



HAL
open science

Etude des mécanismes de régulation du métabolisme secondaire chez *Botrytis cinerea*.

Antoine Porquier

► **To cite this version:**

Antoine Porquier. Etude des mécanismes de régulation du métabolisme secondaire chez *Botrytis cinerea*.. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris-Saclay, 2016. Français. NNT : 2016SACLS480 . tel-01756394v1

HAL Id: tel-01756394

<https://theses.hal.science/tel-01756394v1>

Submitted on 2 Apr 2018 (v1), last revised 14 May 2018 (v2)

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

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

NNT : 2016SACLS480

THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,
préparée à l'INRA

ÉCOLE DOCTORALE N° 567
Sciences du Végétal : du Gène à l'Ecosystème

Spécialité de doctorat (Biologie)

Par

Antoine Porquier

**Etude des mécanismes de régulation
du métabolisme secondaire chez
Botrytis cinerea, l'agent de la pourriture grise.**

Thèse présentée et soutenue à Thiverval-Grignon, le 14 Décembre 2016.

Composition du Jury :

Mme Shykoff Jacqui	DR, CNRS/Université Paris-Sud	Présidente du jury
Mme Chapeland-Leclerc Florence	MCF, Université Paris Descartes	Rapportrice
M. Simoneau Philippe	Pr, Université d'Angers	Rapporteur
Mme Malagnac Fabienne	Pr, Université Paris-Sud	Examinatrice
M. van Kan Jan	AP, Université de Wageningen	Examinateur
Mme Viaud Muriel	CR, INRA (Thiverval-Grignon)	Directrice de thèse

Remerciements

Quoi, déjà ? A mon arrivée dans l'unité BIOGER, les « vieux » thésards qui étaient dans leur 3^{ème} année me disaient « tu verras, trois ans, ça passe vite ». Je me rends aujourd'hui compte qu'ils avaient raison. J'ai également entendu des choses comme « une thèse, c'est 90% d'échec et 10% de réussite ». Il apparaît que dans mon cas ce n'était pas faux non plus. Néanmoins, les trois années que j'ai passées au sein de l'équipe MSN-BOT ont été extraordinaires pour moi. Je m'y suis complètement épanoui tout en ayant l'impression d'avoir évolué. Certes, si c'était à refaire, je m'y prendrai différemment, mais j'imagine que c'est ce qu'on appelle acquérir de l'expérience.

Mon projet de thèse n'a clairement pas été quelque chose d'uniquement personnel et c'est avec plaisir que je remercie ici les personnes qui ont participé de près ou de loin à son accomplissement. Tout a commencé avec ceux qui sont venus m'aider à préparer le concours de l'école doctorale. Je ne les connaissais pas et leurs critiques ont pourtant fait changer ma vie. Un grand merci à eux pour ce geste. Je voudrais ensuite remercier l'ensemble du personnel de BIOGER. J'ai bien entendu plus interagi avec certains qu'avec d'autres mais tous ont joué un rôle dans mon quotidien Biogérois. Merci notamment aux services communs (administration, serres et laverie) qui sont essentiels dans la vie de l'unité. Je voudrais aussi remercier les membres de l'équipe Lepto pour ne pas m'avoir laissé seul et pour m'avoir pris sous leur aile pour le congrès d'Asilomar. Merci à Richard O'Connell et Marc-Henri Lebrun mais aussi Jamal Ouazzani et Emilie Adelin pour nos échanges dans le cadre du groupe de travail sur le métabolisme secondaire. Merci également à Jean-Félix Dallery pour son implication dans ce groupe de travail mais aussi pour avoir mis en place le protocole de Southern blot par DIG et pour m'avoir fourni le matériel nécessaire pour cette manipe. Merci à Jessica Soyer pour les échanges relatifs au projet MAINÉseq (sur lequel je me suis cassé quelques dents) ainsi que pour ses critiques sur une partie de ce manuscrit. Plusieurs expériences loin du laboratoire m'ont permises de partager des moments inoubliables avec plusieurs membres de BIOGER. Je pense notamment à Clémence Plissoneau avec qui j'ai participé à plusieurs congrès qui m'ont laissé des souvenirs joyeux. Merci à Johann Confais pour les « ronds » qu'il a mis dans le babyfoot d'Aussois ! J'ai pratiqué avec lui des heures de fous rires qui m'ont permis de maintenir une

sangle abdominale solide pour compenser les excès de ce congrès ! Merci également à Yohann Petit, pour les moments passés ensemble et pour m'avoir si bien accueilli lors de l'ECFG. Un petit « Os à moelle » s'imposera pour fêter la fin de ce travail ! Merci également à Jaafar Kilani pour nos diverses conversations notamment sur la photo. Comment ne pas remercier Guillaume Robin pour ses talents d'imitation (Eddy Murphy à 80 ans), ses blagues et nos multiples conversations sur nos fils. La collaboration que l'équipe MSN-BOT entretient avec celle de Paul Tudzynski de Münster a été importante dans mon parcours. Je voudrais donc remercier Paul Tudzynski pour m'avoir accueilli pour une visite à Münster l'été dernier ainsi qu'aux membres du laboratoire pour les nombreux échanges. Un merci tout particulier à Julia Schumacher qui m'a donné l'opportunité de participer à la publication de mon premier article de recherche mais aussi pour m'avoir apporté énormément sur le plan professionnel à travers des discussions enrichissantes. Je remercie naturellement les personnes qui ont partagé mon quotidien au labo. Je pense notamment à Delphine Paumier, Hélène Batina, Ghislain Delestre, Lydie Kerdraon mais aussi et surtout Gwilherm Gazeau aka Gwigwi et Romain Valade avec qui j'ai plaisir à partager ces moments d'amitié en dehors des murs de Grignon. Un petit mot d'encouragement aussi aux nouveaux thésards (Alex Mercier, Colin Clairet) que j'envie en raison des trois futures années qu'ils vont passer dans cette unité. Non Céline je ne t'oublie pas ! Non, jamais. Merci à Mathilde Berton pour ces moments de rigolade et de chant en ... muscu. J'espère sincèrement que nos clips resteront confidentiels. J'en viens maintenant aux membres de l'équipe MSN-BOT. Vous avez fait de ma vie quotidienne au laboratoire un plaisir et j'ai adoré partagé ces moments autant professionnels que personnels avec vous. Merci ainsi à Isabelle Lebrun pour l'ensemble de ces services et pour m'avoir raccompagné quelques fois (tant bien que mal...) à Houdan. Merci à Pascal Le Pêcheur pour ce qu'il a apporté à mon travail mais aussi pour toutes ses petites attentions. Merci à Richard Laugé pour ses remarques pertinentes sur mon projet mais aussi pour le doudou co-préféré de Nino. Merci à Jean-Marc Pradier pour les débats scientifiques, les corrections, les manipes mais aussi pour m'avoir fait découvrir le mahlabaya. Merci également à Bérengère Dalmais pour m'avoir formé à plusieurs techniques, pour sa contribution à ce travail, mais aussi pour son sourire quotidien. Merci aussi pour ces moments extra-professionnels : sport (enfin si on peut appeler ça du sport à ton niveau), bouffes, jeux divers de jardin et autres. Un énorme merci à Adeline Simon pour le temps qu'elle a

passé à répondre à mes nombreuses interrogations, pour ses conseils techniques notamment sur le simple hybride mais aussi pour son soutien bioinformatique indispensable et si efficace. Elle a également subi mes remarques culinaires relatives au Thermomix possédant elle-même cette centrifugeuse magique. Un merci tout particulier à Guillaume Morgant avec qui j'ai naturellement commencé à travailler et qui a amplement participé à ce travail de thèse. J'ai pris plaisir à te voir évoluer et je suis persuadé que tu vas continuer dans cette voie pour apporter à l'équipe. Notre relation ne s'est pas limitée au cadre professionnel alors merci à toi d'être devenu un ami avec qui plaisir à partager ces nombreux moments (muscu, basket, tennis, bar, barbec à l'exception de la finale de l'Euro, déménagements,...). Merci finalement à Muriel Viaud sans qui je n'aurais pas pu effectuer ce projet. Tu m'as fait confiance après un simple entretien téléphonique durant lequel j'avais déjà pu ressentir ta sympathie. J'ai adoré travailler avec toi en raison de ta personnalité profondément humaine et diplomate (oui même pendant les corrections), mais aussi parce que tu es extrêmement compétente. Tu m'as apporté énormément et j'espère sincèrement que de nombreux thésards auront la chance de vivre ce que j'ai vécu. Je retiendrais de toi une phrase inoubliable que tu m'as dite pendant que nous faisons le point sur la rédaction du Chapitre IV de ce manuscrit : « c'est vrai que ce n'est pas faux ». Je médite encore...

Je voudrais également remercier les membres de mon jury de thèse. J'ai appris au cours de ces trois années que le temps d'un scientifique est précieux alors merci de m'en accorder une partie. Merci ainsi à Fabienne Malagnac, Jacqui Shykoff et Jan van Kan d'avoir accepté d'être examinateur et à Florence Chapeland-Leclerc et Philippe Simoneau de jouer le rôle de rapporteur. Philippe a également participé à ma formation en me donnant quelques cours et en m'accueillant dans le cadre de mon stage de M2. J'en profite donc pour adresser un message de remerciement à l'équipe FungiSem qui a participé à l'obtention de ma position de thésard. Tout particulièrement, je tenais à citer Thomas Guillemette qui m'a fait découvrir le monde incroyable des champignons lors de ma 2^{ème} année de licence et qui a par la suite accepté de m'encadrer dans plusieurs projets. Je crois que la citation suivante s'applique à merveille à ce cas : « Enseigner, ce n'est pas remplir un bol, c'est allumer un feu. » (source confuse mais phrase intéressante). Thomas a également accepté de me conseiller dans le

cadre de mon projet en faisant partie de mon comité de thèse avec Isabelle Fudal et Stéphane Mann. Merci bien sûr à eux pour ces moments qu'ils m'ont attribués ainsi que pour leurs critiques. Merci aussi à Isabelle pour la conduite du projet MAINEseq et à Stéphane pour sa collaboration dans le cadre du travail sur *Bcpks7*. Même si la chimie semble parfois inaccessible, ton expertise et tes explications lors de nos longues conversations téléphoniques m'ont beaucoup apporté.

Je remercie naturellement ma famille qui a toujours été là pour moi et qui m'a soutenu dans tous les projets que j'ai pu entreprendre. Etant devenu papa, je me rends compte que me laisser partir à 13 ans pour me laisser vivre ma passion du basket n'a pas dû être chose facile. Néanmoins, ce parcours sportif qui vous a demandé tant de sacrifices m'a apporté énormément et a joué un rôle important pour ma construction personnelle. Je ne regrette rien. J'ai une pensée toute particulière pour mes sœurs, Hélène et Léa, qui représentent énormément pour moi. Merci à également à ma belle-famille qui m'a toujours accueilli à bras ouverts et avec qui j'ai toujours plaisir à partager des moments. Je ne pourrais oublier mon pote Bman qui m'a beaucoup apporté probablement sans même le savoir. Ton amitié est précieuse à mes yeux.

J'ai bien entendu gardé le meilleur pour la fin. Je voudrais te remercier du fond du cœur Monamou. Bien entendu, je ne veux pas ici raconter ma vie mais il faut que tu saches que je sais les sacrifices que tu as fait pour que je puisse effectuer ce projet de thèse mais aussi ceux que tu es prête à faire pour que je continue à poursuivre mon objectif de carrière scientifique. Tu représentes tout pour moi et ton soutien quotidien est une force. Finalement, je voudrais adresser un « coucou » à mon fils Nino qui sera, je l'espère, fier de son papa lorsqu'il lira peut-être ce manuscrit dans quelques années. Tu es incontestablement ma plus belle réussite. J'ai hâte que la petite ascospore qui germera au printemps colonise notre espace...

