J.H., Mukhtar, M.S., Cherkis, K., Roach, J., Grant, S.R., Jones, C.D., and Dangl, J.L.** (2011). Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *PLoS Pathog.* **7**: e1002132.
- Baxter, L. et al.** (2010). Signatures of Adaptation to Obligate Biotrophy in the *Hyaloperonospora arabidopsidis* Genome. *Science* (80-.). **330**: 1549–1551.
- Bert, P.F., Tourvieille de Labrouhe, D., Philippon, J., Mouzeyar, S., Jouan, I., Nicolas, P., and Vear, F.** (2001). Identification of a second linkage group carrying genes controlling resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *TAG Theor. Appl. Genet.* **103**: 992–997.
- Birch, P.R.J. et al.** (2009). Towards understanding the virulence functions of RXLR effectors of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *J. Exp. Bot.* **60**: 1133–40.
- Bos, J.I.B. et al.** (2010). *Phytophthora infestans* effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 9909–9914.
- Bos, J.I.B., Kanneganti, T.-D., Young, C., Cakir, C., Huitema, E., Win, J., Armstrong, M.R., Birch, P.R.J., and Kamoun, S.** (2006). The C-terminal half of *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* **48**: 165–76.
- Bozkurt, T.O., Schornack, S., Win, J., Shindo, T., Ilyas, M., Oliva, R., Cano, L.M., Jones, A.M.E., Huitema, E., van der Hoorn, R. a L., and Kamoun, S.** (2011). *Phytophthora infestans* effector AVRblb2 prevents secretion of a plant immune protease at the haustorial interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 20832–7.
- Burkhardt, A. and Day, B.** (2013). A genomics perspective on cucurbit-oomycete interactions. *Plant Biotechnol.* **30**: 265–271.
- Caillaud, M.-C., Asai, S., Rallapalli, G., Piquerez, S., Fabro, G., and Jones, J.D.G.** (2013). A downy mildew effector attenuates salicylic acid-triggered immunity in *Arabidopsis* by interacting with the host mediator complex. *PLoS Biol.* **11**: e1001732.
- Caillaud, M.-C., Piquerez, S.J.M., Fabro, G., Steinbrenner, J., Ishaque, N., Beynon, J., and Jones, J.D.G.** (2011). Subcellular Localization of the Hpa RxLR Effector Repertoire Identifies the Extrahaustorial Membrane-Localized HaRxL17 that Confers Enhanced Plant Susceptibility. *Plant J.*: 252–265.
- Cheval, C., Aldon, D., Galaud, J.-P., and Ranty, B.** (2013). Calcium/calmodulin-mediated regulation of plant immunity. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**: 1766–71.
- Coates, M.E. and Beynon, J.L.** (2010). *Hyaloperonospora arabidopsidis* as a pathogen model. *Annu. Rev. Phytopathol.* **48**: 329–45.

- Cooke, D.E.L. et al.** (2012). Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the Irish potato famine pathogen. *PLoS Pathog.* **8**: e1002940.
- Van Damme, M., Bozkurt, T.O., Cakir, C., Schornack, S., Sklenar, J., Jones, A.M.E., and Kamoun, S.** (2012). The Irish Potato Famine Pathogen *Phytophthora infestans* Translocates the CRN8 Kinase into Host Plant Cells. *PLoS Pathog.* **8**: e1002875.
- Delmotte, F., Giresse, X., Richard-Cervera, S., M'baya, J., Vear, F., Tourvieille, J., Walser, P., and de Labrouhe, D.T.** (2008). Single nucleotide polymorphisms reveal multiple introductions into France of *Plasmopara halstedii*, the plant pathogen causing sunflower downy mildew. *Infect. Genet. Evol.* **8**: 534–40.
- Dodds, P.N., Rafiqi, M., Gan, P.H.P., Hardham, A.R., Jones, D. a, and Ellis, J.G.** (2009). Effectors of biotrophic fungi and oomycetes: pathogenicity factors and triggers of host resistance. *New Phytol.* **183**: 993–1000.
- Dong, S. et al.** (2014). Effector Specialization in a Lineage of the Irish Potato Famine Pathogen. *Science* (80-.). **343**: 552–555.
- Dussle, C.M., Hahn, V., Knapp, S.J., and Bauer, E.** (2004). PIArg from *Helianthus argophyllus* is unlinked to other known downy mildew resistance genes in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* **109**: 1083–6.
- Engler, C., Gruetzner, R., Kandzia, R., and Marillonnet, S.** (2009). Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type IIs restriction enzymes. *PLoS One* **4**: e5553.
- Engler, C., Kandzia, R., and Marillonnet, S.** (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One* **3**: e3647.
- Fabro, G. et al.** (2011). Multiple Candidate Effectors from the Oomycete Pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis* Suppress Host Plant Immunity. *PLoS Pathog.* **7**: e1002348.
- Gascuel, Q., Martinez, Y., Boniface, M.-C., Vear, F., Pichon, M., Godiard, L.** The sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*. *Mol. Plant Pathol.* in press.
- Gessler, C., Pertot, I., and Perazzolli, M.** (2011). *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathol. Mediterr.*: 3–44.
- Göhre, V. and Robatzek, S.** (2008). Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**: 189–215.
- Goritschnig, S., Krasileva, K. V., Dahlbeck, D., and Staskawicz, B.J.** (2012). Computational Prediction and Molecular Characterization of an Oomycete Effector and the Cognate Arabidopsis Resistance Gene. *PLoS Genet.* **8**: e1002502.
- Haas, B.J. et al.** (2009). Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* **461**: 393–8.
- Han, S.-W. and Jung, H.W.** (2013). Molecular sensors for plant immunity; pattern recognition receptors and race-specific resistance proteins. *J. Plant Biol.* **56**: 357–366.
- HEIN, I., Gilroy, E.M., Armstrong, M.R., and Birch, P.R.J.** (2009). The zig-zag-zig in oomycete–plant interactions. *Mol. Plant Pathol.* **10**: 547–562.

- Heiser, C.B.** (2007). The sunflower (*Helianthus annuus*) in Mexico: further evidence for a North American domestication. *Genet. Resour. Crop Evol.* **55**: 9–13.
- Jeong, B., Lin, Y., Joe, A., Guo, M., Korneli, C., Yang, H., Wang, P., Yu, M., Cerny, R.L., Staiger, D., Alfano, J.R., and Xu, Y.** (2011). Structure function analysis of an ADP-ribosyltransferase type III effector and its RNA-binding target in plant immunity. *J. Biol. Chem.* **286**: 43272–81.
- Jiang, R.H.Y. and Tyler, B.M.** (2012). Mechanisms and evolution of virulence in oomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.* **50**: 295–318.
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**: 323–9.
- Kale, S.D., Gu, B., Capelluto, D.G.S., Dou, D., Feldman, E., Rumore, A., Arredondo, F.D., Hanlon, R., Fudal, I., and Rouxel, T.** (2010). External Lipid PI3P Mediates Entry of Eukaryotic Pathogen Effectors into Plant and Animal Host Cells. *Cell* **142**: 284–295.
- Kemen, E., Gardiner, A., Schultz-Larsen, T., Kemen, A.C., Balmuth, A.L., Robert-Seilaniantz, A., Bailey, K., Holub, E., Studholme, D.J., Maclean, D., and Jones, J.D.G.** (2011). Gene Gain and Loss during Evolution of Obligate Parasitism in the White Rust Pathogen of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biol.* **9**: e1001094.
- King, S.R.F., McLellan, H., Boevink, P.C., Armstrong, M.R., Bukharova, T., Sukarta, O., Win, J., Kamoun, S., Birch, P.R.J., and Banfield, M.J.** (2014). *Phytophthora infestans* RXLR effector PexRD2 interacts with host MAPKKK ϵ to suppress plant immune signaling. *Plant Cell* **26**: 1345–59.
- Krasileva, K. V., Zheng, C., Leonelli, L., Goritschnig, S., Dahlbeck, D., and Staskawicz, B.J.** (2011). Global Analysis of *Arabidopsis*/Downy Mildew Interactions Reveals Prevalence of Incomplete Resistance and Rapid Evolution of Pathogen Recognition. *PLoS One* **6**: e28765.
- Kunjeti, S.G., Evans, T.A., Marsh, A.G., Gregory, N.F., Kunjeti, S., Meyers, B.C., Kalavacharla, V.S., and Donofrio, N.M.** (2012). RNA-Seq reveals infection-related global gene changes in *Phytophthora phaseoli*, the causal agent of lima bean. **13**: 454–466.
- Lamour, K.H. et al.** (2012). Genome sequencing and mapping reveal loss of heterozygosity as a mechanism for rapid adaptation in the vegetable pathogen *Phytophthora capsici*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **25**: 1350–1360.
- Lévesque, C.A. et al.** (2010). Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. *Genome Biol.* **11**: R73.
- Lindeberg, M., Cunnac, S., and Collmer, A.** (2012). *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in endless arguments. *Trends Microbiol.* **20**: 199–208.
- Links, M.G., Holub, E., Jiang, R.H.Y., Sharpe, A.G., Hegedus, D., Beynon, E., Sillito, D., Clarke, W.E., Uzuhashi, S., and Borhan, M.H.** (2011). De novo sequence assembly of *Albugo candida* reveals a small genome relative to other biotrophic oomycetes. *BMC Genomics* **12**: 503.
- Liu, T., Ye, W., Ru, Y., Yang, X., Gu, B., Tao, K., Lu, S., Dong, S., Zheng, X., Shan, W., Wang, Y., and Dou, D.** (2010). Two host cytoplasmic effectors are required for pathogenesis of *Phytophthora sojae* by suppression of host defenses. *Plant Physiol.* **155**: 490–501.
- M.L. Molinero-Ruiz, M.M. Córdón-Torres, J.M.-A. and J.M. Melero-Vara, and J.D.** (2008). Resistance to metalaxyl and to metalaxyl-M in populations of *Plasmopara halstedii* causing downy mildew in sunflower. *Can. J. Plant Pathol.* **30**: 97–105.

- Macho, A.P. and Zipfel, C.** (2014). Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Mol. Cell* **54**: 263–272.
- Manavella, P. a and Chan, R.L.** (2009). Transient transformation of sunflower leaf discs via an Agrobacterium-mediated method: applications for gene expression and silencing studies. *Nat. Protoc.* **4**: 1699–1707.
- Marone, D., Russo, M. a, Laidò, G., De Leonardis, A.M., and Mastrangelo, A.M.** (2013). Plant Nucleotide Binding Site-Leucine-Rich Repeat (NBS-LRR) Genes: Active Guardians in Host Defense Responses. *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 7302–7326.
- Michelmore, R.W., Christopoulou, M., and Caldwell, K.S.** (2013). Impacts of resistance gene genetics, function, and evolution on a durable future. *Annu. Rev. Phytopathol.* **51**: 291–319.
- Morgan, W. and Kamoun, S.** (2007). RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**: 332–338.
- Nicaise, V., Joe, A., Jeong, B., Korneli, C., Boutrot, F., Westedt, I., Staiger, D., Alfano, J.R., and Zipfel, C.** (2013). *Pseudomonas* HopU1 modulates plant immune receptor levels by blocking the interaction of their mRNAs with GRP7. *EMBO J.* **32**: 701–712.
- Pais, M., Win, J., Yoshida, K., Etherington, G.J., Cano, L.M., Raffaele, S., Banfield, M.J., Jones, A., Kamoun, S., and Go Saunders, D.** (2013). From pathogen genomes to host plant processes: the power of plant parasitic oomycetes. *Genome Biol.* **14**: 211.
- Park, C.-H., Chen, S., Shirsekar, G., Zhou, B., Khang, C.H., Songkumarn, P., Afzal, A.J., Ning, Y., Wang, R., Bellizzi, M., Valent, B., and Wang, G.-L.** (2012). The Magnaporthe oryzae effector AvrPiz-t targets the RING E3 ubiquitin ligase APIP6 to suppress pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity in rice. *Plant Cell* **24**: 4748–4762.
- Petre, B. and Kamoun, S.** (2014). How Do Filamentous Pathogens Deliver Effector Proteins into Plant Cells? *PLoS Biol.* **12**: e1001801.
- Radwan, O., Bouzidi, M.F., Nicolas, P., and Mouzeyar, S.** (2004). Development of PCR markers for the PI5/PI8 locus for resistance to *Plasmopara halstedii* in sunflower, *Helianthus annuus* L. from complete CC-NBS-LRR sequences. *Theor. Appl. Genet.* **109**: 176–185.
- Radwan, O., Bouzidi, M.F., Vear, F., Philippon, J., De Labrouhe, D.T., Nicolas, P., and Mouzeyar, S.** (2003). Identification of non-TIR-NBS-LRR markers linked to the PI5/ PI8 locus for resistance to downy mildew in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* **106**: 1438–1446.
- Radwan, O., Mouzeyar, S., Nicolas, P., and Bouzidi, M.F.** (2005). Induction of a sunflower CC-NBS-LRR resistance gene analogue during incompatible interaction with *Plasmopara halstedii*. *J. Exp. Bot.* **56**: 567–575.
- Raffaele, S., Farrer, R. A., Cano, L. M., Studholme, D. J., Maclean, D., Thines, M., Jiang, R. H. Y., Zody, M. C., Kunjeti, S. G., Donofrio, N. M., Meyers, B. C., Nusbaum, C., and Kamoun, S.** (2010). Genome Evolution Following Host Jumps in the Irish Potato Famine Pathogen Lineage. *Science*. **330**, 1540-1543.
- 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. *Plant Cell* **17**: 1839–1850.

- Rodor, J., Letelier, I., Holuigue, L., and Echeverria, M.** (2010). Nucleolar RNPs: from genes to functional snoRNAs in plants. *Biochem. Soc. Trans.* **38**: 672–676.
- Saunders, D.G.O., Breen, S., Win, J., Schornack, S., Hein, I., Bozkurt, T.O., Champouret, N., Vleeshouwers, V.G. a a, Birch, P.R.J., Gilroy, E.M., and Kamoun, S.** (2012). Host Protein BSL1 Associates with *Phytophthora infestans* RXLR Effector AVR2 and the *Solanum demissum* Immune Receptor R2 to Mediate Disease Resistance. *Plant Cell* **24**: 3420–3434.
- Savory, E.A., Granke, L.L., Quesada-ocampo, L.M., Varbanova, M., Hausbeck, M.K., and Day, B.** (2011). Pathogen profile The cucurbit downy mildew pathogen *Pseudoperonospora cubensis*. *Mol. Plant Pathol.* **12**: 217–226.
- Schornack, S., van Damme, M., Bozkurt, T.O., Cano, L.M., Smoker, M., Thines, M., Gaulin, E., Kamoun, S., and Huitema, E.** (2010). Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*: 2–7.
- Shaw, P. and Brown, J.** (2012). Nucleoli: composition, function, and dynamics. *Plant Physiol.* **158**: 44–51.
- Stam, R., Howden, A.J.M., Delgado-Cerezo, M., M M Amaro, T.M., Motion, G.B., Pham, J., and Huitema, E.** (2013a). Characterization of cell death inducing *Phytophthora capsici* CRN effectors suggests diverse activities in the host nucleus. *Front. Plant Sci.* **4**: 387.
- Stam, R., Jupe, J., Howden, A.J.M., Morris, J. a, Boevink, P.C., Hedley, P.E., and Huitema, E.** (2013b). Identification and Characterisation CRN Effectors in *Phytophthora capsici* Shows Modularity and Functional Diversity. *PLoS One* **8**: e59517.
- Stassen, J.H.M., Seidl, M.F., Vergeer, P.I.M.W.J., Nijman, I.J., Snel, B., Cuppen, E., and Ackerveken, G.V.A.N.D.E.N.** (2012). Effector identification in the lettuce downy mildew *Bremia lactucae* by massively parallel transcriptome sequencing. *Mol. Plant Pathol.*: 1–13.
- Thines, M. and Kamoun, S.** (2010). Oomycete-plant coevolution: recent advances and future prospects. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**: 427–33.
- Torto, T. a, Li, S., Styer, A., Huitema, E., Testa, A., Gow, N. a R., van West, P., and Kamoun, S.** (2003). EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora*. *Genome Res.* **13**: 1675–1685.
- Tyler, B.M. et al.** (2006). *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* **313**: 1261–1266.
- Vear, F., Serre, F., Jouan-Dufournel, I., Bert, P.F., Roche, S., Walser, P., Tourvieille de Labrouhe, D., and Vincourt, P.** (2008). Inheritance of quantitative resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica* **164**: 561–570.
- Vincourt, P., As-Sadi, F., Bordat, A., Langlade, N.B., Gouzy, J., Pouilly, N., Lippi, Y., Serre, F., Godiard, L., Tourvieille de Labrouhe, D., and Vear, F.** (2012). Consensus mapping of major resistance genes and independent QTL for quantitative resistance to sunflower downy mildew. *Theor. Appl. Genet.* **125**: 909–920.
- Vleeshouwers, V.G. a a et al.** (2008). Effector genomics accelerates discovery and functional profiling of potato disease resistance and *phytophthora infestans* avirulence genes. *PLoS One* **3**: e2875.

- Wieckhorst, S., Bachlava, E., Dußle, C.M., Tang, S., Gao, W., Saski, C., Knapp, S.J., Schön, C.-C., Hahn, V., and Bauer, E.** (2010). Fine mapping of the sunflower resistance locus PI (ARG) introduced from the wild species *Helianthus argophyllus*. *Theor. Appl. Genet.* **121**: 1633–1644.
- Yin, W., Dong, S., Zhai, L., Lin, Y., Zheng, X., and Wang, Y.** (2013). The *Phytophthora sojae* Avr1d gene encodes an RxLR-dEER effector with presence and absence polymorphisms among pathogen strains. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **26**: 958–968.
- Yu, X., Tang, J., Wang, Q., Ye, W., Tao, K., Duan, S., Lu, C., Yang, X., Dong, S., Zheng, X., and Wang, Y.** (2012). The RxLR effector Avh241 from *Phytophthora sojae* requires plasma membrane localization to induce plant cell death. *New Phytol.* **196**: 247–260.

III. Lecture critique.

Le génome du pathotype 710 de *P. halstedii* a été séquencé (par Illumina Hi-seq 2000, avec un taux de couverture théorique de 100X le génome), assemblé et annoté en collaboration avec l'équipe de bio-informatique du LIPM, à l'aide des données de transcriptomiques préalablement acquises chez *P. halstedii*. A partir des protéines prédites dans ce génome, nous avons identifié, par homologie avec des effecteurs d'oomycètes et par recherche de motifs conservés, un grand nombre d'effecteurs putatifs de type RxLR et CRN. Le fait que nous ayons identifié plus de CRN par PSI-TBLASTN, et plus de RxLR par recherche de motifs de translocation conservés, montre que, contrairement aux RxLR, les CRN de *P. halstedii* seraient proches des effecteurs trouvés au sein des oomycètes. De plus, pour les RxLR, il y a très peu de résultats communs entre les deux analyses. En effet, le fait que ces observations reposent sur des résultats obtenus chez d'autres oomycètes phytopathogènes (séquences et motifs de translocation), ne permet pas d'identifier des motifs spécifiques des effecteurs de *P. halstedii*. Ces résultats amènent à s'interroger sur l'existence d'une troisième classe d'effecteurs chez *P. halstedii*. En effet, on peut penser que les effecteurs identifiés par PSI-TBLASTN à partir de RxLR d'oomycètes constitueraient une classe d'effecteurs dont la fonction est proche des RxLR connus mais dont le motif de translocation, propre à *P. halstedii*, n'a pas encore été identifié ou est différent des motifs utilisés pour la recherche par patscan. D'autres motifs RXLR-like ont été décrits dans les effecteurs de certains oomycetes (Tian et al., 2011; Stassen et al., 2012; Links et al., 2011). A l'inverse, les RxLR de *P. halstedii* identifiés à partir de leur motif de translocation auraient évolué en développant des fonctions qui leur sont propres.

La mise en place d'un protocole d'expression transitoire *in planta* chez le tournesol a permis la localisation subcellulaire de 6 effecteurs de *P. halstedii* dont 4 induiraient une réponse nécrotique chez l'hôte TSRM. Suite à l'expression des effecteurs de *P. halstedii* chez le tournesol nous avons choisi d'observer l'induction de nécrose, phénotype qui semblait facile à observer et permettant le criblage rapide des effecteurs de l'agent pathogène. Cependant, alors que l'expression des effecteurs dans notre système est homogène dans les tissus de la plante durant une période d'au moins quatre jours, la réponse nécrotique que nous observions était dans

certain cas tardive (de l'ordre de 10 jours après agroinfection) et parfois hétérogène selon les plantes. En effet, pour identifier des effecteurs inducteurs de nécrose de façon fiable, nous devons utiliser des tests statistiques à partir de notations faites sur un grand nombre de plantes à l'aide d'une échelle de notation des symptômes de 0 à 5. De plus, ce phénotype ne nous renseigne que sur la perception des effecteurs par la plante et permet d'identifier principalement des facteurs d'virulence. Il semble donc nécessaire de mettre au point des méthodes de phénotypage plus précises afin de valider le rôle des effecteurs identifiés en tant que facteurs de virulence ou d'virulence, basées par exemple sur les taux de multiplication de l'agent pathogène *in planta* (Cf chapitre I, paragraphe XI. A.).

IV. Résultats complémentaires : Expression des effecteurs de *P. halstedii*.

Pour connaître le rôle des effecteurs de *P. halstedii*, il est également possible d'identifier où et quand ces gènes sont exprimés. Pour ce faire, nous avons découpé l'interaction dans le temps (grâce à une cinétique) et dans l'espace (prélèvement des différents organes de la plante) pour y mesurer l'expression des gènes codants pour 77 gènes d'effecteurs putatifs. Si nous pouvons dire que la majorité de ces effecteurs sont bien exprimés au cours de l'interaction, une variabilité trop importante des résultats d'expression (pourtant expertisés avec différentes méthodes statistiques) ne nous a pas permis de déterminer avec précision où et quand ces effecteurs jouent un rôle au cours de l'interaction entre *P. halstedii* et le tournesol.

Les causes de cette grande variabilité d'expression pourraient être les suivantes:

(i) Dans le cas où l'expression des effecteurs de *P. halstedii* serait régulée en fonction de sa phase de développement (phase d'infection, progression sous forme d'hyphes intercellulaires,

production d'un haustorium, dissémination) ou du tissu végétal infecté, les échantillons contiendraient un mélange d'agents pathogènes à différentes phases de leur développement à l'origine d'une expression non synchrone des gènes.

(ii) De la même façon que *P. halstedii* présente une capacité à réguler finement la mise en place de ses structures d'infection en fonction de son environnement, on peut penser que l'agent pathogène serait aussi capable de réguler au cas par cas l'expression de ses effecteurs. De ce fait, il est possible que l'expression de ces gènes ne soit pas synchronisée en fonction du stade de développement de l'agent pathogène et des tissus végétaux dans lesquels ils se développent. Par exemple, dans le chapitre I nous avons montré que sur un même échantillon nous avons pu observer la mise en place de structures d'infection différentes, ce qui suppose la mise en place de programmes transcriptionnels spécifiques. Il serait donc possible que deux agents pathogènes dans un même tissu et à un même stade de développement sécrètent des répertoires différents d'effecteurs.

(iii) Enfin certains effecteurs seraient exprimés trop faiblement pour être correctement détectés.

On pourrait envisager de mettre au point une méthode permettant de synchroniser les phases de développement de l'agent pathogène. Il est aussi possible de mesurer l'expression de ces gènes très précisément dans certains tissus de l'agent pathogène. En effet par microdissection laser nous pourrions prélever des échantillons à l'échelle d'une cellule et les enrichir en appressoria, hyphes, haustoria ou encore zoosporangiophores afin d'augmenter la reproductibilité et la détectabilité des gènes faiblement exprimés.

Discussion et perspectives générales.

L'impact de *P. halstedii* sur les cultures de tournesol qui sont attaquées par des isolats résistants aux luttés chimiques et génétiques nous amène à nous intéresser à cet agent pathogène. Au cours de mes travaux de thèse, nous avons initié une analyse sur le rôle que pouvaient jouer les effecteurs de type CRN et RXLR dans la virulence de l'agent pathogène. Dans un premier temps nous avons cherché à caractériser plus finement la biologie de l'interaction entre *P. halstedii* et *H. annuus*, à travers la mise au point d'un pathosystème modèle. Les données obtenues dans le cadre de cette étude doivent nous permettre de mieux décoder l'effet des effecteurs sur la virulence de *P. halstedii*.

En effet, après avoir identifié des effecteurs candidats, l'étude de leur rôle dans la virulence de *P. halstedii* a été faite grâce à deux approches menées en parallèle : (i) une étude du polymorphisme inter et intra pathotype, et (ii) une étude fonctionnelle. Les résultats obtenus sur un sous-ensemble d'effecteurs de *P. halstedii* constituent un socle solide pour poursuivre l'étude du rôle des effecteurs dans l'évolution de la virulence de l'agent pathogène.

I. Biologie de l'interaction entre *P. halstedii* et *H. annuus*.

I.A. Mise en place des mécanismes d'infection par P. halstedii.

Le fait d'observer, lors d'un même événement d'infection racinaire la mise en place de trois mécanismes distincts de pénétration dans la plante (Cf chapitre I), pose la question suivante: *P. halstedii* est-il capable de percevoir son environnement afin de mettre en place la stratégie de pénétration la plus adaptée pour infecter le tournesol?

L'hypothèse que nous pouvons tirer de ces observations est que la diversité des modes d'infection de *P. halstedii* dans la plante pourrait constituer un facteur de virulence lui permettant de s'adapter au mieux à la morphologie de l'hôte. De plus, cette diversité permettrait de limiter l'impact qu'aurait la suppression d'un de ces mécanismes de pénétration sur la virulence de *P. halstedii*, puisque celui-ci disposerait alors de solutions alternatives pour entrer dans les tissus de la plante.

Néanmoins, on peut faire l'hypothèse qu'une absence ou une modification des signaux végétaux reconnus par *P. halstedii* pourrait empêcher la mise en place des structures adaptées à la pénétration dans la plante, inhibant ainsi le développement de la maladie. Ces travaux pourraient alors être à l'origine de l'identification de sources de résistances durables contre l'agent pathogène, et ce d'autant plus si ces mécanismes d'infection ne sont pas redondants.

Il serait donc intéressant de poursuivre les travaux de microscopie entrepris afin de comprendre quels seraient les signaux émis par la plante et perçus par l'agent pathogène (morphologie de l'épiderme, chimiotactisme ou électrotactisme) et comment *P. halstedii* les intègre pour mettre en place les mécanismes et structures qui lui sont le plus favorables (Morris et al., 1998; Tyler et al., 1996). Cependant, les différentes stratégies envisageables pour répondre à ces questions, à savoir l'utilisation de lignées de tournesol (mutantes ou RNAi) qui présenteraient une structure épidermique modifiée ou des déficiences dans leurs voies de synthèse de métabolites secondaires sécrétées, sont aujourd'hui difficiles à mettre en œuvre dans le cadre de l'interaction *P. halstedii*-tournesol.

1.B. Distribution des noyaux au sein des hyphes de P. halstedii.

Les hyphes de *P. halstedii* n'étant pas septés (chapitre I), ils sont susceptibles de contenir des noyaux différents (variabilité intra individu), dont l'organisation pourrait constituer un niveau de régulation supplémentaire dans l'expression des gènes de *P. halstedii*. En effet, Boom et al., ont montré en 2010 l'existence de variations génomiques intra-individu chez des champignons endomycorhiziens à arbuscules du genre *Glomus*. Il serait donc intéressant d'étudier, chez

P. halstedii, l'impact de ces processus dans la variabilité génique intra-individu au sein des populations et donc par extension sur l'évolution de la virulence de l'agent pathogène.

II. Etude de l'évolution de la virulence de *P. halstedii*.

II.A. Hypothèse générale.

II.A.1. Relation hôte-agent pathogène.

Lors de ma thèse, nous sommes partis de l'hypothèse selon laquelle la compatibilité ou l'incompatibilité d'une interaction plante-agent pathogène dépendrait en grande partie de deux ensembles protéiques qui sont: (i) l'arsenal d'effecteurs sécrétés par l'agent pathogène, et (ii) l'ensemble des protéines de la plante qui jouent un rôle dans ses mécanismes de défense. Toute modification de l'un ou l'autre de ces ensembles protéiques chez l'un des deux organismes est susceptible de changer l'issue de l'interaction.

L'émergence de nouveaux isolats de *P. halstedii* contournant les gènes de résistances utilisés pour protéger les cultures nous laisse penser que l'évolution rapide de la virulence de l'agent pathogène pourrait être due en grande partie à la modification de son arsenal d'effecteurs (Cf IV.C.1. Introduction).

Celle-ci pourrait se manifester par : (i) la perte d'un facteur d'avirulence de type effecteur, par inhibition de son expression, disparition de sa séquence génomique ou mutation supprimant sa reconnaissance par le système de perception de la plante. (ii) La création d'effecteurs avec de nouvelles fonctions biologiques par mutations, duplications et recombinaisons géniques.

Il est important de rappeler que ce n'est pas parce que les modèles proposés mettent en exergue le rôle des deux grandes familles de protéines que sont les effecteurs et protéines de résistances, que les interactions plantes-agents pathogènes sont régies uniquement par des interactions gène pour gène. En effet, plusieurs études discutent d'autres modèles utilisés pour décrire la coévolution entre les plantes et les agents pathogènes (Agrawal and Lively, 2002;

Moury et al., 2014; Dybdahl and Storfer, 2003). Par exemple, pour le modèle du « matching-allele » l'infection d'un hôte par un parasite requiert une interaction spécifique entre un facteur de virulence de l'agent pathogène et un facteur d'avirulence de la plante, alors que pour le modèle gène pour gène c'est l'incompatibilité de l'interaction qui résulte d'une telle interaction spécifique entre deux facteurs de la plante et de l'agent pathogène.

*II.A.2. Rôle de la variabilité génétique des effecteurs de *P. halstedii* dans la relation hôte-agent pathogène.*

Dans les études présentées dans le chapitre II, nous nous sommes limités aux rôles des mutations dans l'évolution des gènes d'effecteurs chez *P. halstedii*. La mutation d'une base dans un gène est aléatoire. Cependant, ces modifications dans la séquence en acides nucléiques peuvent être respectivement non-synonymes ou synonymes si elles sont responsables ou non de modifications dans la séquence en acides aminés de la protéine codée, ce qui dépend : (i) de sa position sur le codon, et (ii) de l'acide aminé codé initialement. Différents indices statistiques permettent de calculer la diversité nucléotidique représentant le ratio entre mutation synonyme et non-synonyme dans un gène en tenant compte de ces paramètres et de la taille des gènes. Parmi ces indices on peut distinguer le test de neutralité de type D de Tajima (Tajima 1989), P_i (diversité nucléotidique) (Roza et al., 2003) et le K_a/K_s (Cf Encadré 2) (Hurst 2002). Dans le cadre d'une étude intra et inter populationnelle il est possible d'utiliser l'index de neutralité qui compare le ratio intra et inter populationnel de substitutions non-synonymes et synonymes (Whiston and Taylor, 2014).

Dans le cas des effecteurs de *P. halstedii*, l'identification des pressions de sélection s'exerçant sur ces gènes peuvent nous permettre de formuler des hypothèses quant aux rôles de ces protéines dans la virulence de l'agent pathogène (Encadré 2):

Mesure de la diversité nucléotidique: indice Ka/Ks.

$$K_a/K_s = \frac{\text{nombre de mutations non - synonymes}}{\text{nombre de sites non - synonymes}} / \frac{\text{nombre de mutations synonymes}}{\text{nombre de sites synonymes}}$$

Lorsque pour un gène ce ratio est supérieur à un, on dit que ce gène est sous sélection positive ou diversifiante, c'est-à-dire que les mutations non-synonymes sont sélectionnées au cours de l'évolution car elles apportent un gain de valeur sélective aux individus qui les portent.

A l'inverse, lorsque pour un gène ce ratio est inférieur à un, on dit que ce gène est sous sélection purifiante. Dans ce cas, les mutations non-synonymes ne sont pas sélectionnées au cours de l'évolution car elles entraînent une baisse de valeur sélective chez les individus qui les portent du fait de la perte de fonction de la protéine dont ces mutations sont responsables.

Lorsque pour un gène ce ratio est égal à un, on dit qu'il est sous sélection neutre, c'est-à-dire que ce gène n'est soumis à aucune pression de sélection par l'environnement. Dans ce cas, les mutations non-synonymes n'ont aucun impact sur la valeur sélective des individus qui les portent, et se comportent donc comme les mutations synonymes dans la population étudiée.

Néanmoins, il est possible de prendre en compte la réalité biologique de cette donnée en remplaçant la valeur seuil de un avec la valeur du ratio calculé sur des gènes neutres (codant pour des gènes non soumis à pression de sélection de la part de l'environnement) de l'agent pathogène.

Encadré 2

- En effet, chez les organismes phytopathogènes, les effecteurs qui interagissent directement avec les protéines de la plante sont susceptibles d'être sous sélection positive à cause des fortes contraintes exercées par le système de perception de l'hôte. Ainsi, toute mutation dans la séquence d'un effecteur permettant, (i) d'échapper à la vigilance de la plante tout en conservant sa fonction, ou (ii) d'interagir avec de nouvelles cibles dans la plante, est susceptible d'être sélectionnée au sein de la population du fait de l'avantage sélectif qu'elle apporte à l'agent pathogène en interaction avec l'hôte.