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	13
1. Les champignons : cause majeure des maladies des plantes	15
1.1. Le règne des champignons	15
1.2. Stratégies d'infection des champignons phytopathogènes	16
1.2.1. Les biotrophes	17
1.2.2. Les nécrotrophes.....	17
1.2.3. Les hémibiotrophes	18
1.3. Présentation de <i>Botrytis cinerea</i> , l'agent de la pourriture grise	19
1.3.1. Cycle de vie de <i>B. cinerea</i>	20
1.3.2. <i>Botrytis cinerea</i> : un modèle d'étude pour la nécrotrophie	23
1.3.3. Facteurs de virulence.....	24
1.3.3.1. Les enzymes de dégradation des parois végétales.....	24
1.3.3.2. L'induction d'un burst oxydatif.....	25
1.3.3.3. Les petites protéines phytotoxiques et les effecteurs.....	25
1.3.3.4. Les petits ARNs.....	26
1.3.3.5. Les métabolites secondaires	27
2. Le métabolisme secondaire.....	28
2.1. Les différents types de métabolites secondaires fongiques	29
2.1.1. Les polycétides (PK)	29
2.1.2. Les peptides non-ribosomiques (NRP).....	32
2.1.3. Les terpènes.....	34
2.1.4. Les alcaloïdes	36
2.1.5. Les composés hybrides.....	36
2.2. Utilisation et importance des métabolites secondaires fongiques pour l'Homme.....	37
2.3. Rôle des métabolites secondaires fongiques	38
2.3.1. Pouvoir anti-appétant.....	39
2.3.2. Activité anti-microbienne.....	39
2.3.3. Perturbation du quorum sensing.....	40
2.3.4. Acquisition du fer	41
2.3.5. Protection vis-à-vis de différents stress	42
2.3.6. Pouvoir pathogène et infection.....	43
2.3.6.1. Les toxines hôte-spécifiques.....	43
2.3.6.2. Les toxines non hôte-spécifiques.....	44
2.4. Agencement en clusters des gènes du métabolisme secondaire	45
3. La régulation du métabolisme secondaire fongique.....	47
3.1. L'implication des facteurs de transcriptions (FTs).....	48
3.1.1. Les FTs ont un rôle fondamental dans le contrôle de la transcription.....	48
3.1.2. Structure des FTs et présentation de différentes familles chez les champignons	51
3.1.2.1. Les FTs à DBD basique.....	51
3.1.2.1.1. Les FTs à glissière à leucine (PF00170).....	51
3.1.2.1.2. Les FTs bHLH (superfamille 47459)	53
3.1.2.1.3. Les FTs à doigts de zinc	54
3.1.2.1.4. Les FTs GATA (PF00320).....	55
3.1.2.1.5. Les FTs Zn(II) ₂ Cys ₆ (PF00172).....	55
3.1.2.1.6. Les FTs à domaine Fungal Trans (PF04082)	57
3.1.2.1.7. Les FTs C ₂ H ₂ (PF00096).....	58
3.1.3. Répertoires des FTs des champignons filamenteux et de <i>B. cinerea</i>	59
3.1.4. L'implication des FTs dans la régulation du métabolisme secondaire.....	62

3.1.4.1. Les FTs spécifiques	62
3.1.4.2. Les FTs globaux et les complexes multiprotéiques	64
3.2. La régulation chromatinienne	66
3.2.1. L'acétylation des histones	72
3.2.2. La méthylation des histones	73
3.2.3. L'interférence entre acétylation et méthylation des histones	75
3.2.4. La méthylation de l'ADN	75
3.2.5. Exemple de la formation d'hétérochromatine chez <i>Neurospora crassa</i>	76
3.2.6. Le remodelage de la chromatine comme mécanisme de régulation du métabolisme secondaire fongique	77
4. La régulation du métabolisme secondaire chez <i>B. cinerea</i>	78
5. Objectifs de mon projet de thèse	95

CHAPITRE I_REGULATION SPECIFIQUE DU CLUSTER DU BOTRYDIAL CHEZ *B. CINEREA* 99

Présentation de l'article 101

The botrydial biosynthetic gene cluster of *Botrytis cinerea* displays a bipartite genomic structure and is positively regulated by the putative Zn(II)₂Cys₆ transcription factor BcBot6..... 103

CHAPITRE II_REGULATION SPECIFIQUE DU CLUSTER DE L'ACIDE BOTCINIQUE CHEZ *B. CINEREA* 131

Introduction 133

Résultats 135

1. La région génomique du cluster BOA comporte une structure bipartite avec des portions A+T- riches et des éléments transposables (ETs) RIPés	135
1.1. Le cluster BOA est présent en un unique locus au sein du génome de B05.10.....	135
1.2. <i>Bcboa1-Bcboa13</i> sont co-régulés	138
1.3. Le cluster BOA est situé dans une région bipartite qui comporte des portions riches en A+T.....	140
1.4. Les régions A+T-riches contiennent des ETs.....	140
1.5. Les ETs présents au niveau de la région génomique du cluster BOA sont RIPés.....	141
2. Mise en évidence d'un régulateur spécifique du cluster BOA	142
2.1. Rôle putatif de BcBoa13, BcBoa1 et BcBoa15 dans l'expression des gènes <i>Bcboa</i>	142
2.2. Délétion de <i>Bcboa13</i> , <i>Bcboa1</i> et <i>Bcboa15</i>	145
2.3. BcBoa13 est le régulateur majeur du cluster BOA.....	146
2.4. Les délétions de <i>Bcboa13</i> , <i>Bcboa1</i> et <i>Bcboa15</i> n'affectent pas l'agressivité de B05.10	150
3. Caractérisation de BcBoa13	151
3.1. BcBoa13 est localisée dans le noyau.....	151
3.2. Analyse de l'interaction <i>in vivo</i> entre BcBoa13 et les promoteurs des gènes <i>Bcboa</i>	154
3.2.1. Recherche du motif de fixation de BcBoa13.....	154
3.2.2. Validation de l'importance de la région du pBcboa9 contenant le motif A* pour l'activation du gène	156
3.2.3. Analyse de l'interaction entre BcBoa13 et certains promoteurs putatifs cibles par simple hybride	158
3.2.3.1. Clonage des promoteurs d'intérêt.....	158
3.2.3.2. Clonage de BcBoa13	158

3.2.4. Test d'interaction directe entre BcBoa13 avec les différentes constructions d'ADN.....	160
4. Etude de l'interaction putative entre BcBoa13 et BcBoa1	161
5. Identification des régulateurs transcriptionnels agissant en amont de BcBot6 et BcBoa13....	162
5.1. Mise en place d'une approche par simple hybride	162
5.2. Identification d'un régulateur candidat des clusters BOT et BOA.....	163
5.3. Inactivation de Bcin08g02710.....	164
Discussion.....	165
1. Le cluster BOA est présent en un unique locus en position subtélomérique.....	165
2. Le cluster BOA est localisé au niveau d'une région génomique composée de régions A+T- riches résultant de copies d'ETs mutées par le RIP.....	166
3. <i>Bcboa15</i> et <i>Bcboa16</i> sont probablement des pseudogènes.....	167
4. BcBoa13 régule <i>Bcboa1-Bcboa12</i>	169
5. BcBoa13 est une protéine nucléaire	170
6. Recherche du rôle de BcBoa1	171
7. Intégration des résultats sur les régulateurs spécifiques et recherche de régulateurs transcriptionnels agissant en amont.....	173

CHAPITRE III_CARACTERISATION DE *BcPKS7* ET RECHERCHE DU METABOLITE PUTATIF ASSOCIE..... 179

Introduction 181

Résultats 183

1. Le cluster de gènes *PKS7*..... 183
 - 1.1. Délimitation du cluster de gènes 183
 - 1.2. Comparaison de l'environnement génomique de *PKS7* avec ceux des clusters BOT et BOA 189
2. Délétion de *BcPKS7* et phénotypage..... 189
3. Recherche et isolement d'un métabolite candidat 190

Discussion..... 194

1. Peu de métabolites issus de PKS-NRPS fongiques sont connus 194
2. Phénotype du $\Delta BcPKS7$ 194
3. Recherche et rôle du métabolite putativement produit par *BcPKS7*..... 195
4. Le cluster *PKS7* : distribution, composition et régulation..... 196

CHAPITRE IV_REGULATION CHROMATINIENNE DU METABOLISME SECONDAIRE CHEZ *B. CINEREA* 201

Introduction 203

Résultats 207

1. Les orthologues des gènes *dim-5*, *hpo* et *set-7* sont présents chez *B. cinerea*..... 207
2. *Bcdim-5*, *Bchp1* et *Bckmt6* sont dispensables au développement de B05.10 210
 - 2.1. Délétion de *Bcdim-5*..... 210
 - 2.2. Délétion de *Bchp1* 211
 - 2.3. Délétion de *Bckmt6*..... 212
3. L'expression des gènes du métabolisme secondaire semble affectée chez les $\Delta Bcdim-5$, $\Delta Bchp1$ et $\Delta Bckmt6$ 212

Discussion	216
1. La délétion de <i>Bcdim-5</i> , <i>Bchp1</i> et <i>Bckmt6</i> n'entraîne pas de modification du phénotype de B05.10.....	216
2. Δ <i>Bcdim-5</i> : différentes stratégies d'inactivation du gène conduisent à des phénotypes différents.....	217
3. La délétion de <i>Bcdim-5</i> et <i>Bchp1</i> affecterait l'expression des gènes du métabolisme secondaire.....	218
4. La formation d'hétérochromatine chez <i>B. cinerea</i> implique-t-elle une méthylation d'ADN via <i>BcDim-2</i> ?.....	221
5. <i>Bcpks7</i> est affecté chez le Δ <i>Bckmt6</i>	221

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES..... 225

1. Les clusters BOT et BOA sont régulés par des FTs spécifiques.....	227
2. Le cluster BOA est-il régulé par la protéine NmrA-like <i>BcBoa1</i> ?.....	229
3. Rôle des éléments transposables dans l'évolution et l'expression des clusters du métabolisme secondaire.....	230
4. Le métabolisme secondaire de B05.10 est-il régulé par la structure de la chromatine ?.....	231
5. Régulation du métabolisme secondaire par la voie de l'hétérochromatine impliquant <i>BcDim-5</i> et <i>BcHp1</i>	233
6. Régulation du métabolisme secondaire par la voie de l'hétérochromatine impliquant <i>BcKmt6</i>	234
7. Existe-t-il un phénomène de TPE chez <i>B. cinerea</i> ?.....	235
8. Recherche des métabolites produits par <i>B. cinerea</i>	236
9. Rôle biologique de BOT et BOA chez <i>B. cinerea</i>	238
10. Le métabolisme secondaire : une cible d'intérêt pour le contrôle des champignons.....	239

MATERIELS ET METHODES 241

BIBLIOGRAPHIE..... 253

ANNEXES 273

Tableau Annexe 1.....	275
Bilan d'activités.....	281
Article annexe_The VELVET Complex in the Gray Mold Fungus <i>Botrytis cinerea</i> : Impact of <i>BcLAE1</i> on Differentiation, Secondary Metabolism, and Virulence.....	285

Liste des abréviations

5mC	5-méthylcytosine
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire d'un ARN messenger
ARN pol	ARN polymérase
ARN	acide désoxyribonucléique
BOA	acide botcinique
BOT	botrydial
CDS	coding sequence
ChIP	chromatin immunoprecipitation
DBD	DNA binding domain
DHN	1,8-dihydroxynaphthalene
DIM (-2, 5, 7)	Defective in DNA methylation
ET	éléments transposables
FT	facteur de transcription
GTF	general transcription factor
H3	histone 3
H4	histone 4
HAT	histone acetyltransferase
HDAC	histone deactelyse
HMT	histone methyltransferase
HP1	heterochromatin protein 1
HST	host-specific toxin
HxKyme	méthylation du résidu lysine y de l'histone x
HxKyme2	diméthylation du résidu lysine y de l'histone x
HxKyme3	triméthylation du résidu lysine y de l'histone x
K	lysine
KDM	lysine demethylase
me	methylation
NHST	non host-specific toxin
NRPS	non-ribosomal peptide synthetase
PCR	polymerase chain reaction
PIC	pre-initiation complex
PKS	polyketide synthase
qPCR	PCR quantitative
RIP	repeat-induced point mutation
RT	rétro-transcription
TAF	TBP-associated factor
TBP	TATA binding protein

Unités internationales

°C	degré Celsius
Da	Dalton
g, mg, µg, ng	gramme, milligramme, microgramme, nanogramme
j, h, min, sec	jour, heure, minute, seconde
l, ml, µl	litre, millilitre, microlitre
M, mM, µM, nM	molaire, millimolaire, micromolaire, nanomolaire
mmol	millimole

Introduction générale

1. Les champignons : cause majeure des maladies des plantes

1.1. Le règne des champignons

Malgré ce que croit la plupart des consommateurs de champignons fraîchement cueillis dans les forêts, les Mycètes ne sont pas des plantes mais forment un règne à part entière. L'apparition du règne des Fungi a été estimée à environ 400 millions d'années (Taylor et Berbee, 2006). On y retrouve une diversité d'organismes très importante allant des levures aux champignons Basidiomycètes communément appelés champignons à chapeaux. En 2001, le nombre d'espèces appartenant au règne des Fungi avait été estimé à 1,5 millions (Hawksworth). Cette estimation a récemment été réévaluée à 5,1 millions (Blackwell, 2011). Cependant, environ 100 000 espèces seulement ont été identifiées (Kirk *et al.*, 2008; Blackwell, 2011). Les champignons ont été capables de coloniser de nombreuses niches écologiques à travers la Terre grâce à l'évolution de divers types trophiques. Ils sont de remarquables décomposeurs et peuvent dégrader de nombreuses matières, ce qui leur permet de se développer aussi bien sur les restes oubliés de nourriture de nos réfrigérateurs que sur le bois mort des forêts. De plus, les champignons sont impliqués dans de nombreuses interactions avec divers organismes (Taylor *et al.*, 2004). Notamment, la formation de lichens permet la colonisation de milieux hostiles allant de la surface d'une roche jusqu'aux zones polaires. L'extraordinaire capacité des champignons à dégrader de nombreuses molécules est largement utilisée par les Hommes, ce qui est parfois défini comme de la domestication. En effet, la production de pain, de bière ou encore de fromage (camembert, roquefort) implique l'utilisation contrôlée de levures ou de champignons filamenteux. Les champignons sont aussi utilisés pour la détoxification de zones polluées (Silar *et al.*, 2011). A l'inverse de ces procédés qui sont basés sur la capacité à dégrader ou transformer, les Hommes utilisent les champignons pour produire un nombre important de molécules utilisées dans l'industrie ou dans la médecine par exemple (Demain et Martens, 2016). Cependant, les champignons ne sont malheureusement pas uniquement bénéfiques pour les Hommes. De nombreuses espèces fongiques se nourrissent et accomplissent leur cycle de vie en parasitant un hôte. Il existe des espèces pathogènes de l'Homme. *A fortiori*, de nombreuses espèces sont impliquées dans l'attaque de plantes et provoquent des maladies qui peuvent (i) entraîner des pertes de rendement mais aussi (ii) rendre

inconsommables les denrées produites sur des parcelles contaminées en raison de la production de toxines. Les champignons représenteraient ainsi la menace microbienne la plus importante vis-à-vis des plantes (Agrios, 2005).

L'agriculture moderne doit faire face à de nombreux enjeux. La lutte contre les champignons phytopathogènes représente un enjeu économique majeur pour les producteurs mais aussi un enjeu démographique dû à l'accroissement de la population mondiale. De plus, l'urbanisation tend à faire diminuer les surfaces cultivables dans les pays développés et en cours de développement. A ces défis vient s'ajouter le souhait des consommateurs d'acheter de la nourriture « saine » dont la production a nécessité pas ou peu de produits phytosanitaires. En résumé, les défis d'aujourd'hui et de demain sont de produire de la nourriture en plus grande quantité, avec moins de terres cultivables et en utilisant moins de produits phytosanitaires. Dans cette optique, le plan ECOPHYTO2018 a été mis en place en 2008 à la suite du Grenelle environnement. Cette initiative vise à réduire progressivement l'utilisation des produits phytosanitaires notamment de fongicides (pour atteindre une diminution de l'utilisation de 50 %) en France tout en maintenant une agriculture économiquement compétitive. L'atteinte de ces objectifs nécessite une connaissance approfondie des différentes stratégies des champignons phytopathogènes.

1.2. Stratégies d'infection des champignons phytopathogènes

Nous avons vu ci-dessus que les champignons sont capables d'attaquer un nombre important de plantes (dont les grandes cultures). L'interaction entre une plante hôte et un champignon fait intervenir de nombreux mécanismes chez le champignon pour infecter la plante mais aussi chez cette dernière pour se défendre. Au cours de l'évolution, différentes stratégies d'infection ont été sélectionnées afin d'assurer la nutrition et le maintien du cycle de vie des parasites. On distingue ainsi (i) les biotrophes, (ii) les nécrotrophes et (iii) les hémibiotrophes (**Fig. 1**).

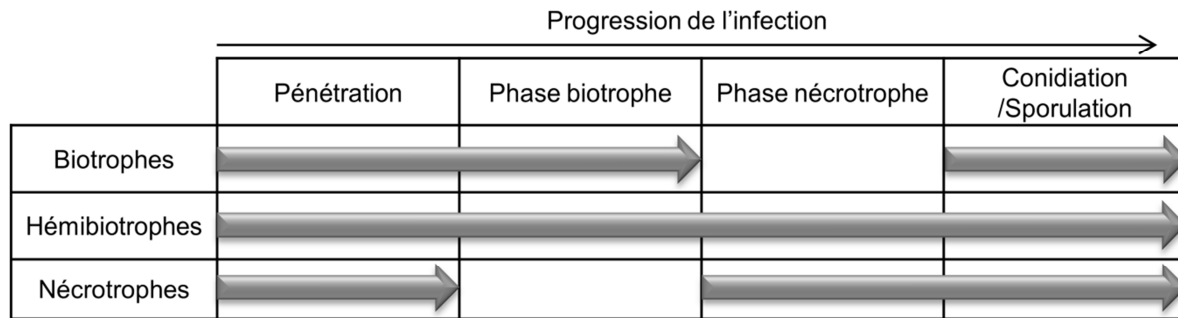


Fig. 1. Stratégies d'infection des différents types trophiques de champignons phytopathogènes.

Les phases de pénétration et de conidiation / sporulation sont communes aux différents types trophiques. Les champignons hémibiotrophes se distinguent par leur stratégie d'infection qui inclut successivement une phase biotrophe puis une phase nécrotrophe. Adapté de Divon et Fluhr (2007).

1.2.1. Les biotrophes

Les champignons dits biotrophes ou parasites obligatoires infectent les plantes en les maintenant en vie dans le but de s'en nourrir (Mendgen et Hahn, 2002). Le détournement des nutriments est réalisé chez la plupart des champignons biotrophes par une structure d'infection particulière appelée haustorium. Cette structure ne pénètre pas la membrane végétale mais crée une invagination qui permet des échanges de composés dont les nutriments. Néanmoins, cette stratégie nécessite de contrer la perception du parasite par la plante hôte. Ainsi, les parasites obligatoires délivrent des facteurs (les effecteurs) *via* les haustoria qui permettent d'interférer avec les mécanismes de défense et donc de maintenir l'interaction. Les champignons biotrophes ont généralement un spectre d'hôte étroit. Ils incluent notamment les rouilles (comme *Puccinia triticina* ; Kolmer, 2013) et les oïdiums (*Blumeria graminis* ; Zhang *et al.*, 2005).

1.2.2. Les nécrotrophes

A l'inverse des parasites obligatoires, la stratégie des organismes phytopathogènes nécrotrophes est de tuer les cellules végétales afin de pouvoir se nourrir et se développer sur les tissus morts. Les mécanismes d'infection impliquent ainsi la production de molécules toxiques et d'enzymes lytiques qui vont affecter l'intégrité cellulaire. Certains agents pathogènes nécrotrophes sont capables d'infecter une unique espèce végétale (*e. g.* *Cochliobolus heterostrophus* ; Horwitz *et al.*, 2013) tandis que d'autres peuvent en infecter plusieurs centaines. C'est le cas de *Botrytis cinerea*, le sujet d'étude

de cette thèse, dont le spectre d'hôtes a récemment été estimé à plusieurs centaines d'espèces végétales (Elad *et al.*, 2016).

Des études récentes semblent indiquer que les agents nécrotrophes n'utilisent pas seulement des facteurs de virulence qui n'ont pour action que la destruction grossière des cellules. Au contraire, des mécanismes impliqués dans la manipulation des défenses ou du métabolisme énergétique de la plante ont été mis en évidence. Par exemple, un effecteur permettant le contournement des mécanismes de défense végétale a récemment été caractérisé chez *Sclerotinia sclerotiorum*, un champignon phytopathogène polyphage défini comme nécrotrophe (Weiberg *et al.*, 2013; Lyu *et al.*, 2016).

1.2.3. Les hémibiotrophes

La stratégie des champignons dits hémibiotrophes est intermédiaire à celle des biotrophes et des nécrotrophes. Dans les premières phases de l'infection, ces champignons pénètrent la paroi végétale et se développent en fonction des espèces dans le milieu inter- ou intra-cellulaire. La différenciation de structures (comme les haustoria ou les vésicules intracellulaires) va avoir lieu afin de détourner les nutriments de la plante tout en maintenant cette dernière en vie et sans entraîner de symptômes. Cette phase nécessite l'excrétion par le champignon de facteurs permettant le contournement des mécanismes de défense de l'hôte (effecteurs) et peut donc être considérée comme une phase biotrophe. Dans une seconde phase, les champignons hémibiotrophes vont induire la mort cellulaire végétale comme le font les nécrotrophes. Un développement saprophytique sur les tissus morts aura alors lieu. Cette seconde phase peut être assimilée à la nécrotrophie. Des espèces particulièrement étudiées de champignons hémibiotrophes sont *Leptosphaeria maculans* (qui induit la nécrose du collet sur des Brassicacea dont le colza ; Rouxel et Balesdent, 2005), *Magnaporthe oryzae* (qui est responsable de la pyriculariose notamment sur le riz ; Talbot, 2003) ou encore différentes espèces de *Colletotrichum* provoquant par exemple des anthracoses sur de nombreux hôtes (Cannon *et al.*, 2012).

La définition des types trophiques est une notion qui est sujette à débat. Notamment, les différences entre les champignons nécrotrophes et hémibiotrophes sont controversées. En effet, il a été observé que certaines espèces qualifiées de nécrotrophes peuvent se développer de façon asymptomatique sur leur plante hôte (Spanu, 2012).

1.3. Présentation de *Botrytis cinerea*, l'agent de la pourriture grise

Botrytis cinerea Persoon : Fries (téléomorphe *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) est un ascomycète responsable de la pourriture grise (**Fig. 2**). Le nom de cette maladie provient de la couleur caractéristique des conidies produites par *B. cinerea*. Le genre *Botrytis*, ainsi que le genre voisin *Sclerotinia*, font partie de la classe des Leotiomycètes, de l'ordre des Héliotales et de la famille des Sclerotiniaceae. *Sclerotinia sclerotiorum* ((Lib.) de Bary), un champignon phytopathogène du sol provoquant la pourriture blanche sur plus de 400 espèces végétales (Bolton *et al.*, 2006) est une espèce proche de *B. cinerea*. Ces deux espèces sont typiquement nécrotrophes et induisent la dégradation et la mort des tissus jusqu'à l'apparition d'une pourriture.

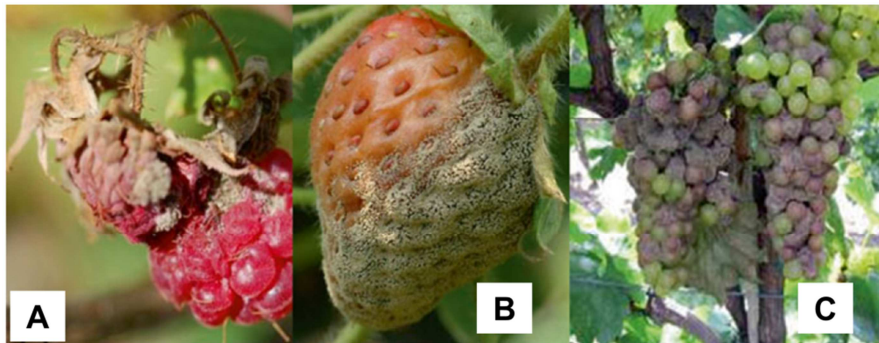


Fig. 2. Symptômes de la pourriture grise grise.

Les photos présentent les symptômes entraînés par l'infection par *B. cinerea* sur framboise (A), fraise (B) et grappe de raisin (C). Adapté de Carisse (2016).

Les espèces appartenant au genre *Botrytis* sont impliquées dans l'infection de plus de 1400 espèces appartenant à 596 genres de plantes (Elad *et al.*, 2016). *B. cinerea* est capable à elle seule d'attaquer 586 de ces genres végétaux (principalement des Dicotylédones) et possède donc un spectre d'hôtes très large qui comprend notamment des espèces cultivées d'intérêt économique majeur comme la tomate, la fraise ou la vigne. Pour lutter contre le développement de *B. cinerea* en plein champs et

en serres, l'optimisation des pratiques culturales (comme la réduction de la densité de plantation, la gestion de la canopée pour assurer une bonne aération ou encore la récolte des denrées uniquement en conditions de temps sec) ainsi que le développement de méthodes de biocontrôle sont mis en place (Elad, 2016; Nicot *et al.*, 2016). L'utilisation de produits phytosanitaires dans le cadre de la lutte chimique reste cependant la méthode la plus efficace pour contrôler le développement de la pourriture grise (Fillinger et Walker, 2016). Néanmoins, plusieurs phénomènes de contournement de résistance ont été rapportés (Leroch *et al.*, 2011; Fillinger et Walker, 2016). Les dommages provoqués par *B. cinerea* sont difficiles à estimer du fait de ce spectre d'hôtes très large. En revanche, le coût des fongicides spécifiquement appliqués contre la pourriture grise a été estimé à 540 millions d'Euros (2001), soit 10% du marché mondial des fongicides (Dean *et al.*, 2012). Si dans la grande majorité des cas, la présence de *B. cinerea* dans les cultures est problématique, elle peut néanmoins s'avérer bénéfique dans de rares vignobles. Dans ce cas, *B. cinerea* se développe uniquement au niveau de l'épiderme des baies de raisin sans entraîner les symptômes de la pourriture grise. Les baies subissent alors un dessèchement progressif qui va permettre une accumulation en sucre. Ce processus est nommé pourriture noble et est utilisé pour la production de vins liquoreux tels que le Sauternes ou le coteaux du Layon. Une étude a démontré que les souches impliquées dans la pourriture noble ne sont pas différentes de celles qui sont isolées à partir de plantes infectées par la pourriture grise (Fournier *et al.*, 2013). La différence entre ces deux types d'interaction résulterait des conditions environnementales (température et humidité).