- A l'inverse, les gènes d'effecteurs sous sélection purifiante (ou négative) sont susceptibles de jouer un rôle majeur dans la virulence de l'agent pathogène, ce qui expliquerait que la majorité des mutations non-synonymes a un impact négatif sur leur fonction. L'identification de gènes de résistance ciblant ces effecteurs non-polymorphe pourrait être une stratégie pour identifier des sources de résistance durable. En recherche médicale, l'identification de gènes non polymorphe est utilisée pour identifier des molécules candidates permettant de produire des vaccins procurant une immunité durable contre les agents pathogènes (Neafsey et al., 2010). Dans l'équipe « tournesol », le projet ANR Effectoores démarré récemment a pour but d'identifier des gènes de résistance de plante ciblant des effecteurs non polymorphes d'oomycètes, en collaboration avec d'autres équipes de recherche françaises travaillant sur le mildiou de la vigne et de la tomate.,

- Enfin, les gènes sous sélection neutre sont considérés comme n'ayant aucun rôle direct dans la virulence des agents pathogènes.

Le principe est le suivant : si dans un environnement donné une modification de la séquence protéique augmente la valeur adaptative de l'agent pathogène qui les porte, la fréquence de celui-ci au sein de la population de *P. halstedii* va augmenter lors du processus de sélection naturelle propre à cet environnement. Des études menées chez des champignons et oomycètes tendent à montrer que la plasticité génomique, due en partie aux éléments transposables, pourrait être à l'origine de la modification de leur effectome (Judelson 2012). Chez *P. halstedii*, l'ensemble de ces mécanismes restent inconnu. Néanmoins, une étude plus poussée réalisée sur l'ensemble des génomes entiers de différents pathotypes de l'agent pathogène devrait nous

permettre de mieux comprendre le rôle des différentes catégories d'effecteurs et de leur évolution dans la virulence de *P. halstedii*.

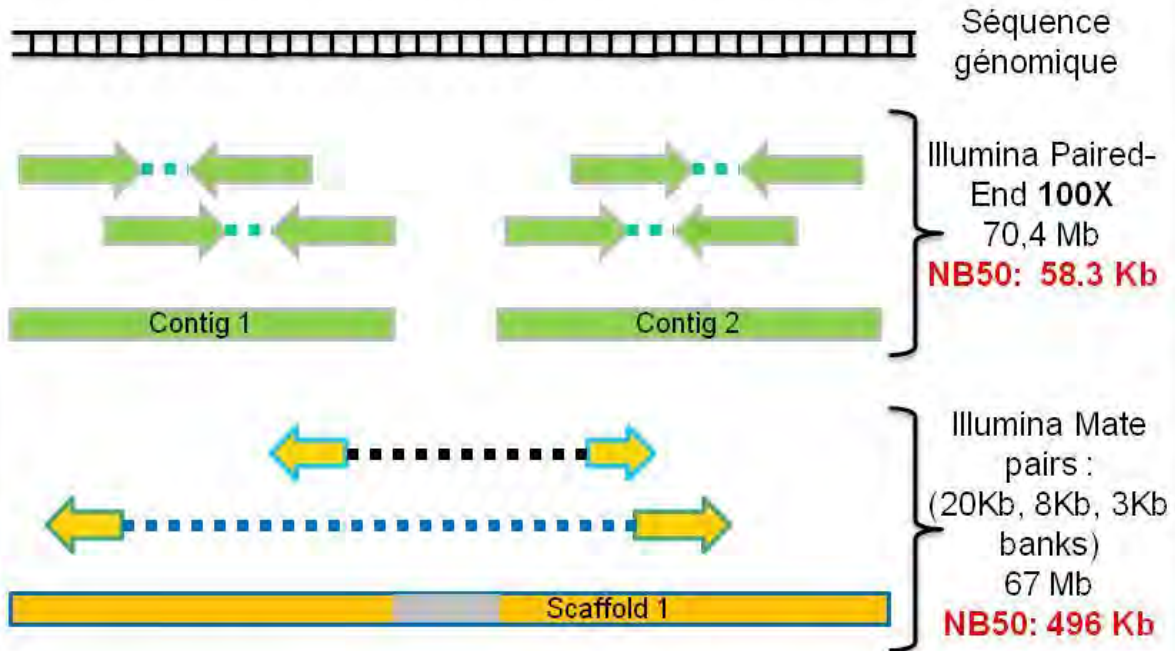
III. Annotation des génomes de *P. halstedii*, et recherche d'effecteurs putatifs.

III.A. Séquençage génomique.

L'étude globale des génomes de *P. halstedii* nécessite dans un premier temps l'obtention d'un génome dont la qualité de l'assemblage (quantité d'erreurs, taille des séquences contiguës, et prise en compte des séquences répétées) doit permettre de l'utiliser en tant que référence pour l'étude des génomes d'autres isolats de *P. halstedii* dont la résolution serait moins importante.

Du fait de sa présence dans la région Sud-Ouest (CETIOM), nous avons choisi l'isolat référence du pathotype 710 pour constituer notre pathosystème modèle (Cf Chapitre I) et le génome de référence de *P. halstedii*. Un premier séquençage « paired-end » du génome du pathotype 710 (Illumina HiSeq 2000 paired-end 100X) a donc été réalisé. Ces séquences, ont permis de construire des « contigs » (alignements de séquences chevauchantes) utilisés pour les travaux présentés Chapitres II et III. Ces « contigs » ont été orientés les uns par rapport aux autres grâce à un séquençage « mate-pairs » de trois banques de 20Kb, 8Kb et 3Kb (140X) (Encadré 3). Les premières caractéristiques présentées par l'assemblage de ce génome de référence (long Scaffolds Encadré 3) montrent un alignement dont la qualité rend possible l'annotation d'un grand nombre de gènes de *P. halstedii*. Afin d'identifier la diversité qui existe au sein des génomes de *P. halstedii* (étude de polymorphisme), nous avons entamé le reséquençage des génomes d'un isolat représentatif pour chacun des pathotypes de l'agent pathogène présent en France (Illumina HiSeq 2000 pairend 50X). Six de ces assemblages génomiques ont eux aussi été utilisés dans l'étude du polymorphisme présentée dans le Chapitre II. L'ensemble de ces expérimentations est fait en collaboration avec la plateforme génomique de Toulouse.

Processus d'assemblage génomique:



La technique de séquençage « Paired-End » permet de séquencer les deux extrémités de fragments courts (<800 paires de bases (pb)). Ainsi, l'assemblage permet d'obtenir un grand nombre de « contigs » dont on ne connaît pas la position des uns par rapport aux autres. Pour le génome du pathotype 710 de *P. halstedii*, le séquençage « Paired-End » d'une profondeur de 100X a permis d'obtenir un génome de 70,4 Mb avec un NB50 de 58,3 Kb.

La technique de séquençage Illumina « Mate pairs » permet de séquencer des fragments génomiques qui peuvent être distants de 1,5 à 20 Kpb. Ainsi, il est possible d'organiser les « contigs » obtenus par « Paired-End » les uns par rapport aux autres grâce aux données par séquençage « Mate pairs ». Par exemple, sur le schéma ci-dessus on peut voir que le séquençage « Mate pairs » permet de connecter les « contigs » 1 et 2 pour former ce que l'on appelle un « Scaffold » c'est-à-dire un ensemble de séquences dont on connaît l'ordre et la distance qui les sépare. L'ajout dans l'assemblage des données de séquences des 3 banques « Mate pair » permet ainsi d'organiser les « contigs » préalablement obtenus et a pour effet d'augmenter le N50 du génome du pathotype 710 de *P. halstedii* à 496 kpb. (Coll. LIPM Bioinfo).

Encadré 3

III.B. Identification des effecteurs de *P. halstedii*.

A partir des génomes de *P. halstedii* séquencés, la plateforme bio-informatique du laboratoire a réalisé l'annotation automatique des gènes de *P. halstedii*, la détermination des protéomes et leur accessibilité sous forme d'un portail. La recherche des effecteurs a ensuite été conduite sur ces bases de données en collaboration avec la plateforme bio-informatique. Dans cette optique, la question que nous nous sommes posée était : Comment reconnaître un effecteur à partir de sa séquence nucléique? L'utilisation des caractéristiques communes aux effecteurs d'autres oomycètes - qu'elles soient globales (homologies de séquences) ou liées à des motifs protéiques précis - nous permettent d'identifier les gènes de *P. halstedii* qui partagent des caractéristiques communes. Cependant, les effecteurs qui portent des critères propres à *P. halstedii* ne peuvent être identifiés par ces méthodes. La présence d'un motif protéique ou d'une homologie de séquence entre un effecteur d'oomycète et un gène de *P. halstedii* ne prouve pas que ce dernier soit réellement un effecteur fonctionnel. De plus, les gènes d'effecteurs constituent des familles connues pour être dynamiques, suggérant la présence de nombreux pseudogènes considérés comme des reliques de gènes ancestraux ne jouant pas systématiquement le rôle d'effecteur. En effet, plusieurs études suggèrent que certains « pseudogènes » transcrits pourraient avoir un rôle important dans la régulation de différents processus cellulaires, notamment dans des relations hôte/agent pathogène (Li et al., 2013). Toutefois, nous avons choisi d'utiliser des données de transcriptomique (Cf Chapitre II) pour sélectionner dans nos analyses des gènes codant pour des protéines fonctionnelles. Ces données seront complétées dans le cadre du projet ANR Effectoores par le séquençage RNAseq d'ARNm extraits lors de l'interaction entre *P. halstedii* et *H. annuus*.

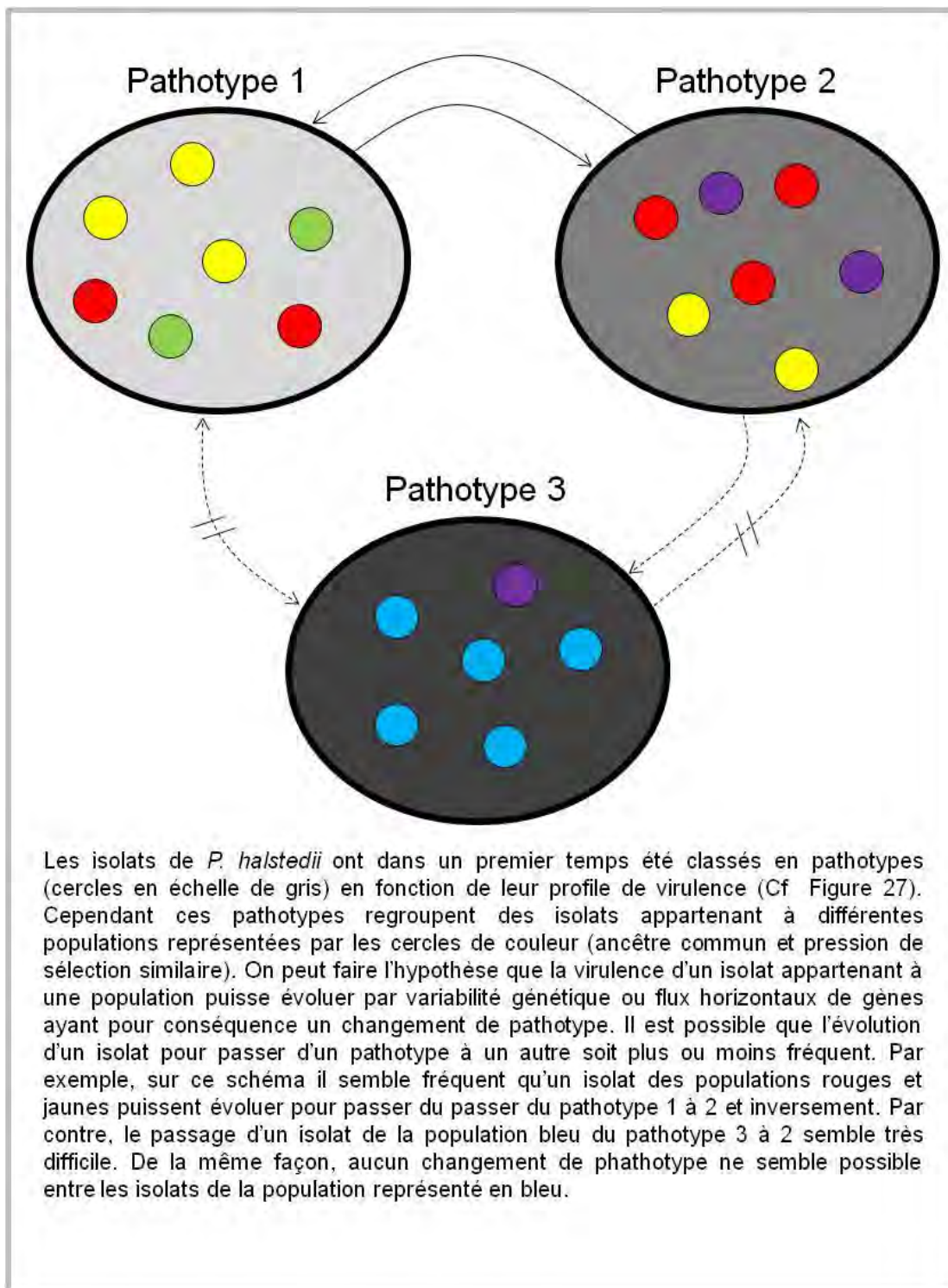
IV. Génomique comparative et étude du polymorphisme des effecteurs de *P. halstedii*.

IV.A. Etude du polymorphisme des gènes d'effecteurs de *P. halstedii*.

Afin de comprendre le rôle des effecteurs putatifs de *P. halstedii* dans l'évolution de la virulence de l'agent pathogène, nous avons initié une étude portant sur le polymorphisme inter et intra pathotype au sein d'un sous-groupe de 54 effecteurs (Cf Chapitre II). Cette étude nous a permis :

- De poser les bases d'un outil de diagnostic des pathotypes de *P. halstedii*.
- De montrer que les effecteurs de *P. halstedii* présentent globalement un taux de polymorphisme important comparé à la plupart des autres gènes de *P. halstedii*.
- De rassembler un ensemble d'éléments appuyant l'hypothèse selon laquelle les protéines que nous avons identifiées comme effecteurs pourraient avoir des rôles divers dans la virulence de l'agent pathogène.

Cependant, l'utilisation d'un jeu de données restreint, composé de seulement sept assemblages génomiques, ne nous permet ni de valider l'ensemble des hypothèses développées dans cette étude qui replace les effecteurs dans le modèle complexe du zig-zag (Cf Chapitre II), ni d'identifier les mécanismes sous-jacents. De plus, le regroupement des isolats de *P. halstedii* en pathotypes ne tient compte que de la virulence des agents pathogènes pour les 15 lignées cultivées de tournesol incluses dans la nomenclature internationale (spectre d'hôte). La notion de pathotype diffère donc de la notion de population, qui regroupe des individus ayant un ancêtre commun et vivant dans des environnements comparables (pression de sélection similaire) sans tenir compte de leur spectre d'hôte. Ainsi, deux isolats présentant le même pathotype peuvent appartenir à deux populations différentes et donc présenter des traits



Encadré 4

Encadré 4

d'histoires de vie différents (Encadré 4). Le polymorphisme observé entre ces deux isolats peut alors être lié soit, à la virulence des isolats à travers la fonction protéique des effecteurs, soit aux différentes pressions de sélection d'origine biotique et abiotique (traits d'histoires de vie) propres à chacun des isolats.

IV.A.1. Du polymorphisme génétique à la génomique comparative.

Les progrès réalisés par les technologies de séquençage devraient dans les prochaines années faciliter l'obtention de données génomiques permettant une analyse comparative des génomes entiers chez un grand nombre d'isolats de *P. halstedii*. Ces données devraient notamment nous permettre de réaliser des analyses de génétique d'association sur les génomes entiers (Genome Wide Association Studies-GWAS) avec un ensemble de variables qui représentent les différentes sources de pression appliquées par l'environnement biotique et abiotique (Korte et al., 2012; Galesloot et al., 2014; Encadré 5). Il est aussi possible de réaliser ce type d'analyse en tenant compte du lien de parenté entre les différents isolats de *P. halstedii* et de leur spectre d'hôte (pathotype) (Encadré 5).

Ainsi, nous pourrions définir à quels types de pressions de sélection sont soumis les gènes d'effecteurs de *P. halstedii* (positive, purifiante neutre ou balancée - maintien de plusieurs allèles dans la population), et quelles sont les variables de l'environnement qui en sont responsables. Plus largement, ces analyses devraient nous permettre d'identifier des gènes impliqués dans la virulence de l'agent pathogène (Yue and Schifferli, 2014; Gladieux et al., 2014).