A l'inverse de *B. cinerea*, la majorité des espèces de *Botrytis* sont impliquées dans l'infection d'un nombre d'espèces végétales beaucoup moins important, certaines étant même spécialisées dans l'infection d'un unique hôte (Elad *et al.*, 2016).

1.3.1. Cycle de vie de *B. cinerea*

Le cycle de vie de *B. cinerea* est présenté en **Fig. 3**. Il est composé de plusieurs phases distinctes. Les conidies produites massivement par *B. cinerea* à partir de conidiophores caractéristiques (**Fig. 4A**) sont dispersées (notamment par le vent) et vont germer (**Fig. 4D**) sur la surface des plantes lorsque les conditions sont favorables (forte humidité). *B. cinerea* est un

champignon aérien et attaque toutes les parties des plantes à l'exception des racines. Les tubes germinatifs vont pénétrer l'épiderme au niveau d'une structure appelée appressorium (**Fig. 4E**). Néanmoins, à l'inverse de l'appressorium de *M. oryzae* par exemple qui utilise l'accumulation de pression pour pénétrer la cuticule de façon mécanique (Talbot, 2003), l'appressorium de *B. cinerea* n'est pas une structure enflée et mélanisée. La pénétration a lieu grâce à l'action d'enzymes au point de contact. Alternativement, *B. cinerea* peut différencier des structures particulières appelées coussins d'infection (**Fig. 4C**). Suite à la pénétration de l'hôte, une lésion dite primaire apparaît. Le champignon colonise ensuite rapidement les tissus végétaux et entraîne la mort des cellules. Cette étape correspond aux lésions dites secondaires. Après une semaine environ, des conidiophores se forment et vont permettre la dissémination des conidies pour la réalisation d'une nouvelle infection. Il a récemment été suggéré que *B. cinerea* se développerait parfois de façon asymptomatique au sein des hôtes et ne provoquerait l'infection qu'à la suite d'un stress ou de la maturation ou la sénescence des tissus (Shaw *et al.*, 2016). Il est donc possible qu'une phase de quiescence soit incluse dans le cycle présenté.

Le champignon peut survivre en hiver à l'état mycélien sur les débris de plantes infectées et la production de conidies au printemps permet d'entrer dans un nouveau cycle. Alternativement, des sclérotés peuvent être produits à partir du mycélium. Ces structures sont mélanisées et extrêmement résistantes aux conditions environnementales et permettent à nouveau la production de mycélium lorsque les conditions redeviennent favorables. Ces structures sont aussi impliquées dans la reproduction sexuée de *B. cinerea*. Lorsqu'elles sont fécondées par des micro-conidies, elles entraînent la production d'apothécies (**Fig. 4B**) qui vont permettre la maturation et la dissémination d'asques contenant les ascospores. *B. cinerea* étant un champignon hétérothallique, deux souches de types sexuels opposés (MAT1-1 *versus* MAT1-2) doivent donc intervenir pour former des apothécies. Les conditions requises pour sa mise en œuvre sont maîtrisées au laboratoire mais l'observation d'apothécies au champ n'a été relevée que dans de très rares cas. Cependant, un fort taux de recombinaison a été observé au niveau des populations naturelles, ce qui suggère fortement l'existence

d'un brassage génétique régulier qui pourrait être dû à une reproduction sexuée, ou alternativement à des évènements de parasexualité (Fournier et Giraud, 2007).

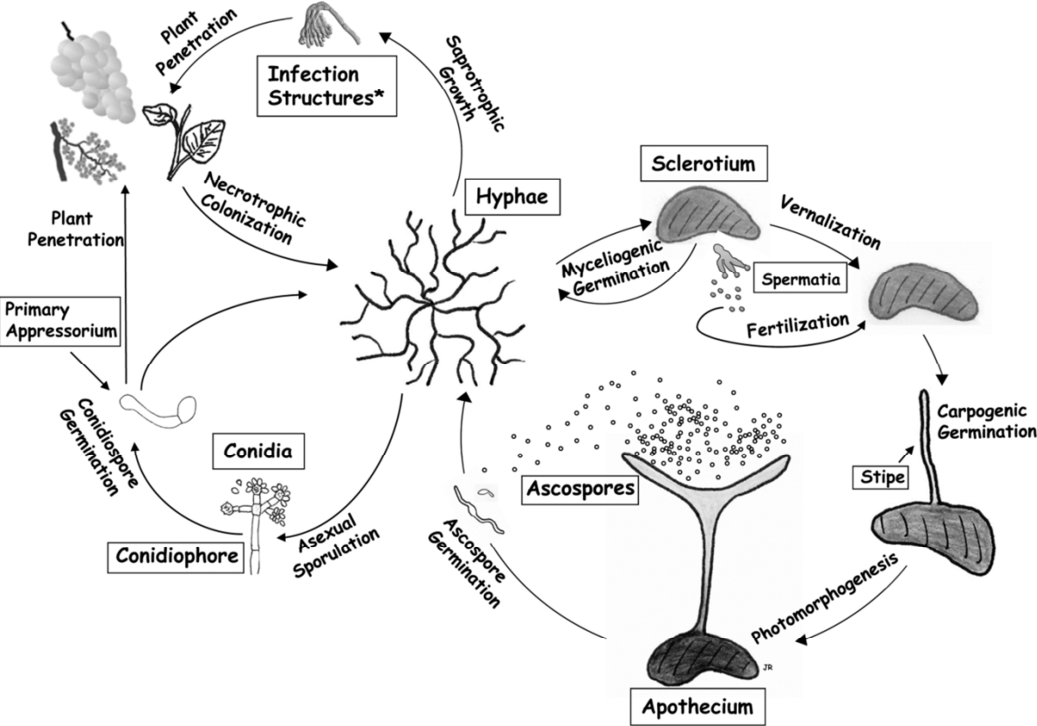


Fig. 3. Cycle de vie de *B. cinerea*.

D'après Amsellem *et al.* (2011).

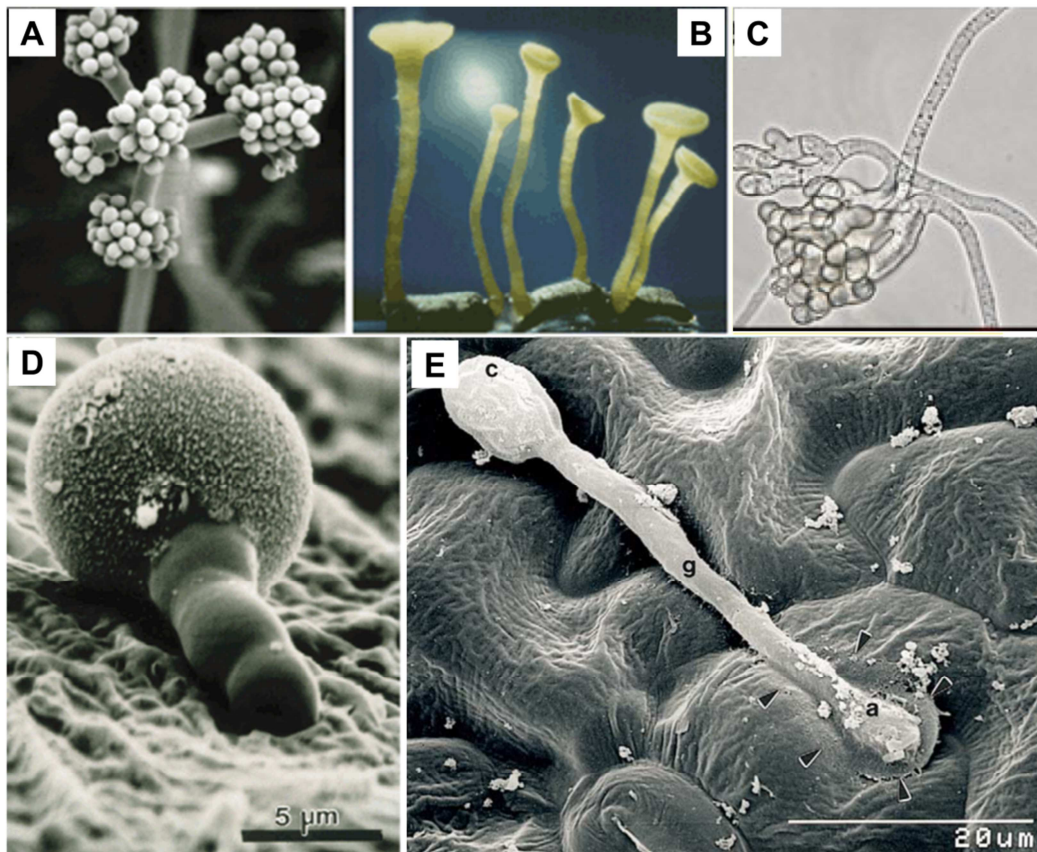


Fig. 4. Présentation de structures morphologiques de *B. cinerea*.

Les photographies suivantes présentent un conidiophore (A), des apothécies (B), un coussin d'infection (C) et une conidie en germination (D). La photographie E représente la pénétration par un appressorium (a) issu de la germination d'une conidie (c) et de l'élongation d'un tube germinatif (g). D'après Williamson *et al.* (2007)(A, B et D), Hahn *et al.* (2014)(C) et van Kan (2006)(E).

1.3.2. *Botrytis cinerea* : un modèle d'étude pour la nécrotrophie

En raison de l'importance des pertes économiques engendrées par *B. cinerea*, de gros efforts ont été mis en œuvre pour comprendre les mécanismes impliqués dans l'infection par ce champignon. *B. cinerea* est considéré comme un champignon nécrotrophe typique en raison de la rapidité et de l'intensité des nécroses induites lors de l'infection. La multiplicité des études portant sur les facteurs de virulence de *B. cinerea* (Cf. **partie 3.3**) permet aujourd'hui d'avoir accès à de nombreux outils et connaissances sur l'agent de la pourriture grise. Notamment, plusieurs méthodes ont été utilisées avec succès pour transformer ce champignon dans le but d'inactiver des gènes (remplacement par un gène de résistance), de les surexprimer (remplacement du promoteur initial par un promoteur fort) ou encore pour localiser *in vivo* des protéines en les fusionnant à une protéine fluorescente (Schumacher, 2012). De plus, des criblages par insertion aléatoire de l'ADN-T d'*Agrobacterium tumefaciens* ont été mis

en place (Giesbert *et al.*, 2011) dans le but d'identifier les gènes impliqués dans les différentes phases de l'infection. *B. cinerea* est de plus facilement cultivable sur milieu synthétique et des protocoles permettant notamment le croisement sexué entre différentes souches sont disponibles. Finalement, des données génomiques sont disponibles, notamment grâce à l'annotation du génome de la souche de référence B05.10 qui a été séquencé *de novo* (van Kan *et al.*, 2016). L'utilisation de la technologie PacBio a permis d'obtenir une version sans « gap », ce qui représente une avancée majeure au regard des informations jusqu'ici disponibles au sein de portions de séquences. D'après l'étude de van Kan et de ses collaborateurs, il est maintenant connu que la souche B05.10 possède 16 chromosomes cores et 2 chromosomes dispensables. La taille du génome est estimée à 42.6 Mb et 11 701 gènes ont été prédits automatiquement sur la base de données d'expression RNAseq puis corrigés manuellement par la communauté Botrytis.

1.3.3. Facteurs de virulence

Pour infecter les plantes, différents mécanismes ont été sélectionnés au cours de l'évolution. Ces facteurs de virulence sont définis comme étant impliqués dans l'infection tout en étant dispensables au développement notamment en conditions de laboratoire. Certains des facteurs de virulence identifiés chez *B. cinerea* sont présentés ci-dessous.