A

	SNP1	SNP2	SNP3	SNP4
isolat 1	A	A	A	A
isolat 2	T	T	T	T
isolat 3	C	C	C	C
isolat 4	G	G	G	G

B

	environnement abiotique (climat)			environnement biotique		distance génétique				Profil de virulence (pathotype)					
	T°C min	T°C max	% humidité	Hôte naturel	Microbiome	Isolat1	Isolat2	Isolat3	Isolat4	Hôte D1	Hôte D2	Hôte D3	Hôte D4		
isolat 1	<i>Données quantitatives</i>					<i>Données quantitatives</i>				R	S	S	R		
isolat 2										Hôte1	Env1	S	S	R	R
isolat 3										Hôte2	Env1	R	S	S	R
isolat 4										Hôte1	Env2	R	S	R	S
isolat 4	Hôte3	Env3	R	S	R	S									

Matrices potentielles pour les analyses de génétique d'association utilisant des génomes entiers. (A) Tableau représentant le génotype des isolats pour les SNP identifiés sur l'ensemble du génome. (B) Matrice de phénotype qui regroupe les données relatives à (i) l'environnement abiotique: température minimum et maximum ainsi que le pourcentage d'humidité, (ii) l'environnement biotique: hôte naturel et microbiome (compétiteurs potentiels), (iii) la distance génétique entre les différents isolats (permet de rendre compte de l'affiliation entre les isolats) et (iv) le spectre d'hôte (pathotype).

Encadré 5

*IV.A.2. Comparaison de la variabilité génomique de *P. halstedii* entre systèmes agricoles et systèmes naturels.*

Lors de sa domestication, la culture du tournesol est passée d'une agriculture paysanne à une agriculture à fort rendement, industrialisée et uniformisée. Ces changements ont induit une baisse importante du niveau de variabilité génétique chez les tournesols cultivés comparés aux tournesols sauvages. La forte pression de sélection induite par l'utilisation sur de grandes surfaces de monocultures porteuses de gènes de résistance est susceptible de favoriser l'apparition d'isolats d'agents pathogènes contournant les gènes de résistances utilisés pour protéger la culture du tournesol. Afin d'étudier l'impact des choix variétaux sur l'évolution de la virulence de *P. halstedii*, il serait intéressant de comparer la diversité populationnelle de l'agent pathogène en milieu agricole et en milieu naturel. Cette comparaison pourrait être étendue à des isolats prélevés sur d'autres espèces végétales auxquelles *P. halstedii* est inféodé (Cf Chapitre I). En effet, il est primordial de mieux comprendre comment les effecteurs de *P. halstedii* évoluent au contact de leurs hôtes en milieu agricole et naturel (prélèvement d'isolats de *P. halstedii* sur des hôtes sauvages du genre *Helianthus*) pour identifier des sources de résistance et des pratiques culturales permettant une lutte plus durable contre l'agent pathogène.

IV.B. Impact de la plasticité génomique sur la variabilité génétique des effecteurs

Les mécanismes moléculaires à l'origine du fort taux de variabilité (mutations, présence/absence) observé entre les effectomes d'oomycètes apparentés ou non, sont peu étudiés, et ce malgré le fait qu'ils puissent être un des principaux facteurs intervenant passivement dans l'évolution de leur virulence. Néanmoins, plusieurs études font état de paramètres structurels et dynamiques qui pourraient avoir un impact sur la variabilité des

effectomes sécrétés. En effet, le séquençage récent des génomes de plusieurs oomycètes a permis d'estimer leurs tailles de 37 Mb pour *Pythium sylvaticum* et *A. laibachii* jusqu'à 240 Mb pour *Ph. Infestans*. Il est même possible d'observer des différences de tailles importantes au sein d'un même genre. Par exemple, le génome de *Ph. infestans* est quatre fois plus grand que celui de *Ph. ramorum* (65 Mb environ). Ces différences de tailles entre les génomes d'oomycètes sont principalement dues à la présence de séquences répétées, qui représentent une proportion allant de 7% chez *Py. Ultimum* jusqu'à 74% chez *Ph. Infestans* (Haas et al., 2009; Beaudet et al., 2013; Judelson, 2012). De plus, des études structurales ont permis de mettre en évidence une organisation génomique divisée en régions denses en gènes et pauvres en éléments transposables, et en régions pauvres en gènes et riches en séquences répétées principalement constituées d'éléments transposables (Haas et al., 2009). Chez les champignons comme chez les oomycètes, ces différents paramètres sont susceptibles de jouer collectivement un rôle sur la plasticité génomique permettant l'augmentation (duplications de gènes, gain de régions génomiques, mutations gain de fonction) ou la diminution (perte de gènes, de régions génomiques, mutations perte de fonction) de l'effectome sécrété par les agents pathogènes (Gladieux et al., 2014; Judelson, 2012).

En effet, la capacité de ces éléments transposables (retrotransposons ou éléments transposables à ADN) à s'auto-répliquer et à induire des recombinaisons génomiques est susceptible d'être à l'origine de la variabilité génétique existant au sein des régions pauvres en gènes dans les génomes d'oomycètes. Les éléments transposables peuvent aussi jouer un rôle dans la régulation de l'expression des gènes d'effecteurs chez les oomycètes (Judelson, 2012). Aussi, la cartographie physique des génomes de plusieurs isolats appartenant à différentes populations de *P. halstedii* permettrait de savoir si, comme chez *Ph. infestans*, les effecteurs de *P. halstedii* sont localisés dans des régions génomiques à faible densité de gène et dynamique (Haas et al., 2009; Judelson, 2012).

Les résultats de génotypage du chapitre II montrent clairement une distinction entre pathotypes homogènes et pathotypes hétérogènes (Cf Chapitre II). On peut penser que l'hétérogénéité d'un pathotype reflète la capacité des isolats en faisant partie à muter

rapidement, lui permettant de s'adapter à l'hôte. Ainsi, on peut faire l'hypothèse que les isolats apparus récemment et qui présentent une virulence contre un large spectre d'hôtes sont ceux ayant acquis au cours de l'évolution une capacité à s'adapter à leurs hôtes plus rapidement, ce qui leur permet de devenir prédominants dans certaines aires géographiques. Par exemple, les isolats appartenant au pathotype 714 apparu en 2002 présentent d'après nos analyses une forte hétérogénéité génotypique. Cette variabilité génétique pourrait expliquer la prévalence des isolats du pathotype 714 dans le quart Sud-ouest de la France.

Les mécanismes de reproductions sexués et de transfert horizontaux de gènes, permettent un brassage génétique par recombinaison et échange de matériel génomique entre individus qui favorise l'évolution des organismes (Gladieux et al., 2014; Judelson, 2012). Chez *P. halstedii*, ces mécanismes existent mais sont encore mal connus (Cf Chapitre I). Une étude de génomique comparative devrait être à même d'apporter des réponses quant à leur importance dans l'évolution des populations de l'agent pathogène.

Les premiers résultats de séquençage des génomes de *P. halstedii* montrent qu'il n'y a pas de différences fondamentales concernant la taille des génomes des isolats de référence pour les 7 pathotypes séquencés. Cependant, on observe une différence entre la taille du génome estimé par cytométrie de flux (100 Mb) et la taille de l'assemblage génomique (assemblage Aout 2014 67 Mb). Cette différence peut s'expliquer par le fait que les méthodes bio-informatiques utilisées pour assembler les séquences génomiques se heurtent à l'assemblage des séquences répétées. Ainsi, il est difficile de comparer la structure et la taille des génomes de *P. halstedii*. Ces difficultés d'assemblage des séquences génomiques viennent en parti du fait que les technologies utilisées génèrent des séquences courtes, entre 100 et 300 pb. Les nouvelles technologies de séquençage (PacBio RS II system de Pacific Biosciences ou MinION de Oxford Nanopore Technologies Ltd) permettent d'obtenir des séquences génomiques beaucoup plus longues qu'auparavant, entre 5 et 10 Kb. Ce type de séquençage pourrait être utilisé pour obtenir un assemblage se rapprochant d'une cartographie physique du génome de *P. halstedii* (Encadré). Une telle cartographie doit permettre d'identifier des zones du génome de *P.*

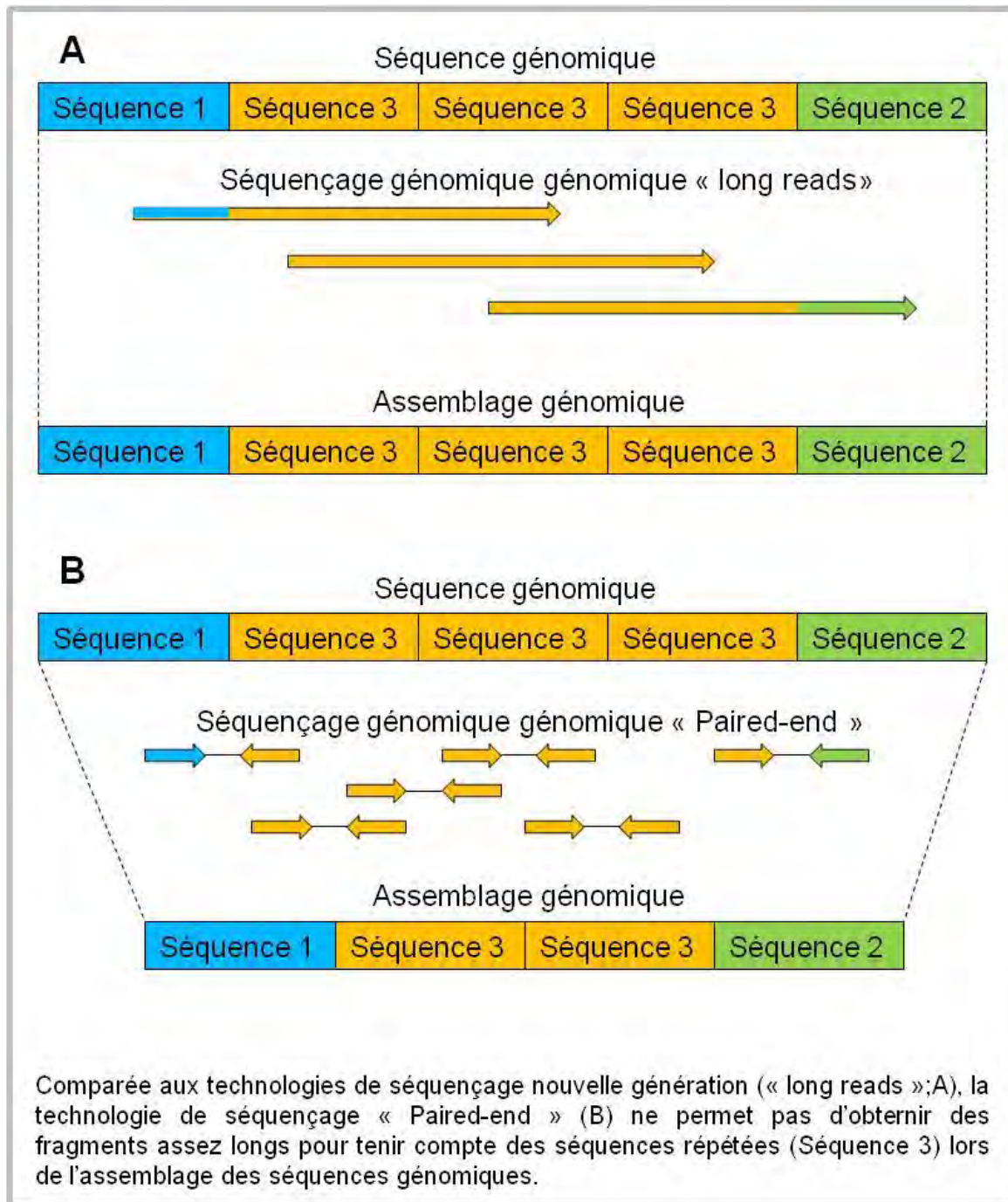
halstedii, dynamiques, pauvres en gènes, et riches en séquences répétées susceptibles de contenir des gènes d'effecteurs jouant un rôle dans l'évolution de la virulence de l'agent pathogène.

Il serait intéressant d'étendre ces études de génomique comparative à d'autres espèces de microorganismes ayant différents styles de vie : mutualistes, commensaux ou pathogènes (biotrophes, nécrotrophes, hémibiotrophes). Ce type d'analyse devrait permettre de différencier les mécanismes communs (Thines, 2014) de ceux étant à l'origine des spécificités de leurs modes de nutrition.

1.A. Création d'un conservatoire de la diversité génétique des populations de *P. halstedii* en milieux naturel et cultivé.

Pour conserver et étudier la diversité existant chez *P. halstedii*, il serait intéressant de constituer une banque d'isolats de *P. halstedii* échantillonnés en France et dans le monde. Cependant, la création d'une telle banque nécessite la mise en place de campagnes de prélèvements d'isolats telles que celles menées en France sous l'égide du Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés et des Semences (GEVES). Le pathotype des isolats récoltés doit ensuite être déterminé sur les 15 lignées différentielles de tournesol utilisées dans la classification internationale (tests « terre »), même s'il devrait être possible de les simplifier voire à terme de les remplacer par la méthode de diagnostic moléculaire exposée dans le chapitre II.

La mise au point d'un protocole permettant la conservation à long terme d'échantillons de spores viables à -80°C devrait diminuer la quantité de rotations nécessaires à la régénération des isolats. De plus, l'impact que peut avoir *P. halstedii* sur les cultures avoisinantes implique de travailler dans un laboratoire dédié de type L3 (ou L2 pour les pathotypes présents localement)



Encadré 6

possédant tout l'équipement nécessaire à la conservation et à la manipulation du microorganisme.

Pour éviter le mélange d'individus au sein d'un même isolat, il serait intéressant de constituer une sous-population générée à partir de spores isolées. L'étude de la diversité intra-populationnelle permettrait de connaître la proportion de mélanges présents dans les autres échantillons pour ajuster à l'avenir nos analyses portant sur le polymorphisme génomique de *P. halstedii*. Ainsi en connaissant la variabilité intra-échantillon, la variabilité au sein des populations de *P. halstedii* pourrait être mieux estimée.

V. Etude fonctionnelle des effecteurs de *P. halstedii*.

Les travaux décrits dans le chapitre III montrent que *P. halstedii* présente un grand nombre d'effecteurs candidats pour lesquels il est difficile de déterminer le rôle fonctionnel de chacun au cours de l'interaction avec la plante. Nous avons alors mis en place un protocole d'expression transitoire *in planta* chez le tournesol qui représente une méthode de choix pour l'étude fonctionnelle de ces protéines.

V.A. Quels sont les compartiments cellulaires de la plante ciblés par les effecteurs de *P. halstedii*?

Il est possible, comme nous l'avons fait, d'identifier les compartiments cellulaires ciblés par un effecteur, en observant la relocalisation d'une protéine fluorescente lorsqu'elle est couplée à une protéine d'intérêt (Cf Chapitre III). Cette méthode a déjà fait ses preuves en permettant la localisation des effecteurs de *H. arabidopsidis* dans différents compartiments du noyau de *N. benthamiana* (Leonelli et al., 2011), ou encore au niveau de la membrane plasmique comme la protéine HaRxLR75 (Badel et al., 2013).

Afin de préciser la localisation subcellulaire des effecteurs de *P. halstedii* dont la localisation

cellulaire est parfois difficile chez le tournesol, nous avons transposé ces expérimentations chez *N. benthamiana*. L'expression transitoire de ces protéines en système hétérologue a permis de mettre en évidence des mouvements rapides de l'effecteur PhRXLR31. Il serait donc intéressant de suivre, grâce à des microscopes confocaux de type Spinning Disk, les mouvements de ces effecteurs en réponse à différents stimuli ou drogues jouant sur le trafic vésiculaire ou le cytosquelette, chez différents génotypes de tournesol. Cependant, les compartiments cytoplasmiques dans lesquels les effecteurs PhRXLR31 et PhRXLR06 ont été visualisés ne sont toujours pas formellement identifiés par manque de marqueurs cytologiques opérationnels chez le tournesol. La localisation précise des effecteurs est une information importante pour déterminer leur rôle dans la virulence de l'agent pathogène.

V.B. Avec quelles cibles les effecteurs de P. halstedii interagissent-ils?

Pour identifier les cibles végétales avec lesquelles interagissent les effecteurs de *P. halstedii* dans la plante, plusieurs expériences sont réalisables. Dans le cas où ces protéines interagissent avec de l'ADN ou de l'ARN il est alors possible de procéder à des expériences de retard sur gel pour connaître la séquence ciblée.