1.3.3.1. Les enzymes de dégradation des parois végétales

La capacité à dégrader les parois végétales est un aspect important pour l'infection par les champignons. Les glucides qui composent les parois végétales forment un réseau complexe comprenant des polysaccharides qui peuvent être divisés en trois catégories : la cellulose, l'hémicellulose et la pectine. Pour les dégrader, les champignons possèdent un véritable arsenal d'enzymes de dégradations des parois (appelées PCWDEs pour *Plant Cell Wall Degrading Enzymes*). *B. cinerea* possède 118 gènes putativement impliqués dans ce phénomène de dégradation des parois végétales (Amsellem *et al.*, 2011). Notamment, l'agent de la pourriture grise possède le potentiel pour dégrader particulièrement efficacement la pectine puisque 44 gènes impliqués dans cette fonction sont prédits. Plusieurs de ces gènes codant des polygalacturonases ont été caractérisés. BcPG2 est requis pour l'induction des lésions primaires (Kars *et al.*, 2005) tandis que BcPG1 est impliquée dans la

colonisation (lésions secondaires) (Have *et al.*, 1998). D'autres enzymes comme des pectine méthylestérases, des cutinases, des cellulases ou des hémicellulases sont également impliquées dans la dégradation des parois végétales lors de l'infection par *B. cinerea* (Van der Vlugt-Bergmans *et al.*, 1997; Valette-Collet *et al.*, 2003; Brito *et al.*, 2006).

1.3.3.2. L'induction d'un burst oxydatif

Parmi les nombreux mécanismes de défense qu'elles possèdent, les plantes induisent précocement en réponse à la perception d'agents biotiques une augmentation limitée dans l'espace de la concentration en espèces réactives de l'oxygène (soient les ROS pour *Reactive Oxygen Species*) (Levine *et al.*, 1994). Ce phénomène est communément nommé « burst » oxydatif. Ce mécanisme est particulièrement efficace dans le cadre de l'interaction avec des microorganismes comme les biotrophes qui ne peuvent pas se développer sur les tissus morts. A l'inverse, la production de ROS et l'induction de la mort cellulaire subséquente peut en revanche favoriser l'infection par des organismes nécrotrophes. C'est le cas de *B. cinerea* qui possède des enzymes pour résister à ces bursts oxydatifs et pour qui cette production externe de ROS serait même un avantage pour mener à bien l'infection (Govrin et Levine, 2000). De plus, *B. cinerea* serait lui-même impliqué dans la production de ROS, ce qui renforcerait encore un peu plus le stress oxydatif bénéfique au champignon au niveau de l'interaction (Heller et Tudzynski, 2011).

1.3.3.3. Les petites protéines phytotoxiques et les effecteurs

La stratégie d'infection des organismes nécrotrophes implique la capacité à induire les mécanismes de mort cellulaire de la plante hôte (Dickman *et al.*, 2001; Oliver et Solomon, 2008). Cette capacité repose sur la production de métabolites (Rossi *et al.*, 2011 ; Cf. plus loin dans cette Introduction générale) et de protéines pouvant être phytotoxiques (Stergiopoulos *et al.*, 2013).

La production de protéines phytotoxiques a été mise en évidence chez *B. cinerea*. Notamment, une protéine de la famille des cérato-platanines, BcSpl1, induit des nécroses et des réactions de défense typiques de la HR de manière dose-dépendante (Frías *et al.*, 2011). Deux protéines de la familles des NEP-1 like, BcNep1 et BcNep2, sont également impliquées dans l'induction des réponses

de défense de l'hôte (dépôts de callose et accumulation de ROS notamment) et de la mort cellulaire à haute dose (Gijzen et Nürnberger, 2006; Cuesta Arenas *et al.*, 2010). La première protéine NEP a été décrite chez *Fusarium oxysporum* comme étant impliquée dans l'induction des nécroses et de la production d'éthylène (*Necrose and Ethylen-inducing Protein*) (Bailey, 1995).

A notre connaissance, aucun effecteur protéique manipulant les défenses de l'hôte n'a été caractérisé chez *B. cinerea*, mais il n'est pas exclu que de tels facteurs existent parmi les centaines de petites protéines qui semblent sécrétées (277 dont la taille est inférieure ou égale à 300 acides aminés ; Amselem *et al.*, 2011). Récemment, une étude a démontré la production d'un effecteur protéique par *S. sclerotiorum* (Lyu *et al.*, 2016). Cette protéine aurait un rôle dans la manipulation du métabolisme de la cellule hôte et serait comparable aux effecteurs produits par les organismes biotrophes et hémibiotrophes. L'étude de Lyu et de ses collaborateurs suggère donc l'implication d'effecteurs protéiques dans l'infection par des organismes nécrotrophes polyphages. Le gène codant la protéine identifiée chez *S. sclerotiorum* est également présent chez *B. cinerea*, ce qui laisse supposer que des mécanismes similaires interviennent dans le pouvoir pathogène de l'agent de la pourriture grise.

1.3.3.4. Les petits ARNs

Une nouvelle stratégie d'infection a récemment été mise en évidence chez *B. cinerea*. Weiberg *et al.* (2013) ont démontré pour la première fois que le champignon produisait des petits ARNs impliqués dans la manipulation des défenses de la plante hôte (**Fig. 5**). Ces petits ARNs sont produits au sein du champignon (par les protéines DICER) et sont par la suite exportés par des mécanismes inconnus dans les cellules hôtes. Ils sont ensuite pris en charge par la protéine AGO2 faisant partie du complexe RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) et vont entraîner une dégradation des ARNm de gènes de défense. L'extinction subséquente de ces gènes entraîne une susceptibilité accrue des plantes à l'infection par *B. cinerea*. Trois de ces petits ARNs ont été caractérisés dans le cadre de l'étude de Weiberg et de ses collaborateurs mais il est plus que probable que de nombreux autres petits ARNs soient impliqués dans le silencing d'autres gènes chez les plantes hôtes. Cette étude pionnière a ouvert la voie vers le domaine fascinant de l'implication des petits ARNs dans les interactions hôtes/parasites (Weiberg *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015).

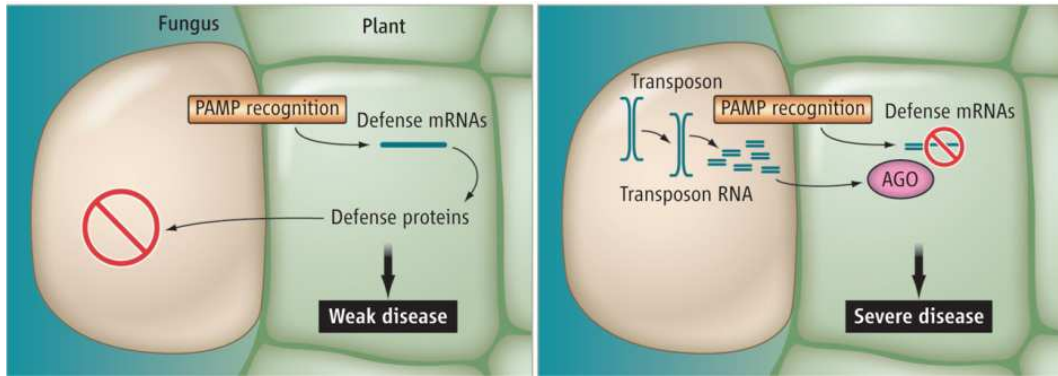


Fig. 5. Implication des petits ARNs de *B. cinerea* dans la manipulation des défenses de l'hôte.

Les petits ARNs produits à partir des éléments transposables chez *B. cinerea* sont transloqués dans les cellules végétales où ils utilisent la machinerie de RNAi pour dégrader les ARNm de gènes impliqués dans les mécanismes de défense au champignon. L'extinction de ces gènes permet une infection plus importante. D'après (Baulcombe, 2013).

1.3.3.5. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules, souvent de faible poids moléculaire, qui par définition ne sont pas nécessaires à la croissance du champignon. En revanche, ces métabolites peuvent conférer un avantage pour les souches productrices notamment dans le cadre de l'infection de l'hôte (Hoffmeister et Keller, 2007). Ainsi, certains métabolites secondaires sont phytotoxiques et sont donc impliqués dans les stratégies d'infection des champignons nécrotrophes et hémibiotrophes. Les organismes biotrophes sont souvent incapables de produire des métabolites secondaires toxiques.

Chez *B. cinerea*, 43 enzymes clés ont été prédites à partir des données génomiques disponibles (Viaud *et al.*, 2016 ; Cf. **partie 4**) permettant putativement la production d'une quarantaine de métabolites. Parmi eux, deux phytotoxines ayant un rôle redondant dans l'induction de la mort cellulaire végétale ont déjà été identifiées : le botrydial et l'acide botcinique (Dalmais *et al.*, 2011; Rossi *et al.*, 2011). Ces métabolites secondaires et leur régulation sont les sujets d'étude de ce manuscrit. Par conséquent, les parties suivantes les introduisent de façon plus détaillée.

2. Le métabolisme secondaire

Le métabolisme constitue l'ensemble des réactions enzymatiques qui ont lieu au sein d'un organisme. On y distingue le catabolisme, qui représente les réactions de dégradation avec libération d'énergie, de l'anabolisme qui regroupe les réactions de synthèse moléculaire avec consommation d'énergie. Le métabolisme dit primaire correspond aux réactions et aux métabolites qui sont indispensables au fonctionnement cellulaire et donc à la croissance et au développement de l'organisme producteur. On y retrouve notamment les glucides, les lipides ou encore les acides nucléiques qui sont conservés parmi les êtres vivants. A l'inverse, le métabolisme secondaire implique les réactions et les métabolites qui ne sont pas nécessaires à la croissance d'un organisme. Un métabolite secondaire, aussi parfois appelé produit naturel, peut être produit par un nombre restreint d'espèces au sein d'un genre, d'un ordre ou d'un phylum et dans certains cas seules certaines souches d'une même espèce possèdent la capacité de produire une molécule. D'autres métabolites sont plus largement distribués.

Les métabolites secondaires sont principalement produits par les plantes, les bactéries (particulièrement les Actinomycètes) et les champignons filamenteux. A l'inverse, les levures, les protozoaires et les animaux ne produisent des métabolites secondaires que dans de rares cas. Plusieurs rôles ont été attribués à ce type de molécules comme la communication, les mécanismes de défense vis-à-vis de prédateurs ou encore de protection contre les UV. La définition du métabolisme secondaire présentée ci-dessus rencontre néanmoins des limites. Effectivement, l'identification de nouveaux métabolites ainsi que de leur rôle rend les frontières avec le métabolisme primaire parfois floues. Par exemple, chez les plantes, certains flavonoïdes se sont avérés impliqués dans la régulation du transport d'auxine qui est une phytohormone responsable de la croissance végétale. Un autre exemple implique les caroténoïdes dont certains font partie du processus végétal primordial qu'est la photosynthèse. Enfin, la lignine qui est considérée comme un métabolite secondaire, est un composé très fréquemment retrouvé chez les plantes et qui est clairement impliqué dans leur croissance et leur développement.

D'après la base de données "Dictionary of Natural Products" 170 000 produits naturels seraient identifiés. Cependant, il est parfois difficile de classer ces molécules et plusieurs méthodes ont été mises en avant. Il est ainsi possible de regrouper des métabolites en fonction de leur nature biochimique, leurs propriétés et leurs effets biologiques ou encore en fonction de leur origine biosynthétique.

Dans la suite de cette partie, je vais principalement me focaliser sur le métabolisme secondaire chez les champignons filamenteux.

2.1. Les différents types de métabolites secondaires fongiques

Comme il l'a été présenté précédemment, le règne fongique est estimé entre 1,5 et 5,1 millions d'espèces dont seules 100 000 ont été décrites (Hawksworth, 2001; Kirk *et al.*, 2008; Blackwell, 2011). Sachant que ces organismes produisent en moyenne plusieurs dizaines de métabolites, il est probable que la quantité de métabolites non-identifiés s'élève à plusieurs centaines de milliers.

La biosynthèse des métabolites secondaires fongiques fait intervenir des enzymes spécifiques qui permettent la formation de la structure core (de base, fondamentale) du métabolite à partir d'un précurseur du métabolisme primaire. Ces enzymes sont dites « clé » car elles sont les premières à intervenir dans la production des métabolites secondaires. On distingue chez les champignons quatre grands types de métabolites secondaires résultant de leur action. Ces derniers sont détaillés ci-dessous.

2.1.1. Les polycétides (PK)

Les polycétides sont produits *via* les *polyketide synthases* (PKS). Plusieurs types de PKS existent :

- les PKS de type I sont de grosses enzymes multifonctionnelles composées de plusieurs domaines. Parmi elles, on retrouve des PKS modulaires (chaque module n'intervient qu'une fois dans la biosynthèse du métabolite) et des PKS itératives (qui ne contiennent qu'un module au sein duquel les domaines interviennent plusieurs fois de façon cyclique dans le processus). Chez les champignons, les PKS sont itératives. Parmi elles, on distingue les PKS non réductrices, les PKS partiellement

réductrices et les PKS hautement réductrices en fonction de l'intervention de différents domaines (**Fig. 6**).

- les PKS de type II sont en fait un regroupement en complexe de plusieurs enzymes qui sont monofonctionnelles et qui assurent donc chacune une réaction.

- les PKS de type III sont des PKS qui n'utilisent pas de domaine ACP.