Lorsque des banques d'ADNc clonés dans des levures sont disponibles (banque double hybride), il est possible de réaliser des expériences de doubles hybrides pour identifier des candidats pouvant interagir avec nos protéines d'intérêt. Cette technique, bien que réalisée en système hétérologue, permet la mise en place d'un crible sans *a priori*. De plus, cette méthode peut être étendue pour réaliser des expérimentations en triple hybride permettant d'identifier des complexes protéiques mettant en jeu un plus grand nombre de partenaires. En l'absence de banque double hybride, il est possible d'utiliser des techniques de co-immuno précipitation (TAP-TAG) couplée à de la spectrométrie de masse (Canonne et al., 2011).

Cependant, ces systèmes peuvent entraîner des artefacts. Il est alors nécessaire de confirmer ces interactions *in vivo*. Dans cette perspective, la technique de microscopie FRET-FLIM, qui permet de visualiser dans la plante le transfert d'énergie spécifique d'une interaction entre

deux protéines, a été utilisé pour confirmer l'interaction entre XopD et AtMYB30 (Canonne et al., 2011). D'autres méthodes telle que la « bimolecular fluorescence complementation2 » (BiFC) peuvent être réalisées pour confirmer des interactions *in vivo* entre deux protéines.

V.C. De quelles manières (activité biochimique) les effecteurs de *P. halstedii* agissent-ils sur leurs cibles?

Pour déterminer de quelle nature est l'activité biochimique des effecteurs sur leurs cibles végétales, il est possible d'étudier la structure 3D de la protéine et d'identifier des homologies avec des sites catalytiques permettant par exemple, la phosphorylation ou l'acétylation de leurs cibles. Dans un premier temps, la structure d'une protéine en trois dimensions peut être modélisée à partir de sa séquence en acides aminés. Dans un deuxième temps, il est possible de confirmer la structure 3D d'une protéine par des expériences de cristallographie qui nécessitent toutefois une grande quantité de protéines purifiées. L'étape suivante consiste à confirmer les fonctions biochimiques putatives de ces protéines en mesurant l'activité de ces sites catalytiques comparée à celle des protéines délétées pour ces sites.

V.D. Quel est l'impact des effecteurs de *P. halstedii* sur l'immunité végétale?

A l'inverse des résistances totales (qualitatives) présentant des phénotypes de résistance sans ambiguïté, les mécanismes de défenses mis en place par la plante suite à la sur-expression transitoire des effecteurs *P. halstedii* ne donnent pas de phénotypes facilement identifiables en dehors des nécroses.

Pour décrypter l'impact des effecteurs sur la virulence de l'agent pathogène, il est possible de mesurer plus finement le niveau des différents mécanismes de défenses de la plante suite à la sur-expression des effecteurs chez l'hôte (production de molécules antimicrobiennes, mesure

de l'expression de gènes de défenses, ou encore quantification de réactions hypersensibles).

Une autre méthode consiste à suivre la progression de l'agent pathogène dans la plante après expression transitoire des effecteurs. Le dispositif suivant pourrait être mis en place : il repose sur la sélection d'un couple de lignées quasi-isogéniques (i) présentant un comportement différentiel vis-à-vis du pathotype 710 de *P. halstedii* (pour lequel nous voulons tester les effecteurs), et (ii) qui seraient toutes les deux sensibles à un autre pathotype de l'agent pathogène. A partir de ce système nous cherchons à identifier deux types d'effecteurs : (i) des effecteurs dont l'expression transitoire se traduit par une diminution de la quantité d'agent pathogène dans la plante, ce qui suggère que cet effecteur joue le rôle de facteur d'avirulence en induisant des mécanismes de défense chez la plante qui affectent le développement de l'agent pathogène. Par exemple, les effecteurs du pathotype 710 reconnus exclusivement chez la lignée résistante et induisant un ralentissement dans le développement de la maladie, peuvent être considérés comme des facteurs d'avirulence (Encadré 7) ; (ii) Des effecteurs qui jouent le rôle de facteur de virulence dont l'expression transitoire abolit la reconnaissance de l'agent pathogène et la mise en place de mécanismes de défense chez la plante induisant une augmentation de la quantité d'agent pathogène. Par exemple, si l'expression transitoire d'un effecteur de *P. halstedii* chez le tournesol se traduit par la virulence (augmentation du développement de l'agent pathogène) d'un isolat, à l'origine avirulent sur la variété de tournesol considérée, cela suggère que cet effecteur joue le rôle d'un facteur de virulence (Encadré 8).

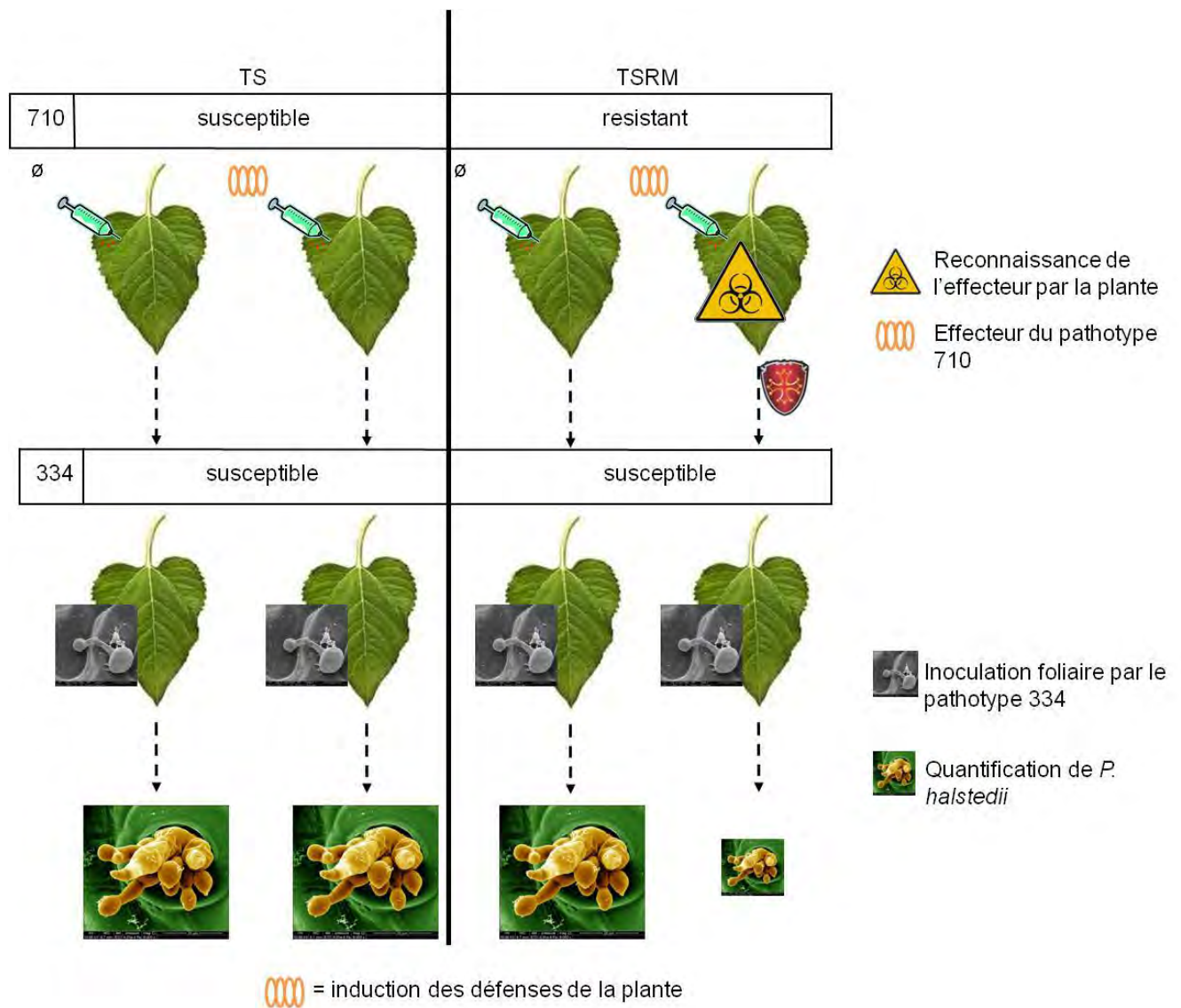
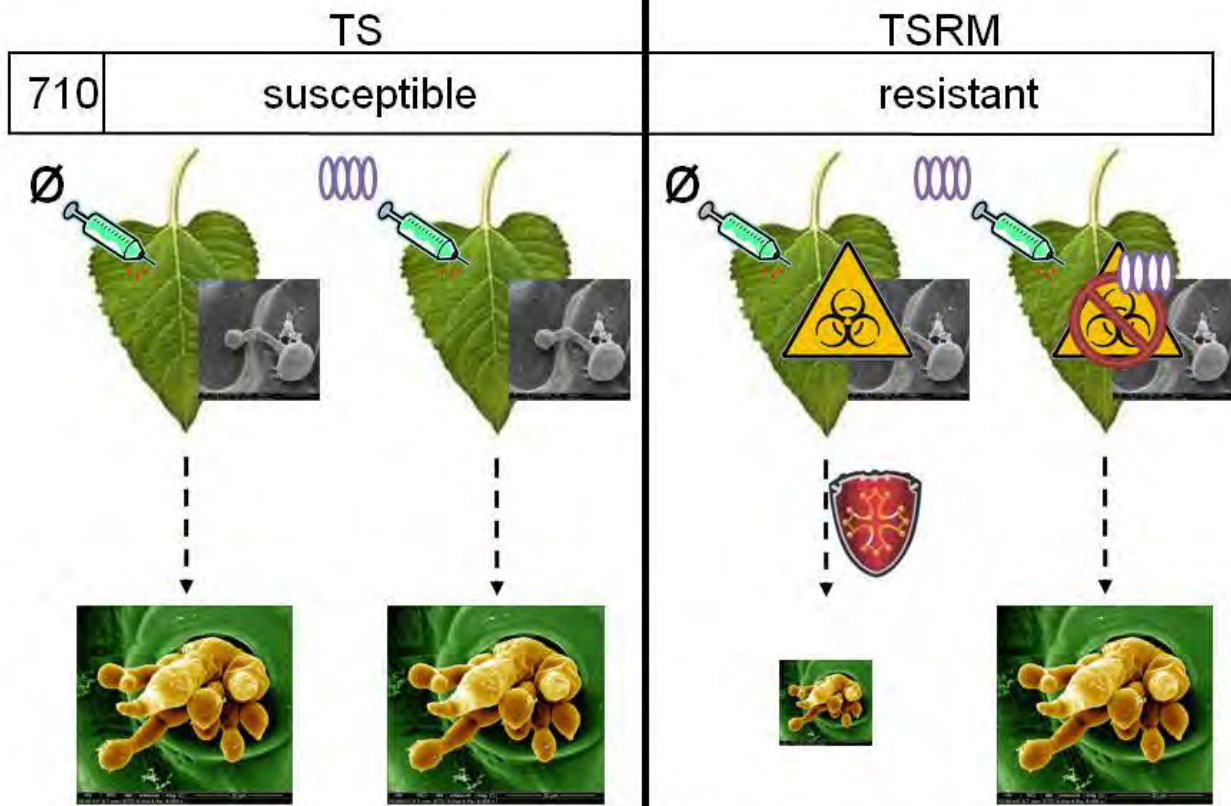


Schéma expérimental pour l'identification de gènes d'avirulences, en relation avec la résistance de TSRM. Les feuilles des génotypes de tournesols TS et TSRM de 2 semaines ½ sont transformées transitoirement par agroinfection pour exprimer un effecteur du pathotype 710 de *P. halstedii*. TS sensible vis-à-vis du pathotype 710 ne réagit ni à l'expression de l'effecteur, ni au contrôle. TSRM résistant vis-à-vis du pathotype 710 réagit uniquement à l'expression de l'effecteur induisant des mécanismes de défenses. Deux jours après agroinfection avant l'apparition d'éventuelles nécroses, les plantes sont inoculés avec le pathotype 334 qui est virulent sur les deux génotypes TS et TSRM. Notre hypothèse est que l'induction des mécanismes de défense chez TSRM suite à la reconnaissance de l'effecteur du pathotype 710 (facteur d'avirulence) doit inhiber le développement du pathotype 334 par rapport au contrôle et au génotype TS.



 = facteur de virulence



Reconnaissance de l'effecteur par la plante



Suppression des mécanismes de défense.



Inoculation foliaire par le pathotype 334



Quantification de *P. halstedii*

Schéma expérimental. Les feuilles des génotypes de tournesols TS et TSRM de 2 semaines ½ sont transformées transitoirement par agroinfection pour exprimer ou non un effecteur candidat de *P. halstedii*. Deux jours après agroinfection, les plantes sont inoculées avec le pathotype 710 de *P. halstedii*. TS sensible vis-à-vis du pathotype 710 ne réagit ni aux agroinfections ni à l'infection. *P. halstedii* se développe donc normalement dans les plantes TS. Dans les plantes TSRM (résistant vis-à-vis du pathotype 710) dans lesquelles aucun effecteur ne s'exprime, la plante reconnaît l'agent pathogène et met en place des mécanismes de défenses qui limitent sa progression dans la plante. Notre hypothèse est que si chez les plantes TSRM dans lesquelles on exprime un effecteur, le développement de *P. halstedii* est plus important que chez le contrôle, c'est que cet effecteur dans ce contexte génétique est un facteur de virulence.

Conclusion générale :

De nombreuses études montrent que les microorganismes phytopathogènes utilisent un grand nombre d'effecteurs apoplastiques et cytoplasmiques travaillant de concert pour mettre en place des conditions favorables au développement de l'agent pathogène. Au cours des travaux menés durant ma thèse, les résultats obtenus suggèrent que les effecteurs de *P. halstedii* sont impliqués dans l'évolution de la virulence de l'agent pathogène. En effet, on assiste à une course à l'armement entre l'agent pathogène qui ne cesse de modifier son effectome, et la plante qui adapte perpétuellement ses mécanismes de perception et de défense contre l'agent pathogène. Chez l'agent pathogène, l'évolution des mécanismes de virulence semble s'accélérer au sein des systèmes agronomiques, probablement à cause de la faible variabilité génétique des plantes cultivées qui, couplée à l'utilisation de résistances génétiques fortes, applique une forte pression de sélection sur les agents pathogènes. Ainsi, les résistances génétiques jusqu'alors efficaces pour protéger les cultures de tournesol se sont vues contournées par des isolats de *P. halstedii* qui ont gagné en virulence. D'un point de vue global, ce gain de virulence au sein des populations de *P. halstedii* pourrait menacer la survie des espèces satellites de plantes hôtes qui constituent pourtant une source de variabilité potentielle. Du même coup, la perte de cette variabilité ferait perdre une source importante de gènes de résistances.

Depuis les deux dernières décennies, l'étude des mécanismes moléculaires qui régissent la coévolution entre les plantes et les agents pathogènes a mis en lumière leur complexité biologique et évolutive. La compréhension de ces mécanismes dans leur globalité est un préalable à une lutte contre les agents pathogènes qui doit s'intégrer dans le temps et dans l'espace au sein de systèmes agricoles afin de les rendre plus respectueux de l'environnement et plus efficaces car plus durables. A terme, le but est de remplacer autant que possible, la lutte chimique par une meilleure gestion de résistances génétiques existant encore chez les tournesols sauvages. De meilleures pratiques culturales visant à limiter la sélection d'isolats virulents pourraient concilier et amplifier des processus déjà plus ou moins utilisés, tels que la rotation, dans le temps et dans l'espace, des cultures et des assemblages de résistances rendus

possibles grâce aux connaissances acquises sur les pathosystèmes.

De plus, on peut imaginer que les rouages moléculaires similaires à ceux utilisés par les microorganismes pour échapper à la vigilance de la plante pourraient être utilisés par la plante pour défaire les facteurs de virulence utilisés par l'agent pathogène. Ainsi, l'étude des mécanismes génomiques permettant l'évolution de la virulence des agents pathogènes, permettrait d'identifier des dispositifs similaires dans le système de défense des plantes. En effet, dans le cadre d'interactions symbiotiques de type mutualiste entre des plantes et des bactéries ou des champignons, il a été montré que des protéines de type effecteur pouvaient être utilisées respectivement par le microorganisme et la plante pour moduler la physiologie du partenaire et ainsi rendre possible la mise en place de l'interaction (Okazaki et al., 2013; Van de Velde et al., 2010). Ces résultats suggèrent l'existence de mécanismes équivalents dans les relations symbiotiques de type mutualistes et pathogènes.

Références bibliographiques.