Les métabolites secondaires fongiques résultent essentiellement de l'action des PKS de type I itératives. Ces enzymes ressemblent aux synthases impliquées dans la synthèse d'acides gras et contiennent des domaines identiques à ces dernières. La différence majeure entre la biosynthèse des acides gras et des polycétides repose sur la réduction complète du β -cétoester obligatoire dans le premier cas alors que cette étape n'est qu'optionnelle pour les polycétides.

Le mode d'action des PKS à fonctionnement itératif est quasi entièrement connu chez les champignons. Trois domaines sont essentiels à l'action des PKS fongiques et représentent l'équipement de base pour la synthèse de polycétides. Il s'agit des domaines acyltransférase (AT), protéine porteuse d'acyle (ACP) et cétoynthase (KS). A l'inverse, l'intervention des domaines cétoréductase (KR), déshydratase (DH) et énoyle réductase (ER) est optionnelle. La **Fig. 6** présente le principe de fonctionnement des PKS itératives fongiques.

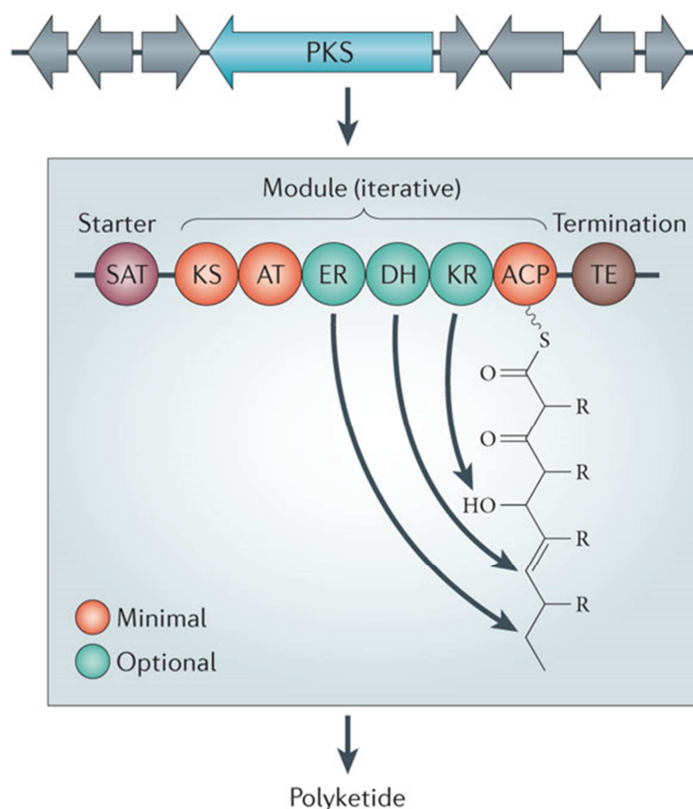


Fig. 6. Schéma du fonctionnement des PKS itératives fongiques.

Dans un premier temps, une amorce de type courte chaîne carboxylique (acetyl CoA ou malonyl CoA) est chargée par le domaine SAT sur le domaine ACP (grâce à une liaison thioester au niveau du groupement thiol (-SH) du bras prosthétique 4'-phosphopantéthine de l'ACP). Cette même amorce est ensuite transférée par *trans*-acylation au domaine KS (au niveau du groupement thiol d'un résidu de cystéine). Une unité d'élongation (typiquement du malonyl CoA) est ensuite chargée à son tour sur l'ACP par l'AT. Une réaction dite de Claisen se produit alors. Cette réaction correspond à la décarboxylation de l'unité d'extension qui libère de l'énergie pour entraîner la condensation de l'amorce sur l'unité d'élongation. Le domaine KS se trouve libéré tandis qu'au domaine ACP se trouve le polycétide en cours de biosynthèse (il s'agit alors d'un β -cétoester). Ce dernier est de la même façon que lors du premier cycle transféré sur le domaine KS et un nouveau cycle peut commencer avec le chargement d'une nouvelle unité d'extension. En fonction des domaines présents au sein de l'enzyme (et donc de sa nature par exemple partiellement réductrice), la chaîne polycétidique en cours de formation peut subir différents niveaux de réduction via l'action des domaines cétoréductase (KR ; qui réduit le groupement β -céto en hydroxyle), déshydratase (DH ; qui réduit les groupements hydroxyles en groupement énoyle) et énoyle réductase (ER ; qui réduit les groupements énoyle en groupements alkyles). Les PKS hautement réductrices peuvent aussi contenir des domaines qui ajoutent des groupements méthyle (domaine méthyltransférase ; MT) ou acétyle (acétyltransférase ; CaT). Lorsque le polycétide est synthétisé entièrement après un nombre défini de cycles (fonctionnement par itération des domaines), le polycétide est transféré du domaine ACP au domaine thioestérase (TE) qui va catalyser l'hydrolyse de la liaison reliant le polycétide à l'enzyme et donc le relâcher. Dans certains cas, une réaction de cyclisation a lieu (grâce au domaine cyclase de type Claisen (CLC) pour donner naissance à un métabolite aromatique. Récemment, l'existence d'un domaine « product template » (PT), fréquemment retrouvé chez les PKS non-réductrices, a été mise en évidence. Il interviendrait dans le repliement et la cyclisation des poly- β -cétoester (Crawford *et al.*, 2009).

Le nombre de cycles, la nature de l'amorce et des unités d'extension ainsi que l'intervention des différents domaines optionnels sont à l'origine de l'impressionnante diversité des polycétides fongiques. Ils peuvent être linéaires, aromatiques, courts, longs, ramifiés ou encore plus ou moins réduits. Les mécanismes qui dictent le nombre de cycles chez les PKS fongiques demeurent inconnus. On ne peut donc pas faire de prédictions contrairement aux PKS modulaires de type I que l'on retrouve chez les bactéries.

2.1.2. Les peptides non-ribosomiques (NRP)

Les peptides non-ribosomiques sont des peptides synthétisés grâce à l'action d'enzymes géantes (appelées synthétases de peptides non ribosomiques, soit NRPS pour *Non Ribosomal Peptide Synthetase*) sans intervention des ribosomes et *via* l'utilisation d'ATP. Ces NRPS sont souvent multi-modulaires. Chacun des modules comporte plusieurs domaines qui vont assurer des activités enzymatiques différentes. Les NRPS vont ainsi permettre l'assemblage progressif d'acides aminés dans le but de produire le peptide final. Comme pour les PKS, des domaines de base doivent être présents pour assurer la production du métabolite. Ainsi, un module de NRPS est composé au minimum des domaines d'adénylation (A), de thiolation (T) (aussi appelé protéine porteuse de peptidyle (PCP)) et de condensation (C) (Mootz 2002, Schwarzer et Marahiel 2001). Le fonctionnement d'une NRPS trimodulaire de *Penicillium chrysogenum* (ACV synthétase impliquée dans la production de pénicilline et de céphalosporine) est présenté en **Fig. 7**.

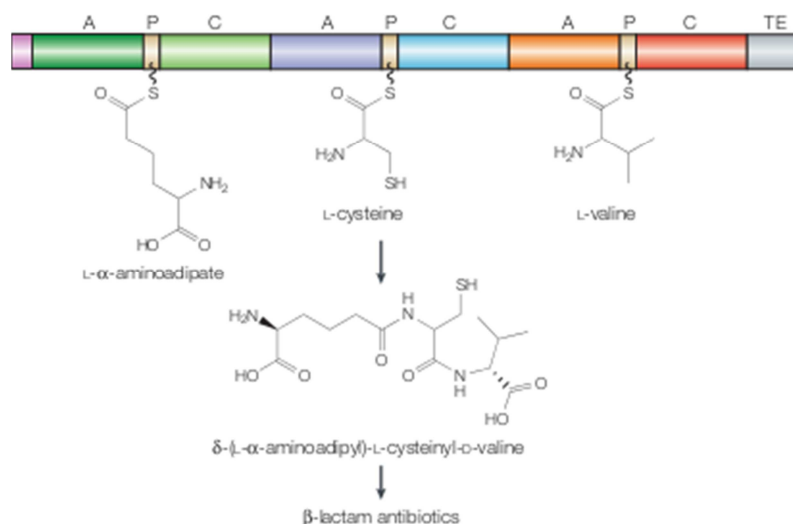


Fig. 7. Fonctionnement de la NRPS trimodulaire ACV synthétase.

La NRPS ACV (δ -(L - α -aminoadipyl) L -cysteinyl- D -valine) catalyse la première étape de la voie de biosynthèse de la pénicilline et de la céphalosporine. Chaque acide aminé est reconnu et activé par le domaine d'adénylation (A) correspondant et attaché en tant que thioester au niveau du 4'-phosphopanthénine (4'PP) du domaine de transport du peptidyl (P). Ce groupement 4'PP résulte d'une modification post-traductionnelle ajoutée sur une sérine dans une région très conservée du domaine T (Balibar 2005, Stack 2007). Les liaisons peptidiques sont formées grâce au domaine de condensation (C). Le tripeptide final est attaché au domaine P du dernier module (Cter) est libéré par le domaine thioestérase (TE). Durant cette étape, la L-valine est isomérisée en D-valine. Le tripeptide est par la suite cyclisé en isopénicilline N. Illustration tirée de Keller *et al.* (2005).

Comme c'est le cas pour les PKS, des domaines optionnels peuvent être présents au sein des modules des NRPS. Ils permettent des modifications de l'acide aminé activé comme la méthylation (par le domaine méthyltransférase ; M) ou l'épimérisation (par un domaine épimérase ; E). De plus, la plupart des NRPS fongiques ne possèdent pas de domaine TE mais un domaine de réduction (R) qui réduit la liaison thioester pour former un aldéhyde ou un alcool (Sims et Schmidt 2008). Enfin d'autres constituants inhabituels peuvent être ajoutés lors de la synthèse du métabolite (Schwarzer 2003). Il pourrait être admis que le nombre de modules détermine la taille du peptide produit. Néanmoins, il y a des évidences qui semblent indiquer que certains domaines au sein de modules pourraient être utilisés de façon itérative (Glinski 2002, Mootz 2002). Ainsi, la diversité là encore très riche des NRP fongiques provient notamment des acides aminés qui les composent. A l'inverse des ribosomes qui n'utilisent qu'une vingtaine d'acides aminés pour la production de protéines, les NRPS peuvent utiliser des acides aminés dits non protéinogènes. On en compte au moins 140 connus pour être ajoutés aux protéines classiques lors de modifications post-traductionnelles. L'utilisation de ce type

d'acides aminés augmente considérablement le nombre de métabolites pouvant être synthétisés par ce processus. De plus, la diversité des NRPS provient aussi du fait que les acides aminés puissent subir différentes modifications (méthylation), qu'ils soient plus ou moins réduits ou que le produit final soit linéaire ou cyclique.

2.1.3. Les terpènes

Les terpènes sont composés de plusieurs unités isoprènes (C_5H_8). Les différents types de terpènes produits par les champignons sont présentés en **Fig. 8**. Les terpènes sont des métabolites qui peuvent être linéaires ou cycliques, saturés ou non saturés ou être modifiés de différentes façons. Les terpènes synthases sont les enzymes clés impliquées dans la production des terpènes. Elles sont fréquemment appelées terpènes cyclases car elles mènent à l'obtention de composés cycliques/aromatiques dans la plupart des cas (Davis et Croteau, 2000). Elles catalysent des réactions complexes pour former des molécules qui comportent généralement un ou plusieurs cycles (il existe cependant des terpènes linéaires). En fonction du produit auquel elles aboutissent, ces enzymes sont par exemple nommées sesquiterpènes cyclases, diterpènes cyclases ou autres. Elles ne possèdent pas de domaines très conservés en dehors des sites de liaison au magnésium. Ceci les rend difficiles à prédire à partir des données génomiques (Khaldi *et al.*, 2010).