- Agrawal, A. et Lively, C.M.** (2002). Infection genetics: gene-for-gene versus matching-alleles models and all points in between. *Evol. Ecol. Res.* **4**: 79–90.
- Ahmed, S., de Labrouhe, D.T., et Delmotte, F.** (2012). Emerging virulence arising from hybridisation facilitated by multiple introductions of the sunflower downy mildew pathogen *Plasmopara halstedii*. *Fungal Genet. Biol.* **49**: 847–855.
- Ali, S. et Bakkeren, G.** (2011). Fungal and oomycete effectors – strategies to subdue a host. *Can. J. Plant Pathol.* **33**: 425–446.
- Allen, R., Meitz, J., et Baumber, R.** (2008). Natural variation reveals key amino acids in a downy mildew effector that alters recognition specificity by an Arabidopsis resistance gene. *Mol. plant pathol.* **9**: 511–523.
- Allen, R.L., Bittner-Eddy, P.D., Grenville-Briggs, L.J., Meitz, J.C., Rehmany, A.P., Rose, L.E., et Beynon, J.L.** (2004). Host-parasite coevolutionary conflict between Arabidopsis and downy mildew. *Science* **306**: 1957–1960.
- Andrивon, D., Pilet, F., Montarry, J., Hafidi, M., Corbière, R., Achbani, E.H., Pellé, R., et Ellissèche, D.** (2007). Adaptation of *Phytophthora infestans* to Partial Resistance in Potato: Evidence from French and Moroccan Populations. *Phytopathology* **97**: 338–343.
- Armstrong, M.R. et al.** (2005). An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene *Avr3a*, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 7766–7771.
- As-sadi, F., Carrere, S., Gascuel, Q., Hourlier, T., Rengel, D., Le Paslier, M.-C., Bordat, A., Boniface, M.-C., Brunel, D., Gouzy, J., Godiard, L., et Vincourt, P.** (2011). Transcriptomic analysis of the interaction between *Helianthus annuus* and its obligate parasite *Plasmopara halstedii* shows single nucleotide polymorphisms in CRN sequences. *BMC Genomics* **12**: 498.
- Ayme, V., Petit-Pierre, J., Souche, S., Palloix, A., et Moury, B.** (2007). Molecular dissection of the potato virus Y VPg virulence factor reveals complex adaptations to the *pvr2* resistance allelic series in pepper. *J. Gen. Virol.* **88**: 1594–601.
- Badel, J.L., Piquerez, S.J.M., Greenshields, D., Rallapalli, G., Fabro, G., Ishaque, N., et Jones, J.D.G.** (2013). In planta effector competition assays detect *Hyaloperonospora arabidopsidis* effectors that contribute to virulence and localize to different plant subcellular compartments. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **26**: 745–757.

- Baxter, L. et al.** (2010). Signatures of Adaptation to Obligate Biotrophy in the *Hyaloperonospora arabidopsidis* Genome. *Science* **330**: 1549–1551.
- Beaudet, D., Nadimi, M., Iffis, B., et Hijri, M.** (2013). Rapid mitochondrial genome evolution through invasion of mobile elements in two closely related species of arbuscular mycorrhizal fungi. *PLoS One* **8**: e60768.
- Van den Berg, A.H., McLaggan, D., Diéguez-Uribeondo, J., et van West, P.** (2013). The impact of the water moulds *Saprolegnia diclina* and *Saprolegnia parasitica* on natural ecosystems and the aquaculture industry. *Fungal Biol. Rev.* **27**: 33–42.
- Boch, J. et Bonas, U.** (2010). Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu. Rev. Phytopathol.* **48**: 419–436.
- Boon, E., Zimmerman, E., Lang, B.F., et Hijri, M.** (2010). Intra-isolate genome variation in arbuscular mycorrhizal fungi persists in the transcriptome. *J. Evol. Biol.* **23**: 1519–1527.
- Borevitz, J.O. et al.** (2007). Genome-wide patterns of single-feature polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 12057–12062.
- Bos, J.I.B. et al.** (2010a). *Phytophthora infestans* effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 9909–9914.
- Bos, J.I.B. et al.** (2010b). *Phytophthora infestans* effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 9909–9914.
- Bos, J.I.B., Kanneganti, T.-D., Young, C., Cakir, C., Huitema, E., Win, J., Armstrong, M.R., Birch, P.R.J., et Kamoun, S.** (2006). The C-terminal half of *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* **48**: 165–176.
- Bouzidi, M.F., Badaoui, S., Cambon, F., Vear, F., De Labrouhe, D.T., Nicolas, P., et Mouzeyar, S.** (2002). Molecular analysis of a major locus for resistance to downy mildew in sunflower with specific PCR-based markers. *Theor. Appl. Genet.* **104**: 592–600.
- Bouzidi, M.F., Parlange, F., Nicolas, P., et Mouzeyar, S.** (2007). Expressed Sequence Tags from the oomycete *Plasmopara halstedii*, an obligate parasite of the sunflower. *BMC Microbiol.* **7**: 110.
- Bozkurt, T.O., Schornack, S., Banfield, M.J., et Kamoun, S.** (2012). Oomycetes, effectors, and all that jazz. *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**: 483–492.
- Brun, H., Chèvre, A.-M., Fitt, B.D.L., Powers, S., Besnard, A.-L., Ermel, M., Huteau, V., Marquer, B., Eber, F., Renard, M., et Andrivon, D.** (2010). Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytol.* **185**: 285–299.

- Cabral, A., Oome, S., Sander, N., Kűfner, I., Nűrnberger, T., et Van den Ackerveken, G.** (2012). Nontoxic Nep1-like proteins of the downy mildew pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis*: repression of necrosis-inducing activity by a surface-exposed region. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **25**: 697–708.
- Cabral, A., Stassen, J.H.M., Seidl, M.F., Bautor, J., Parker, J.E., et Van den Ackerveken, G.** (2011). Identification of *Hyaloperonospora arabidopsidis* Transcript Sequences Expressed during Infection Reveals Isolate-Specific Effectors. *PLoS One* **6**: e19328.
- Canonne, J., Marino, D., Jauneau, A., Pouzet, C., Brière, C., Roby, D., et Rivas, S.** (2011). The *Xanthomonas* type III effector XopD targets the *Arabidopsis* transcription factor MYB30 to suppress plant defense. *Plant Cell* **23**: 3498–3511.
- Chen, L.-Q. et al.** (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468**: 527–532.
- Chinnapun, D., Tian, M., Day, B., et Churngchow, N.** (2009). Inhibition of a *Hevea brasiliensis* protease by a Kazal-like serine protease inhibitor from *Phytophthora palmivora*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **74**: 27–33.
- Christie, P.J., Whitaker, N., et González-Rivera, C.** (2014). Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**: 1578–1591.
- Clark, R.M. et al.** (2007). Common sequence polymorphisms shaping genetic diversity in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **317**: 338–342.
- Coates, M.E. et Beynon, J.L.** (2010). *Hyaloperonospora arabidopsidis* as a pathogen model. *Annu. Rev. Phytopathol.* **48**: 329–345.
- Cooke, D.E.L. et al.** (2012). Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the irish potato famine pathogen. *PLoS Pathog.* **8**: e1002940.
- Costanzo, S., Ospina-Giraldo, M.D., Deahl, K.L., Baker, C.J., et Jones, R.W.** (2006). Gene duplication event in family 12 glycosyl hydrolase from *Phytophthora* spp. *Fungal Genet. Biol.* **43**: 707–714.
- Cowger, C. et Mundt, C.C.** (2002). Aggressiveness of *Mycosphaerella graminicola* Isolates from Susceptible and Partially Resistant Wheat Cultivars. *Phytopathology* **92**: 624–630.
- Damasceno, C.M.B., Bishop, J.G., Ripoll, D.R., Win, J., Kamoun, S., et Rose, J.K.C.** (2008). Structure of the glucanase inhibitor protein (GIP) family from *phytophthora* species suggests coevolution with plant endo-beta-1,3-glucanases. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **21**: 820–830.
- Davar, R., Darvishzadeh, R., Majd, A., Masouleh, K., et Ghosta, Y.** (2012). The Infection Processes of *Sclerotinia sclerotiorum* in Basal Stem Tissue of a Susceptible Genotype of *Helianthus annuus*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* **40**: 143–149.
- Debaeke, P. et Pérès, A.** (2003). Influence of sunflower (*Helianthus annuus* L.) crop management on Phoma black stem (*Phoma macdonaldii* Boerema). *Crop Prot.* **22**: 741–752.

- Delmotte, F., Giresse, X., Richard-Cervera, S., M'baya, J., Vear, F., Tourvieille, J., Walser, P., et de Labrouhe, D.T.** (2008). Single nucleotide polymorphisms reveal multiple introductions into France of *Plasmopara halstedii*, the plant pathogen causing sunflower downy mildew. *Infect. Genet. Evol.* **8**: 534–540.
- Deng, D., Yan, C., Pan, X., Mahfouz, M., Wang, J., Zhu, J.-K., Shi, Y., et Yan, N.** (2012). Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science* **335**: 720–723.
- Deslandes, L. et Genin, S.** (2014). Opening the *Ralstonia solanacearum* type III effector tool box: insights into host cell subversion mechanisms. *Curr. Opin. Plant Biol.* **20C**: 110–117.
- Deslandes, L. et Rivas, S.** (2012). Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends Plant Sci.* **17**: 644–655.
- Diamond, J.** (2002). Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature* **418**: 700–707.
- Díez-Navajas, A.M., Greif, C., Poutaraud, A., et Merdinoglu, D.** (2007). Two simplified fluorescent staining techniques to observe infection structures of the oomycete *Plasmopara viticola* in grapevine leaf tissues. *Micron* **38**: 680–683.
- Doehlemann, G. et Hemetsberger, C.** (2013). Tansley review Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens. *New Phytol.* **198**: 1001–1016.
- Dong, S., Kong, G., Qutob, D., Yu, X., Tang, J., Kang, J., Dai, T., Wang, H., Gijzen, M., et Wang, Y.** (2012). The NLP toxin family in *Phytophthora sojae* includes rapidly evolving groups that lack necrosis-inducing activity. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **25**: 896–909.
- Van Doorn, W.G. et al.** (2011). Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death Differ.* **18**: 1241–1246.
- Dumas, B., Bottin, A., Gaulin, E., et Esquerré-Tugayé, M.-T.** (2008). Cellulose-binding domains: cellulose associated-defensive sensing partners? *Trends Plant Sci.* **13**: 160–164.
- Dussle, C.M., Hahn, V., Knapp, S.J., et Bauer, E.** (2004). PIArg from *Helianthus argophyllus* is unlinked to other known downy mildew resistance genes in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* **109**: 1083–1086.
- Dybdahl, M.F. et Storfer, A.** (2003). Parasite local adaptation: Red Queen versus Suicide King. *Trends Ecol. Evol.* **18**: 523–530.
- Evangelisti, E., Rey, T., et Schornack, S.** (2014). Cross-interference of plant development and plant-microbe interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **20C**: 118–126.
- Fabro, G. et al.** (2011). Multiple Candidate Effectors from the Oomycete Pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis* Suppress Host Plant Immunity. *PLoS Pathog.* **7**: e1002348.

- Feng, B., Li, P., Wang, H., et Zhang, X.** (2010). Functional analysis of *pcpme6* from oomycete plant pathogen *Phytophthora capsici*. *Microb. Pathog.* **49**: 23–31.
- Fitt, B.D.L., Powers, S., Besnard, A., Ermel, M., Brun, H., Che, A., Renard, M., Andrivon, D., Huteau, V., et Marquer, B.** (2010). Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytologist*, **185**: 285–299.
- Flor, H.H.** (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**: 275–296.
- Fomicheva, a S., Tuzhikov, a I., Beloshistov, R.E., Trusova, S. V, Galiullina, R. a, Mochalova, L. V, Chichkova, N. V, et Vartapetian, a B.** (2012). Programmed cell death in plants. *Biochem. Biokhimiia* **77**: 1452–1464.
- Fu, Z.Q., Guo, M., Jeong, B., Tian, F., Elthon, T.E., Cerny, R.L., Staiger, D., et Alfano, J.R.** (2007). A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity. *Nature* **447**: 284–288.
- Galesloot, T.E., van Steen, K., Kiemeney, L. a L.M., Janss, L.L., et Vermeulen, S.H.** (2014). A comparison of multivariate genome-wide association methods. *PLoS One* **9**: e95923.
- Gassmann, W. et Bhattacharjee, S.** (2012). Effector-triggered immunity signaling: from gene-for-gene pathways to protein-protein interaction networks. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **25**: 862–868.
- Gaulin, E.** (2002). The CBEL glycoprotein of *Phytophthora parasitica* var-*nicotianae* is involved in cell wall deposition and adhesion to cellulosic substrates. *J. Cell Sci.* **115**: 4565–4575.
- Gessler, C., Pertot, I., et Perazzolli, M.** (2011). *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathol. Mediterr.* **50**: 3–44.
- Gladieux, P., Ropars, J., Badouin, H., Branca, A., Aguilera, G., de Vienne, D.M., Rodríguez de la Vega, R.C., Branco, S., et Giraud, T.** (2014). Fungal evolutionary genomics provides insight into the mechanisms of adaptive divergence in eukaryotes. *Mol. Ecol.* **23**: 753–773.
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**: 205–227.
- Glémin, S. et Bataillon, T.** (2009). A comparative view of the evolution of grasses under domestication. *New Phytol.* **183**: 273–290.
- Göhre, V. et Robatzek, S.** (2008). Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**: 189–215.
- Gómez-Gómez, L., Felix, G., et Boller, T.** (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **18**: 277–284.
- Govrin, E.M. et Levine, a** (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.* **10**: 751–757.

- Gulya, T.J., Tourvieille de Labrouhe, D., Masirevic, S., Penaud, A., Rashid, K. et Viranyi, F.** (1998) Proposal for the standardized nomenclature and identification of races of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). In: *Sunflower Downy Mildew Symposium, Proceedings of Sunflower Downy Mildew Symposium, Fargo, ND, USA*, pp. 130–136.
- Gururani, M.A., Venkatesh, J., Upadhyaya, C.P., Nookaraju, A., Pandey, S.K., et Park, S.W.** (2012). Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **78**: 51–65.
- Gust, A. a, Brunner, F., et Nürnberger, T.** (2010). Biotechnological concepts for improving plant innate immunity. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**: 204–210.
- Haas, B.J. et al.** (2009). Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* **461**: 393–398.
- Hahlbrock, K., Scheel, D., Logemann, E., Nürnberger, T., Parniske, M., Reinold, S., Sacks, W.R., et Schmelzer, E.** (1995). Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 4150–4157.
- Hammer, T.R., Thines, M., et Spring, O.** (2007). Transient expression of gfp in the obligate biotrophic oomycete *Plasmopara halstedii* using electroporation and a mechanoperforation method. *Plant Pathol.* **56**: 177–182.
- Han, S.-W. et Jung, H.W.** (2013). Molecular sensors for plant immunity; pattern recognition receptors and race-specific resistance proteins. *J. Plant Biol.* **56**: 357–366.
- Hannah Böhm, Isabell Albert, Li Fan, A.R. and T.N. Nürnberger** (2014). Immune receptor complexes at the plant cell surface. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 47–54.
- Hardham, A. R., et Cahill, D. M.** (2010). The role of oomycete effectors in plant–pathogen interactions. *Functional plant biology*, **37**: 919–925.
- He, P., Shan, L., Lin, N.-C., Martin, G.B., Kemmerling, B., Nürnberger, T., et 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., et Whittam, T.S.** (2004). Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**: 181–206.
- Hein, I., Gilroy, E.M., Armstrong, M.R., et Birch, P.R.J.** (2009). The zig-zag-zig in oomycete–plant interactions. *Mol. Plant Pathol.* **10**: 547–562.
- Hicks, S.W. et Galán, J.E.** (2013). Exploitation of eukaryotic subcellular targeting mechanisms by bacterial effectors. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**: 316–326.

- Huitema, E., Vleeshouwers, V.G. a a, Cakir, C., Kamoun, S., et Govers, F.** (2005). Differences in intensity and specificity of hypersensitive response induction in *Nicotiana* spp. by INF1, INF2A, and INF2B of *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **18**: 183–193.
- Hurst, L. D.** (2002). The K/a K/s ratio: diagnosing the form of sequence evolution. *TRENDS in Genetics*, **18**: 486-487.
- Ioos, R., Laugustin, L., Rose, S., Tourvieille, J. et de Labrouhe, D.T.** (2007). Development of a PCR test to detect the downy mildew causal agent *Plasmopara halstedii* in sunflower seeds. *Plant Pathol.* **56**: 209–218.
- Ioos, R., Fourrier, C., Wilson, V., Webb, K., Schereffer, J. L., & de Labrouhe, D. T.** (2012). An optimized duplex real-time PCR tool for sensitive detection of the quarantine oomycete *Plasmopara halstedii* in sunflower seeds. *Phytopathology*, **102**: 908-917
- Janzac, B., Fabre, F., Palloix, A., & Moury, B.** (2009). Constraints on evolution of virus avirulence factors predict the durability of corresponding plant resistances. *Molecular plant pathology*, **10**: 599-610.
- Jiang, R.H.Y., Tyler, B.M., Whisson, S.C., Hardham, A.R., et Govers, F.** (2006). Ancient origin of elicitor gene clusters in *Phytophthora* genomes. *Mol. Biol. Evol.* **23**: 338–351.
- Johnson, R.** (1979). Letter to the Editor: The concept of durable resistance. *Phytopathology*, **69**: 198-199.
- Jones, J. D., et Dangl, J. L.** (2006). The plant immune system. *Nature*. **444**: 323-329.
- Jørgensen, I. H.** (1992). Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley. *Euphytica*, **63**: 141-152.
- Judelson, H.S.** (2012). Dynamics and innovations within oomycete genomes: insights into biology, pathology, and evolution. *Eukaryot. Cell.* **11**: 1304–1312
- Juillerat, A. et al.** (2014). Comprehensive analysis of the specificity of transcription activator-like effector nucleases. *Nucleic Acids Res.* **42**: 5390–5402.
- Kale, S.D., Gu, B., Capelluto, D.G.S., Dou, D., Feldman, E., Rumore, A., Arredondo, F.D., Hanlon, R., Fudal, I., et Rouxel, T.** (2010). External Lipid PI3P Mediates Entry of Eukaryotic Pathogen Effectors into Plant and Animal Host Cells. *Cell* **142**: 284–295.
- Katiyar-Agarwal, S., Morgan, R., Dahlbeck, D., Borsani, O., Villegas, A., Zhu, J.-K., Staskawicz, B.J., et Jin, H.** (2006). A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 18002–18007.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G., et Bonas, U.** (2007). A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* **318**: 648–651.
- Kemen, E., Gardiner, A., Schultz-Larsen, T., Kemen, A.C., Balmuth, A.L., Robert-Seilaniantz, A., Bailey, K., Holub, E., Studholme, D.J., Maclean, D., et Jones, J.D.G.** (2011). Gene Gain and Loss during

- Evolution of Obligate Parasitism in the White Rust Pathogen of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biol.* **9**: e1001094.
- Khang, C.H., Berruyer, R., Giraldo, M.C., Kankanala, P., Park, S.-Y., Czymmek, K., Kang, S., et Valent, B.** (2010). Translocation of *Magnaporthe oryzae* effectors into rice cells and their subsequent cell-to-cell movement. *Plant Cell* **22**: 1388–1403.
- Kiefer, B., Riemann, M., Büche, C., Kassemeyer, H.-H., et Nick, P.** (2002). The host guides morphogenesis and stomatal targeting in the grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *Planta* **215**: 387–393.
- Kim, Y.J., Lin, N., et Martin, G.B.** (2002). Interact with the Pto Kinase and Activate Plant Immunity. *Cell* **109**: 589–598.
- King, S.R.F., McLellan, H., Boevink, P.C., Armstrong, M.R., Bukharova, T., Sukarta, O., Win, J., Kamoun, S., Birch, P.R.J., et Banfield, M.J.** (2014). *Phytophthora infestans* RXLR effector PexRD2 interacts with host MAPKKK ϵ to suppress plant immune signaling. *Plant Cell* **26**: 1345–1359.
- Korte, A., Vilhjálmsson, B.J., Segura, V., Platt, A., Long, Q., et Nordborg, M.** (2012). A mixed-model approach for genome-wide association studies of correlated traits in structured populations. *Nat. Genet.* **44**: 1066–1071.
- Kunjeti, S.G., Evans, T.A., Marsh, A.G., Gregory, N.F., Kunjeti, S., Meyers, B.C., Kalavacharla, V.S., et Donofrio, N.M.** (2012). RNA-Seq reveals infection-related global gene changes in *Phytophthora phaseoli*, the causal agent of lima bean. **13**: 454–466.
- Lacombe, S., Kaan, F., Léger, S., et Bervillé, a** (2001). An oleate desaturase and a suppressor loci direct high oleic acid content of sunflower (*Helianthus annuus* L.) oil in the Pervenets mutant. *C. R. Acad. Sci. III.* **324**: 839–845.
- Lacombe, S., Rougon-Cardoso, A., Sherwood, E., Peeters, N., Dahlbeck, D., van Esse, H.P., Smoker, M., Rallapalli, G., Thomma, B.P.H.J., Staskawicz, B., Jones, J.D.G., et Zipfel, C.** (2010). Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nat. Biotechnol.* **28**: 365–369.
- Lamour, K.H. et al.** (2012). Genome sequencing and mapping reveal loss of heterozygosity as a mechanism for rapid adaptation in the vegetable pathogen *Phytophthora capsici*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **25**: 1350–1360.
- Leach, J.E., Cruz, C.M.V., et Bai, J.** (2001). Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annual review of phytopathology* **39**: 187-224.
- Lee, S.C., Ristaino, J.B., et Heitman, J.** (2012). Parallels in intercellular communication in oomycete and fungal pathogens of plants and humans. *PLoS Pathog.* **8**: e1003028.

- Leonelli, L., Pelton, J., Schoeffler, A., Dahlbeck, D., Berger, J., Wemmer, D.E., et Staskawicz, B.** (2011). Structural Elucidation and Functional Characterization of the *Hyaloperonospora arabidopsidis* Effector Protein ATR13. *PLoS Pathog.* **7**: e1002428.
- Lévesque, C.A. et al.** (2010). Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. *Genome Biol.* **11**: R73.
- Li, W., Yang, W., et Wang, X.-J.** (2013). Pseudogenes: Pseudo or Real Functional Elements? *J. Genet. Genomics* **40**: 171–177.
- Libault, M., Wan, J., Czechowski, T., Udvardi, M., et Stacey, G.** (2007). Identification of 118 *Arabidopsis* transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plant-defense elicitor. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **20**: 900–911.
- Lindeberg, M., Cunnac, S., et Collmer, A.** (2012). *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in endless arguments. *Trends Microbiol.* **20**: 199–208.
- Links, M.G., Holub, E., Jiang, R.H.Y., Sharpe, A.G., Hegedus, D., Beynon, E., Sillito, D., Clarke, W.E., Uzuhashi, S., et Borhan, M.H.** (2011). De novo sequence assembly of *Albugo candida* reveals a small genome relative to other biotrophic oomycetes. *BMC Genomics* **12**: 503.
- Lorang, J.M., Sweat, T. a, et Wolpert, T.J.** (2007). Plant disease susceptibility conferred by a “resistance” gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 14861–14866.
- Louarn, J., Carbonne, F., Delavault, P., Bécard, G., et Rochange, S.** (2012). Reduced germination of *Orobanche cumana* seeds in the presence of Arbuscular Mycorrhizal fungi or their exudates. *PLoS One* **7**: e49273.
- Macho, A.P. et al.** (2014). A bacterial tyrosine phosphatase inhibits plant pattern recognition receptor activation. *Science* **343**: 1509–1512.
- Macho, A.P. et Zipfel, C.** (2014). Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Mol. Cell* **54**: 263–272.
- Mak, A.N., Bradley, P., Cernadas, R.A., Bogdanove, A.J., et Stoddard, B.L.** (2012). The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science* **335**: 716–719.
- Malinovsky, F.G., Fangel, J.U., et Willats, W.G.T.** (2014). The role of the cell wall in plant immunity. *Front. Plant Sci.* **5**: 178.
- Marois, E., Van den Ackerveken, G., et Bonas, U.** (2002). The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **15**: 637–646.
- Masirevic, S., et Gulya, T. J.** (1992). *Sclerotinia* and *Phomopsis* — two devastating sunflower pathogens. *Field Crops Research*, **30**: 271-300.

- McDonald, B. a et Linde, C.** (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **40**: 349–79.
- McLachlan, D. H., Kopischke, M., & Robatzek, S. (2014). Gate control: guard cell regulation by microbial stress. *New Phytologist* **203**: 1049-1063.
- Mestre, P., Piron, M.-C., et Merdinoglu, D.** (2012). Identification of effector genes from the phytopathogenic Oomycete *Plasmopara viticola* through the analysis of gene expression in germinated zoospores. *Fungal Biol.* **116**: 825–835.
- Michelmore, R.W. et Meyers, B.C.** (1998). Selection and a Birth-and-Death Process Clusters of Resistance Genes in Plants Evolve by Divergent Selection and a Birth-and-Death Process. 1113–1130.
- Micic, Z., Hahn, V., Bauer, E., Melchinger, a E., Knapp, S.J., Tang, S., et Schön, C.C.** (2005). Identification and validation of QTL for *Sclerotinia* midstalk rot resistance in sunflower by selective genotyping. *Theor. Appl. Genet.* **111**: 233–242.
- Misas-Villamil, J.C. et van der Hoorn, R. a L.** (2008). Enzyme-inhibitor interactions at the plant-pathogen interface. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**: 380–388.
- Moinard, J., Mestries, E., Penaud, A., Pinochet, X., Tourvieille de Labrouhe, D., Vear, F., Tardin, M.-C., Pauchet, I. et Eychenne, N.** (2006). An overview of sunflower downy mildew. *Phytoma—La Défense des Végétaux*, **589**: 34–38.
- Montarry, J., Andrivon, D., Glais, I., Corbiere, R., Mialdea, G., et Delmotte, F.** (2010). Microsatellite markers reveal two admixed genetic groups and an ongoing displacement within the French population of the invasive plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Mol. Ecol.* **19**: 1965–1977.
- Montarry, J., Corbiere, R., Lesueur, S., Glais, I., et Andrivon, D.** (2006). Does selection by resistant hosts trigger local adaptation in plant-pathogen systems? *J. Evol. Biol.* **19**: 522–531.
- Morris, P., Bone, E., et Tyler, B.** (1998). Chemotropic and contact responses of *phytophthora sojae* hyphae to soybean isoflavonoids and artificial substrates. *Plant Physiol.* **117**: 1171–1178.
- Moscou, M. J., & Bogdanove, A. J.** (2009). A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* **326**: 1501-1501.
- Moury, B., Janzac, B., Ruellan, Y., Simon, V., Ben Khalifa, M., Fakhfakh, H., Fabre, F., et Palloix, A.** (2014). Interaction patterns between potato virus Y and eIF4E-mediated recessive resistance in the Solanaceae. *J. Virol.* **88**: 9799–9807.
- Mucyn, T.S., Clemente, A., Andriotis, V.M.E., Balmuth, A.L., Oldroyd, G.E.D., Staskawicz, B.J., et Rathjen, J.P.** (2006). The tomato NBARC-LRR protein Prf interacts with Pto kinase in vivo to regulate specific plant immunity. *Plant Cell* **18**: 2792–2806.

- Mundt, C.C., Cowger, C., et Garrett, K.A.** (2002). Relevance of integrated disease management to resistance durability **124**: 245–252.
- Nagy, E.D. et Bennetzen, J.L.** (2008). Pathogen corruption and site-directed recombination at a plant disease resistance gene cluster. *Genome Res.* **18**: 1918–1923.
- Neafsey, D.E. et al.** (2010). Population genomic sequencing of *Coccidioides* fungi reveals recent hybridization and transposon control. *Genome Res.* **20**: 938–946.
- Oh, H.-S., Kvitko, B.H., Morello, J.E., et Collmer, A.** (2007). *Pseudomonas syringae* lytic transglycosylases coregulated with the type III secretion system contribute to the translocation of effector proteins into plant cells. *J. Bacteriol.* **189**: 8277–8289.
- Okazaki, S., Kaneko, T., Sato, S., et Saeki, K.** (2013). Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 17131–17136.
- Pais, M., Win, J., Yoshida, K., Etherington, G.J., Cano, L.M., Raffaele, S., Banfield, M.J., Jones, A., Kamoun, S., et Go Saunders, D.** (2013). From pathogen genomes to host plant processes: the power of plant parasitic oomycetes. *Genome Biol.* **14**: 211.
- Palloix, a, Ayme, V., et Moury, B.** (2009). Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytol.* **183**: 190–199.
- Pariaud, B., Ravigné, V., Halkett, F., Goyeau, H., Carlier, J., et Lannou, C.** (2009). Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathol.* **58**: 409–424.
- Parker, C.** (2009). Observations on the current status of *Orobanche* and *Striga* problems worldwide. *Pest Manag. Sci.* **65**: 453–459.
- Parlevliet, J.E.** (2002). Durability of resistance against fungal , bacterial and viral pathogens ; present situation. *Am. Potato J.*: 147–156.
- Petre, B. et Kamoun, S.** (2014). How Do Filamentous Pathogens Deliver Effector Proteins into Plant Cells? *PLoS Biol.* **12**: e1001801.
- Pieterse, C.M.J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., et Van Wees, S.C.M.** (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**: 489–521.
- Pieterse, C.M.J. et Van Loon, L.C.** (2004). NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 456–464.
- Pink, D.A.C.** (2002). Strategies using genes for non-durable disease resistance. 227–236.
- Ponchet, M., Panabières, F., Milat M-L, Mikes, V., Montillet, J.L., Suty, L., Triantaphylides, C., Tirilly, Y., et Blein, J.P.** (1999). Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications? *Cell. Mol. Life Sci.* **56**: 1020–1047.

- Purugganan, M.D. et Fuller, D.Q.** (2009). The nature of selection during plant domestication. *Nature* **457**: 843–848.
- Quenouille, J., Paulhiac, E., Moury, B., et Palloix, a** (2014). Quantitative trait loci from the host genetic background modulate the durability of a resistance gene: a rational basis for sustainable resistance breeding in plants. *Heredity (Edinb)*. **112**: 579–587.
- Qutob, D. et al.** (2006). Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-like proteins. *Plant Cell* **18**: 3721–3744.
- Radwan, O., Bouzidi, M.F., et Mouzeyar, S.** (2011). Molecular characterization of two types of resistance in sunflower to *Plasmopara halstedii*, the causal agent of downy mildew. *Phytopathology* **101**: 970–979.
- Radwan, O., Bouzidi, M.F., Nicolas, P., et Mouzeyar, S.** (2004). Development of PCR markers for the PI5/PI8 locus for resistance to *Plasmopara halstedii* in sunflower, *Helianthus annuus* L. from complete CC-NBS-LRR sequences. *Theor. Appl. Genet.* **109**: 176–185.
- Radwan, O., Bouzidi, M.F., Vear, F., Philippon, J., De Labrouhe, D.T., Nicolas, P., et Mouzeyar, S.** (2003). Identification of non-TIR-NBS-LRR markers linked to the PI5/ PI8 locus for resistance to downy mildew in sunflower. *Theor. Appl. Genet.* **106**: 1438–1446.
- Radwan, O., Gandhi, S., Heesacker, A., Whitaker, B., Taylor, C., Plocik, A., Kesseli, R., Kozik, A., Michelmore, R.W., et Knapp, S.J.** (2008). Genetic diversity and genomic distribution of homologs encoding NBS-LRR disease resistance proteins in sunflower. *Mol. Genet. Genomics* **280**: 111–125.
- Radwan, O., Mouzeyar, S., Venisse, J.S., Nicolas, P., et Bouzidi, M.F.** (2005). Resistance of sunflower to the biotrophic oomycete *Plasmopara halstedii* is associated with a delayed hypersensitive response within the hypocotyls. *J. Exp. Bot.* **56**: 2683–2693.
- 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., et Beynon, J.L.** (2005). Differential recognition of highly divergent downy mildew avirulence gene alleles by RPP1 resistance genes from two *Arabidopsis* lines. *Plant Cell* **17**: 1839–1850.
- Reiss, K., Kirchner, E., Gijzen, M., Zocher, G., Löffelhardt, B., Nürnberger, T., Stehle, T., et Brunner, F.** (2011). Structural and phylogenetic analyses of the GP42 transglutaminase from *Phytophthora sojae* reveal an evolutionary relationship between oomycetes and marine *Vibrio* bacteria. *J. Biol. Chem.* **286**: 42585–42593.
- Rengel, D. et al.** (2012). A gene-phenotype network based on genetic variability for drought responses reveals key physiological processes in controlled and natural environments. *PLoS One* **7**: e45249.
- Rietman, H., Bijsterbosch, G., Cano, L.M., Lee, H.-R., Vossen, J.H., Jacobsen, E., Visser, R.G.F., Kamoun, S., et Vleeshouwers, V.G. a a** (2012). Qualitative and quantitative late blight resistance in the potato cultivar Sarpo Mira is determined by the perception of five distinct RXLR effectors. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **25**: 910–919.