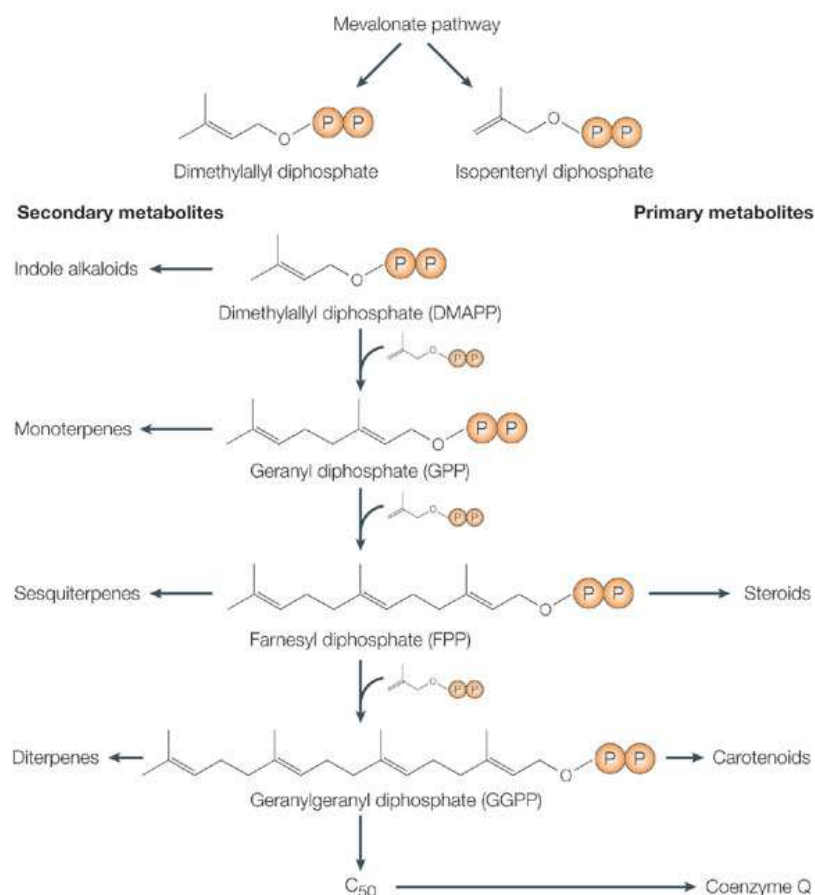


Fig. 8. Voies de biosynthèse des terpènes fongiques.

Les terpènes fongiques sont produits à partir de la condensation du précurseur isopentényl-pyrophosphate (IPP) avec son isomère diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP). Des enzymes nommées prényltransférases sont responsables de la condensation d'IPP et de DMAPP pour former des prényl-pyrophosphates comme le géranyl-pyrophosphate (GPP), le farnésyl-pyrophosphate (FPP) ou encore le géranylgéranyl-pyrophosphate (GGPP). Ce sont à partir de ces prényl-pyrophosphates que les terpènes synthétisent les terpènes. Les deux précurseurs (DMAPP et IPP) sont composés de 5 atomes de carbone (C5), les terpènes possèdent donc généralement un nombre d'atomes de carbone qui est un multiple de 5. Les monoterpènes (C10) sont ainsi synthétisés à partir de GPP (qui provient de la condensation d'un isopentényl-pyrophosphate et d'un diméthylallyl-pyrophosphate). Les sesquiterpènes (C15) proviennent du FPP et les diterpènes (C20) du GGPP (Davis et Croteau, 2000). Le FPP et le GGPP peuvent également être assemblés pour donner naissance à des terpènes encore plus importants comme les tri- et tétraterpènes (C30 et C40 respectivement). Les terpènes synthétisent les terpènes cycliques/aromatiques dans la plupart des cas. Elles catalysent des réactions complexes pour former des molécules qui comportent généralement un ou plusieurs cycles (il existe cependant des terpènes linéaires). Une oxydation du terpène mène à un métabolite que l'on appelle alors terpénoïde ou isoprénoïde.

2.1.4. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont définis par la présence d'un ou plusieurs atomes d'azote se trouvant dans un ou plusieurs cycles (on parle alors d'hétérocycles puisqu'il y a la présence d'atomes d'au moins deux éléments différents, soit C et N). Ces atomes proviennent généralement d'acides aminés. A l'inverse des PK ou des NRP, les alcaloïdes ne sont pas produits grâce à un seul et même type d'enzymes. Chez les champignons, on retrouve des diméthylallyl tryptophan transférase (DMATS) qui sont capables d'intégrer un acide aminé tryptophane au DMAPP. Ce type d'enzyme est notamment impliqué dans la production de l'ergotamine (**Fig. 9**) produite par *Claviceps purpurea* (Tudzynski *et al.*, 1999).

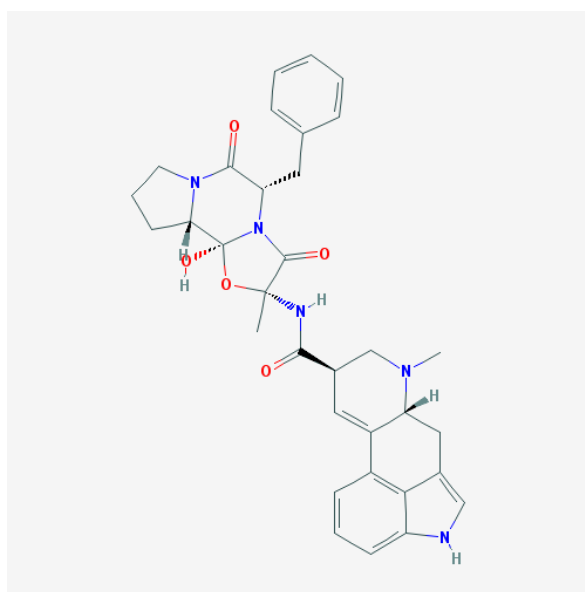


Fig. 9. Représentation de la structure chimique de l'ergotamine de *Claviceps purpurea*. L'image a été extraite de PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.1.5. Les composés hybrides

Certains composés produits par les champignons ne peuvent pas être classés dans les catégories abordées ci-dessus. En effet, certains métabolites fongiques sont des hybrides entre plusieurs types de molécules. Par exemple, on retrouve au sein des génomes fongiques des gènes codant des enzymes comportant à la fois les domaines minimum requis pour la synthèse des PK et des NRP. Ces enzymes sont appelées PKS-NRPS (**Fig. 10**) et produisent des molécules provenant non seulement de la condensation d'unités comme le malonyl-CoA mais contenant également un ou

plusieurs acides aminés. Une des caractéristiques des PKS-NRPS fongiques repose sur le fait qu'aucun domaine ER intact n'est présent dans la PKS. Ce domaine peut ne pas être nécessaire à la formation du métabolite ou intervenir en trans grâce à une autre protéine codée par un autre gène. Chez les champignons, plusieurs PKS-NRPS ont été caractérisées mais peu de métabolites résultant de leur action ont pour le moment été isolés (Boettger et Hertweck, 2013; Fisch, 2013).

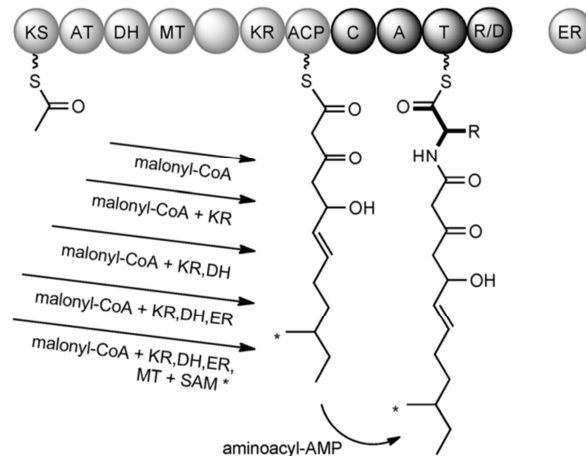


Fig. 10. Schéma de l'organisation des domaines des PKS-NRPS fongiques et de la production des hybrides résultant de leur action.

Les domaines du module PKS sont représentés en gris clair et les domaines du module NRPS en gris foncé. Ici, le domaine ER est présent et agit en *trans*. D'après Boettger et Hertweck (2013).

2.2. Utilisation et importance des métabolites secondaires fongiques pour l'Homme

C'est en 1928 que l'intérêt pour les métabolites secondaires a réellement pris toute son importance suite à la découverte d'un antibiotique qui a changé le cours de l'Histoire : la pénicilline. Durant cette année, Alexander Fleming découvre, ou plutôt redécouvre 31 ans après Ernest Duchesne (un médecin Français), l'effet antibactérien d'une culture de *Penicillium notatum* qu'il appelle alors pénicilline. Il publie ces travaux en 1929 (Fleming, 1929). Ce n'est que dans les années 1940 à l'Université d'Oxford qu'Howard Florey, Ernst Chain et Norman Heatley réussissent à isoler la molécule (la 2-pentenylpenicilline = pénicilline I) et à en faire une substance stable et utilisable. La production de pénicilline en grande quantité a permis de sauver d'innombrables vies, notamment pendant la seconde guerre mondiale et en particulier au cours du débarquement. Fleming, Florey et Chain ont reçu pour leurs travaux le prix Nobel de Médecine en 1945. Néanmoins, une autre souche

de *Penicillium* (*P. chrysogenum*) produisant une molécule un peu différente de celle identifiée précédemment (benzylpenicillin = penicillin II) mais en plus grande quantité lors de fermentation en milieu liquide fut utilisée pour la production industrielle d'antibiotique. Devant le constat de l'action et de l'utilité de la pénicilline, la recherche et la production industrielle d'antibiotiques sont devenues des priorités pour les compagnies pharmaceutiques. De nos jours, cette recherche continue dans le but de trouver de nouvelles molécules présentant différents modes d'action sur les bactéries en raison du nombre important de phénomènes de résistance (Bbosa *et al.*, 2014; Nathan et Cars, 2014). D'autres effets d'intérêt pour l'Homme ont été mis en évidence parmi les métabolites secondaires. Par exemple, la lovastatine (PK) produite par *Aspergillus terreus* est utilisée dans le cadre de la lutte contre le cholestérol (Manzoni et Rollini, 2002). Un autre métabolite, un NRP nommé cyclosporine, s'est avéré avoir un rôle immunosuppresseur et est couramment utilisé dans le cadre de transplantations (greffes) afin de limiter les phénomènes de rejet (Borel, 2002). Cette molécule a été isolée à partir du champignon Ascomycète *Tolypocladium inflatum*. D'autres métabolites fongiques sont également utilisés pour la lutte contre certains cancers ou la maladie d'Alzheimer (Demain et Martens, 2016). Cependant, en parallèle de la découverte de ces actions bénéfiques pour l'Homme, l'étude à haut débit des métabolites secondaires a permis de mettre en évidence l'action néfaste de certaines molécules. Notamment, il a été mis en évidence que diverses toxines produites par les champignons pouvaient avoir une action toxique pour les plantes, les animaux ou les Hommes. Les plus connues de ces toxines sont les aflatoxines et les trichothécènes.

2.3. Rôle des métabolites secondaires fongiques

Chez les champignons, les métabolites secondaires ne sont pas produits constitutivement. Leur synthèse peut être liée à certaines phases spécifiques de la différenciation morphologique (Calvo *et al.*, 2002) ou en réponse à des stimuli de l'environnement (Brakhage, 2012). Leur rôle est souvent hypothétique ou difficile à démontrer. Il est généralement proposé que leur production procure un avantage évolutif à l'organisme producteur et qu'ils pourraient notamment intervenir dans la survie des champignons dans les différents environnements hostiles dans lesquels ils évoluent (Fox et Howlett, 2008). Différents rôles des métabolites secondaires fongiques sont présentés ci-dessous.

2.3.1. Pouvoir anti-appétant

Dans leur environnement, les champignons sont fréquemment amenés à rencontrer des organismes fongivores comme des amibes, des nématodes ou divers insectes. Plusieurs études tendent à prouver que certains métabolites secondaires pourraient avoir un rôle anti-appétant vis-à-vis de ces prédateurs. Une étude de Rohlf *et al.* (2007) montre qu'un mutant d'*Aspergillus nidulans* délété dans un gène codant un régulateur global du métabolisme secondaire fongique (LaeA, Cf. **partie 4**) est préférentiellement consommé par rapport à la souche sauvage par l'arthropode *Folsomia candida*. Les auteurs suggèrent que ce constat est directement lié au fait que la production de métabolites secondaires est perturbée chez le mutant. Un autre exemple démontre l'implication d'un métabolite secondaire dans la résistance vis-à-vis d'un prédateur mais cette fois dans le cas d'une symbiose. *Epichloë festucae* est un agent mutualiste endophyte dont l'un des hôtes est le ray-grass (*Lolium perenne*). Cet agent fongique est capable de produire un métabolite dénommé péramine qui a été démontré par Tanaka *et al.* (2005) comme ayant un rôle dissuasif vis-à-vis des insectes. Ainsi, un mutant Δ *perA*, délété dans le gène codant une NRPS impliquée dans la biosynthèse de péramine, ne produit plus le métabolite. Les plantes inoculées avec le Δ *perA* sont significativement plus consommées par le charançon *Listronotus bonariensis* que celles inoculées avec la souche sauvage d'*E. festucae*. L'interaction avec *E. festucae* confère donc un avantage au ray-grass qui est moins attaqué par un ravageur grâce à la production de péramine par le champignon.