- Robert-Seilaniantz, A., Shan, L., Zhou, J.-M., et Tang, X.** (2006). The *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 type III effector HopF2 has a putative myristoylation site required for its avirulence and virulence functions. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **19**: 130–138.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X., & Rozas, R.** (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, **19**: 2496–2497.
- Rose, J.K.C., Braam, J., Fry, S.C., et Nishitani, K.** (2002). The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol.* **43**: 1421–1435.
- Roux, F., Voisin, D., Badet, T., Balagué, C., Barlet, X., Huard-Chauveau, C., Roby, D., et Raffaele, S.** (2014). Resistance to phytopathogens e tutti quanti: placing plant quantitative disease resistance on the map. *Mol. Plant Pathol.* **15**: 427–432.
- Rovenich, H., Boshoven, J.C., et Thomma, B.P.** (2014). Filamentous pathogen effector functions: of pathogens, hosts and microbiomes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **20C**: 96–103.
- Sánchez-Vallet, A., Saleem-Batcha, R., Kombrink, A., Hansen, G., Valkenburg, D.-J., Thomma, B.P., et Mesters, J.R.** (2013). Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptor for chitin binding through intrachain LysM dimerization. *Elife* **2**: e00790.
- Schorneck, S., van Damme, M., Bozkurt, T.O., Cano, L.M., Smoker, M., Thines, M., Gaulin, E., Kamoun, S., et Huitema, E.** (2010). Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 17421–17426.
- Seassau, C., Dechamp-Guillaume, G., Mestries, E., et Debaeke, P.** (2012). Low plant density can reduce sunflower premature ripening caused by *Phoma macdonaldii*. *Eur. J. Agron.* **43**: 185–193.
- Seassau, C., Dechamp-Guillaume, G., Mestries, E., et Debaeke, P.** (2010). Nitrogen and water management can limit premature ripening of sunflower induced by *Phoma macdonaldii*. *F. Crop. Res.* **115**: 99–106.
- Shan, W., Cao, M., Leung, D., et Tyler, B.M.** (2004). The *Avr1b* locus of *Phytophthora sojae* encodes an elicitor and a regulator required for avirulence on soybean plants carrying resistance gene *Rps1b*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **17**: 394–403.
- Sinha, D., Gupta, M.K., Patel, H.K., Ranjan, A., et Sonti, R. V** (2013). Cell wall degrading enzyme induced rice innate immune responses are suppressed by the type 3 secretion system effectors *XopN*, *XopQ*, *XopX* and *XopZ* of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *PLoS One* **8**: e75867.
- Stam, R., Howden, A.J.M., Delgado-Cerezo, M., M M Amaro, T.M., Motion, G.B., Pham, J., et Huitema, E.** (2013a). Characterization of cell death inducing *Phytophthora capsici* CRN effectors suggests diverse activities in the host nucleus. *Front. Plant Sci.* **4**: 387.

- Stam, R., Jupe, J., Howden, A.J.M., Morris, J. a, Boevink, P.C., Hedley, P.E., et Huitema, E.** (2013b). Identification and Characterisation CRN Effectors in *Phytophthora capsici* Shows Modularity and Functional Diversity. *PLoS One* **8**: e59517.
- Stassen, J.H.M., Seidl, M.F., Vergeer, P.I.M.W.J., Nijman, I.J., Snel, B., Cuppen, E., et Ackerveken, G.V.A.N.D.E.N.** (2012). Effector identification in the lettuce downy mildew *Bremia lactucae* by massively parallel transcriptome sequencing. *Mol. Plant Pathol.* **13**: 719-731.
- Stukenbrock, E.H. et Bataillon, T.** (2012). A population genomics perspective on the emergence and adaptation of new plant pathogens in agro-ecosystems. *PLoS Pathog.* **8**: e1002893.
- Sun, W., Dunning, F.M., Pfund, C., Weingarten, R., et Bent, A.F.** (2006). Within-species flagellin polymorphism in *Xanthomonas campestris* pv *campestris* and its impact on elicitation of *Arabidopsis* FLAGELLIN SENSING2-dependent defenses. *Plant Cell* **18**: 764–779.
- Tajima, F.** (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**: 585-595.
- Teh, O.-K. et Hofius, D.** (2014). Membrane trafficking and autophagy in pathogen-triggered cell death and immunity. *J. Exp. Bot.* **65**: 1297–1312.
- Thines, M.** (2014). Phylogeny and evolution of plant pathogenic oomycetes—a global overview. *Eur. J. Plant Pathol.* **138**: 431–447.
- Thines, M. et Kamoun, S.** (2010). Oomycete-plant coevolution: recent advances and future prospects. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**: 427–433.
- Thomas, H., Sauerborn, J., et Mu, D.** (1998). The Potential of *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras* as a Biological Control Agent for *Orobanche cumana* in Sunflower. **48**: 41–48.
- Thrall, P.H. et Burdon, J.J.** (2003). Evolution of virulence in a plant host-pathogen metapopulation. *Science* **299**: 1735–1737.
- Tian, M., Huitema, E., Da Cunha, L., Torto-Alalibo, T., et Kamoun, S.** (2004). A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. *J. Biol. Chem.* **279**: 26370–26377.
- Tian, M., Win, J., Savory, E., Burkhardt, A., Held, M., Brandizzi, F., et Day, B.** (2011). 454 Genome sequencing of *Pseudoperonospora cubensis* reveals effector proteins with a QXLR translocation motif. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **24**: 543–553.
- GULYA, T.J.** (1998). Gulya ISA symposium 1998 Proposal for Standardized nomenclature and Identification of races of *Plasmopara halstedii*.
- Torto, T. a, Li, S., Styer, A., Huitema, E., Testa, A., Gow, N. a R., van West, P., et Kamoun, S.** (2003). EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora*. *Genome Res.* **13**: 1675–1685.

- Torto-Alalibo, T., Collmer, C.W., Lindeberg, M., Bird, D., Collmer, A., et Tyler, B.M.** (2009). Common and contrasting themes in host cell-targeted effectors from bacterial, fungal, oomycete and nematode plant symbionts described using the Gene Ontology. *BMC Microbiol.* **9 Suppl 1**: S3.
- Tourvieille de Labrouhe, D., Serre, F., Walser, P., Roche, S., et Vear, F.** (2008). Quantitative resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus*). *Euphytica* **164**: 433–444.
- Tourvieille de Labrouhe, D., Walser, P., Joliovot, D., Roche, S., Serre, F., Delmotte, F., Bordat, A., Godiard, L., Vincourt, P. et Vear, F.** (2012) Proposal for improvement of sunflower downy mildew race nomenclature. In: *Proceedings of the 18th International Sunflower Conference, Mar del Plata, Argentina, March 2012*, pp. 322–327. Paris: International Sunflower Association.
- Tyler, B.M. et al.** (2006). Phytophthora genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* **313**: 1261–1266.
- Tyler, B.M., Wu, M., Wang, J., Cheung, W., Morris, P.F., Tyler, B.M., Wu, M., Wang, J., Cheung, W., et Morris, P.F.** (1996). Chemotactic Preferences and Strain Variation in the Response of Phytophthora sojae Zoospores to Host Isoflavones. These include: Chemotactic Preferences and Strain Variation in the Response of Phytophthora sojae Zoospores to Host Isoflavones. *Applied and environmental microbiology*, **62**: 2811-2817.
- Vear, F., Serre, F., Jouan-Dufournel, I., Bert, P.F., Roche, S., Walser, P., Tourvieille de Labrouhe, D., et Vincourt, P.** (2008). Inheritance of quantitative resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica* **164**: 561–570.
- Van de Velde, W. et al.** (2010). Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science* **327**: 1122–1126.
- Vera Cruz, C.M., Bai, J., Ona, I., Leung, H., Nelson, R.J., Mew, T.W., et Leach, J.E.** (2000). Predicting durability of a disease resistance gene based on an assessment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 13500–13505.
- Vincourt, P., As-Sadi, F., Bordat, A., Langlade, N.B., Gouzy, J., Pouilly, N., Lippi, Y., Serre, F., Godiard, L., Tourvieille de Labrouhe, D., et Vear, F.** (2012). Consensus mapping of major resistance genes and independent QTL for quantitative resistance to sunflower downy mildew. *Theor. Appl. Genet.* **125**: 909-920.
- Wawra, S., Agacan, M., Boddey, J. a, Davidson, I., Gachon, C.M.M., Zanda, M., Grouffaud, S., Whisson, S.C., Birch, P.R.J., Porter, A.J., et van West, P.** (2012a). Avirulence protein 3a (AVR3a) from the potato pathogen *Phytophthora infestans* forms homodimers through its predicted translocation region and does not specifically bind phospholipids. *J. Biol. Chem.* **287**: 38101–38109.
- Wawra, S., Bain, J., Durward, E., Bruijn, I. De, Minor, K.L., Matena, A., et Löbach, L.** (2012b). *Saprolegnia parasitica* translocates specifically into fish cells in a tyrosine-O-sulphate – dependent manner. *PNAS* **169**: 2096–2101.

- Wawra, S., Djamei, A., Albert, I., Nürnberger, T., Kahmann, R., et van West, P.** (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. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **26**: 528–536.
- Whisson, S.C. et al.** (2007). A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* **450**: 115–118.
- Whiston, E. et Taylor, J.W.** (2014). Genomics in Coccidioides: insights into evolution, ecology, and pathogenesis. *Med. Mycol.* **52**: 149–155.
- Wicker, T., Yahiaoui, N., et Keller, B.** (2007). Illegitimate recombination is a major evolutionary mechanism for initiating size variation in plant resistance genes. *Plant J.* **51**: 631–641.
- Wolfe, M.S.** (1985). The current status and prospects of multiline cultivars and variety mixtures for disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol* **23**: 251–273.
- Wright, D. a, Li, T., Yang, B., et Spalding, M.H.** (2014). TALEN-mediated genome editing: prospects and perspectives. *Biochem. J.* **462**: 15–24.
- Wu, C.-H., Yan, H.-Z., Liu, L.-F., et Liou, R.-F.** (2008). Functional characterization of a gene family encoding Polygalacturonases in *Phytophthora parasitica*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **21**: 480–489.
- Yan, H.-Z. et Liou, R.-F.** (2006). Selection of internal control genes for real-time quantitative RT-PCR assays in the oomycete plant pathogen *Phytophthora parasitica*. *Fungal Genet. Biol.* **43**: 430–438.
- Yi, M. et Valent, B.** (2013). Communication between filamentous pathogens and plants at the biotrophic interface. *Annu. Rev. Phytopathol.* **51**: 587–611.
- Yuan, M., Chu, Z., Li, X., Xu, C., et Wang, S.** (2010). The bacterial pathogen *Xanthomonas oryzae* overcomes rice defenses by regulating host copper redistribution. *Plant Cell* **22**: 3164–3176.
- Yue, M. et Schifferli, D.M.** (2014). Allelic variation in *Salmonella*: an underappreciated driver of adaptation and virulence. *Front. Microbiol.* **4**: 419.
- Zhang, J. et al.** (2007). A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host Microbe* **1**: 175–185.
- Zhou, J., Yu, J.-Q., et Chen, Z.** (2014). The perplexing role of autophagy in plant innate immune responses. *Mol. Plant Pathol.* **15**: 637–45.
- Zipfel, C.** (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol.* **35**: 345–351.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D.G., Felix, G., et Boller, T.** (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* **428**: 764–767.

Remerciements:

Je suis heureux de pouvoir remercier Patrick Vincourt et Laurence Godiard qui m'ont fait confiance durant mes stages de M1, M2R et enfin en thèse. Merci Laurence d'avoir pris le temps de discuter pour décider ensemble des orientations de ma thèse. Patrick, merci pour tout le temps que tu as passé dans les différentes analyses statistiques mais pas que. Je garderais en mémoire les discussions scientifiques que nous avons pu avoir, surtout durant les derniers mois de rédaction.

Je remercie également Judith Burstin, Gregoire Aubert, Françoise Jacquin, David Wendehenne, Amandine Bordat, qui m'ont accueillis et encadré dans leur équipe recherche, au cours des différents stages que j'ai pu faire lors de mon cursus universitaire.

Merci aux membres du jury et en particulier aux rapporteurs Isabelle Fudal et Sébastien Duplessis ainsi qu'aux examinateurs, Sylvain Raffaele et Franck Panabières. J'aimerais aussi remercier Christophe Roux pour son rôle en tant que directeur du master 2 recherche que j'ai suivi à l'université Paul Sabatier de Toulouse, et qui a accepté de présider le jury.

Merci aux membres de mon comité de thèse, Pere Mestre, Emanuelle Mestries, Laurent Deslandes, de m'avoir accompagné durant ces trois ans.

Merci à l'ensemble de l'équipe « tournesol », Falah pour le passage de flambeau, Gwenaëlle, Elena, Johann, Baptiste, Marie Claude, Stéphane, Didier, Margaux, Luis, Nicolas, Nicolas, Nicolas et Fanny, ainsi que tous les stagiaires pour leur soutien au quotidien mais surtout pour ces bons moments de franche rigolade, soirées bien animées avec piscine, pause de 10h avec gâteaux à volonté. J'aimerais aussi remercier Yves Martinez pour ces heures passées aux microscopes électroniques.

J'ai aussi une pensée pour tous les membres et amis des clubs ADAS apiculture et escalade, Jérôme, Xavier, Olivier, Romain, Lolita, Sylvain, David, Guillaume, Émilie, Patrick, Ibouniamine, Étienne et Étienne,....

Un grand merci pour tous mes colloqs, Sylvain, Bia, Yumi, Adrien, Thoma, et Erell, qui ont eu bien du mérite à supporter mes répétitions de séminaires et qui auront probablement à en subir d'autres lors de la préparation de ma soutenance. Courage les amis c'est bientôt fini, je vais pouvoir revenir en force pour grimper, volleyer, randonner, cuisiner et faire la fête

Je ne peux bien entendu pas oublier les collègues et amis du M2R, Alice et Sarah, et surtout Maël et Yacine pour ces longues journées de bibliographie et ces répétitions à la bibliothèque, ces weeks end à Targassonne et vive machete !!

Je finirais par tous les amis et famille que je n'ai pas encore cités. Mes parents bien sûr qui m'ont toujours soutenus depuis 27 ans (et oui le temps passe), les dijonnais (qui ne le sont plus forcément) Bj, Benj, Fx, Pauline, Sophie, Nico, Michel, Fred, Raf, Djé, Marc, Jean Jacques, Béa.... Enfin à Hermine, un grand merci pour ton soutien malgré la distance et les choix pas toujours faciles.

Abstract:

Plasmopara halstedii, the plant pathogen oomycete causing downy mildew of sunflower, is responsible for important agronomic losses. To fight against this pathogen, resistance genes exist (*PI* genes). Nevertheless, the last 20 years, an increase of *P. halstedii* isolates breaking down resistance genes used to protect sunflower was observed. Within pathosystems, plant-pathogen interaction issues depend largely on the coevolution between (i) the plant resistance proteins, and (ii) proteins secreted by pathogens called effectors, whose role is to modify the physiology of the host to promote infection. In this thesis we have implemented different approaches (microscopy, genomics, and molecular biology) to study the impact of effectors in the virulence of *P. halstedii*.

AUTEUR : Quentin GASCUEL

TITRE : Identification, variabilité, et reconnaissance *in planta* des effecteurs de pathogénicité de l'oomycète *Plasmopara halstedii*, l'agent du mildiou du tournesol.

DIRECTEURS DE THESE : Laurence GODIARD et Patrick VINCOURT

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Salle Marc RIDET-Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM)-16 Décembre 2014

RESUME:

Plasmopara halstedii, l'oomycète phytopathogène à l'origine du mildiou chez le tournesol, est responsable de pertes agronomiques importantes. Pour lutter contre cet agent pathogène, des moyens de luttés génétiques existent sous forme de gènes de résistance (gènes *PI*). Cependant, on observe ces 20 dernières années une recrudescence des isolats de *P. halstedii* contournant les gènes de résistance du tournesol utilisés en culture. Au sein des pathosystèmes, l'issue d'une interaction plante-agent pathogène dépend en grande partie de la co-évolution entre, (i) les protéines de résistance de la plante, et (ii) des protéines sécrétées de l'agent pathogène appelées effecteurs et dont le rôle est de modifier la physiologie de l'hôte pour favoriser l'infection. Au cours de cette thèse nous avons mis en place différentes approches de microscopie, de génomique et de biologie moléculaire pour étudier l'impact des effecteurs de *P. halstedii* dans sa virulence.

MOTS-CLES : *Plasmopara halstedii* ; *Helianthus annuus*; oomycète biotrophe obligatoire; effecteur ; virulence.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Interactions plantes-microorganismes

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes (LIPM), INRA, 24 Chemin de Borde Rouge, Auzeville, CS 52627, 31326 Castanet Tolosan cedex