2.3.2. Activité anti-microbienne

Dans les différents milieux dans lesquels ils vivent, les champignons sont confrontés à de nombreux organismes compétiteurs comme des bactéries ou d'autres champignons. De nombreuses études suggèrent que la production de certains métabolites a pour rôle l'inhibition de la croissance de ces compétiteurs. La plus connue de ces molécules est probablement la pénicilline qui a été abordée précédemment et qui a été démontrée comme étant produite par plusieurs espèces fongiques (notamment *Penicillium notatum* et *Aspergillus nidulans*). De façon intéressante, la reconnaissance d'une bactérie spécifique par un champignon peut conduire à l'induction de l'expression de certains gènes du métabolisme secondaire tandis qu'un contact avec d'autres bactéries maintiendra ces mêmes

gènes éteints. Cette observation suggère une reconnaissance spécifique par le champignon. Ainsi, Schroeckh *et al.* (2009) ont mené une étude transcriptomique pour suivre l'expression des gènes lors de la co-culture entre *Aspergillus nidulans* et pas moins de 58 espèces d'Actinomycètes. Ils ont ainsi pu mettre en évidence qu'au contact de *Streptomyces hygroscopicus* (qui est la souche type de l'espèce *Streptomyces rapamycinicus*), plusieurs gènes du métabolisme secondaire sont induits chez le champignon ce qui permet la production d'acide orsellinique et de trois de ses dérivés. De façon surprenante, la production de ces métabolites n'est pas induite par les nombreux composés produits et excrétés par *Streptomyces*. Au contraire, pour que la stimulation ait lieu, il faut un contact physique intime entre les deux microorganismes (confirmé par microscopie électronique). Cette observation soulève des questions, notamment au niveau de la transduction du signal chez le champignon.

Certaines espèces de *Trichoderma* utilisées dans le cadre de la lutte biologique produisent des métabolites à l'activité antimicrobienne comme par exemple la viridine, la gliovirine ou encore la tricholine qui ont montré un effet sur la croissance de souches antagonistes (Vey *et al.*, 2001). Dans certains cas, le degré de biocontrôle dépend directement de la production de ces métabolites. Un autre exemple de métabolite à activité antimicrobienne est la production d'acide phoménoïque par *Leptosphaeria maculans* qui a un effet inhibiteur sur *Leptosphaeria biglobosa*. Cette dernière est une espèce présente au niveau des feuilles de colza et qui se trouve donc dans la même niche écologique que *L. maculans*. Dans ce cas, le métabolite pourrait clairement jouer un rôle dans la compétition pour l'espace (Elliott *et al.*, 2013). Finalement, une étude a montré que les extraits issus de cultures de différents *Aspergilli* présentaient plus d'activité antifongique lorsque les souches productrices avaient été co-cultivées avec une autre souche d'*Aspergillus* (Losada *et al.*, 2009). La compétition entraîne donc la production d'un ou plusieurs composés à activité antifongique.

2.3.3. Perturbation du quorum sensing

Le *quorum sensing* est un système de communication bactérien qui permet la régulation de l'expression de certains gènes notamment de virulence en fonction du nombre d'individus au sein d'une population et qui s'effectue *via* la production de signaux moléculaires. Une étude menée par Rasmussen *et al.* (2005) montre que des espèces de *Penicillium* produisent des métabolites

(notamment la patuline et l'acide pénicillique) qui sont capables d'interférer avec le *quorum sensing* mis en place par des espèces de *Pseudomonas*. Ainsi, le traitement avec de la patuline de souris infectées au niveau pulmonaire par *Pseudomonas aeruginosa* a mené à une éradication de la bactérie.

2.3.4. Acquisition du fer

Dans les différents milieux dans lesquels ils évoluent et dans les différentes conditions auxquelles ils sont confrontés, les champignons doivent lutter pour leur survie et accomplir leur cycle de vie. Pour cela, la compétition pour le fer est un paramètre important. Cet élément qui est primordial pour le métabolisme fongique est un des plus abondants sur Terre mais n'est que peu biodisponible dans l'environnement aérobie (pas plus de 10^{-18} M d'après Neilands, 1995). En effet, dans ces conditions le fer est majoritairement sous forme oxydée et forme des colloïdes (particules agrégées) d'oxyhydroxyde de fer qui ont une faible solubilité et qui sont par conséquent bioindisponibles. Ainsi, pour assimiler et monopoliser le fer environnant, les champignons produisent des molécules (NRP) nommées sidérophores. Il s'agit de métabolites ayant une très forte affinité pour le fer (sous sa forme ferrique ; Fe^{3+}). L'acide harzianique produit par l'espèce *Trichoderma harzianum* qui est couramment utilisée dans le cadre de la lutte biologique a par exemple montré une forte affinité pour les ions Fe^{3+} (Vinale *et al.*, 2013). La sécrétion de sidérophores dans le milieu permet de solubiliser le fer environnant et de le chélater. Par des mécanismes d'acquisition spécifiques (Haas *et al.*, 2008) les organismes producteurs peuvent assimiler le fer présent au niveau des sidérophores. C'est le cas d'*Aspergillus fumigatus* qui produit deux sidérophores extracellulaires capables de chélater le fer (Haas, 2014). Il s'agit de la fusarine C et de la triacétylfusarine C (TAFC). La production de ces deux molécules fait intervenir une NRPS nommée SidD. Une fois que les sidérophores sont liés au fer extracellulaire, le couple sidérophore-fer est importé vers la cellule grâce à des transporteurs nommés SIT (Siderophore-Iron Transporters).

Certains organismes possèdent également des systèmes d'acquisition originaux qui leur permettent d'acquérir et d'utiliser le fer chélaté exclusivement par des sidérophores produits par d'autres microorganismes. Par exemple, *A. nidulans* peut assimiler la ferrirubine produite par *Aspergillus ochraceus* ainsi que les entérobactines produites par différentes Entérobactéries et

Streptomyces (Haas, 2003). Ces mécanismes pourraient ainsi avoir évolué dans le cadre de compétitions interspécifiques.

Les sidérophores peuvent aussi jouer un rôle de stockage du fer au sein des cellules fongiques (Matzanke *et al.*, 1987). *A. fumigatus* produit deux sidérophores intracellulaires de ce type : (i) la ferricrocine qui est impliquée dans la distribution et le stockage du fer dans les hyphes et (ii) l'hydroxyferricrocine qui joue un rôle dans les conidies (Haas, 2014).

La lutte pour l'acquisition du fer environnant n'a pas uniquement lieu entre les champignons mais également avec les plantes. Ainsi, le pouvoir pathogène de certains agents repose sur la production de sidérophores. C'est par exemple le cas chez *Cochliobolus heterostrophus*. Une souche délétée dans le gène NPS6 codant une NRPS impliquée dans la production d'un sidérophore s'avère affectée au niveau de l'agressivité sur maïs (Oide *et al.*, 2006).

2.3.5. Protection vis-à-vis de différents stress

Parmi les métabolites secondaires fongiques, on retrouve de nombreux pigments, facilement reconnaissables à leur couleur caractéristique. Le plus connu de ces métabolites est la mélanine qui est caractérisée par sa couleur brune à noire. Ce métabolite de poids moléculaire important résulte de la polymérisation oxydative de précurseurs phénoliques (Riley, 1997) et peut être synthétisé *via* deux voies distinctes chez les champignons. La première voie consiste en la polymérisation de composés phénoliques provenant de l'environnement ou de voies métaboliques. C'est par exemple le cas de la pyomélanine chez *Aspergillus fumigatus* qui est synthétisée à partir de composés issus de la voie de dégradation de la tyrosine (Schmaler-Ripcke *et al.*, 2009). Ce type de mélanine est dénommé DOPA (dihydroxy phenylalanine) mélanine. L'autre voie possible pour la synthèse de mélanine implique la synthèse *de novo* du composé phénolique nommé 1,8-dihydroxynaphthalene (DHN) par une PKS. S'ensuivra une polymérisation qui mènera à la production de DHN-mélanine (Henson *et al.*, 1999). La mélanine est présente dans différentes structures fongiques et notamment les structures de dissémination comme les conidies ou de résistance / protection comme les sclérotés. Il est généralement admis que la mélanine a un rôle de protection vis-à-vis des rayonnements UV, la

dessiccation ou encore les températures extrêmes en raison de sa forte résistance à la dégradation. Ainsi, les microsclérotés non-mélanisés de souches mutantes de *Verticillium dahliae* sont plus sensibles aux rayonnements UV que les microsclérotés de la souche sauvage (Bell *et al.*, 1976). De même, chez *Alternaria alternata*, la mélanine est impliquée dans la résistance des conidies aux UV (Kawamura *et al.*, 1999). Un autre rôle de la mélanine a été mis en évidence, notamment chez *M. oryzae* et des espèces du genre *Colletotrichum*. Pour pénétrer la paroi végétale, ces champignons produisent des appressoria. Ces cellules se différencient et de la mélanine s'accumule au niveau des parois excepté dans la zone de contact avec l'hôte. Ce dépôt permet de résister à la pression de turgescence énorme engendrée (entre 5 et 8 MPa) par l'accumulation de glycérol (environ 3 M) qui attire l'eau par osmose (de Jong *et al.*, 1997). Ces structures permettent donc aux champignons de pénétrer mécaniquement la paroi de leur hôte sans que des enzymes lytiques n'interviennent. Ainsi, des souches mutantes de *M. oryzae* ou de *Colletotrichum spp.* déficientes dans la production de mélanine perdent la capacité de pénétrer leurs hôtes (Henson *et al.*, 1999). La mélanine est aussi nécessaire au pouvoir pathogène d'*A. fumigatus* lors de l'infection de souris (Heinekamp *et al.*, 2013). La mélanine contient aussi des radicaux libres stables qui lui permettent de jouer un rôle protecteur vis-à-vis des ROS. C'est le cas chez *A. fumigatus* chez qui la pyomélanine est impliquée dans la résistance aux ROS (Schmaler-Ripcke *et al.*, 2009).

2.3.6. Pouvoir pathogène et infection

Dans de nombreux cas, la production de métabolites secondaires a été démontrée comme ayant un rôle dans le pouvoir pathogène fongique. Ainsi, la production de toxines qu'elles soient hôte-spécifiques ou non hôte-spécifiques permet au champignon d'induire des symptômes.

2.3.6.1. Les toxines hôte-spécifiques

Les toxines hôte-spécifiques (HSTs) sont considérées comme des effecteurs produits par des agents pathogènes qui induisent la maladie uniquement sur quelques cultivars de certaines espèces qui possèdent un gène de susceptibilité. Ce type d'interaction peut alors être considéré comme l'inverse du modèle gène pour gène de Flor (1942). Pour que l'interaction soit dite compatible et que la maladie soit provoquée, il faut à la fois que le champignon possède le gène permettant la synthèse de la HST et

que la plante exprime un gène de susceptibilité. Le pouvoir pathogène de ces champignons repose parfois sur la seule capacité à produire ce genre de métabolites. Les HSTs miment souvent l'effet d'une attaque par le champignon producteur et peuvent être actives à des concentrations comprises entre 10 pM et 1 µM (Walton, 1996). Par exemple, *Cochliobolus carbonum* produit la HC-toxine essentielle pour l'infection de cultivars de maïs qui possèdent le gène de susceptibilité Hm (Brosch *et al.*, 1995). Ce gène code une HC-toxine réductase et lorsque les cultivars de maïs sont homozygotes récessifs à ce locus la maladie a lieu (Meeley et Walton, 1991). Dans ce cas, il a été montré que la HC-toxine va interférer avec l'acétylation réversible des histones qui est impliquée dans des processus cellulaires importants comme le cycle cellulaire ou l'expression de gènes (Brosch *et al.*, 1995).

Un autre exemple très connu de HST est la T-toxine produite par *Cochliobolus heterostrophus* qui attaque le maïs. Ce métabolite cible la protéine mitochondriale nommée URF13. Cette interaction mène à un changement de conformation de la protéine et crée un pore dans la membrane de l'organe. Ce phénomène entraîne une altération de la phosphorylation oxydative et de la respiration ainsi qu'une fuite de nutriments et de calcium (Turgeon et Baker, 2007).

La totalité des HSTs mises en évidence à ce jour sont produites par des champignons appartenant à un groupe taxonomique restreint (ordre des Pleosporales de la classe des Dothideomycetes). On y retrouve par exemple des espèces de *Cochliobolus*, d'*Alternaria* et de *Pyrenophora*. Friesen *et al.* (2008) suggèrent que ces agents pathogènes doivent avoir une propension conservée pour acquérir les gènes permettant la synthèse de HSTs par transfert horizontal.

2.3.6.2. Les toxines non hôte-spécifiques

A l'inverse des HSTs, certains champignons pathogènes produisent des toxines non hôte-spécifiques (NHSTs) qui ont un rôle seulement partiel dans leur pouvoir pathogène. Elles sont souvent dispensables mais sont présumées conférer un avantage sélectif au champignon (Howlett, 2006). Plusieurs de ces toxines ont été démontrées comme induisant la mort cellulaire programmée chez l'hôte. C'est par exemple le cas de la fumonisine B produites par des espèces du genre *Fusarium*. Cette toxine entraîne une diminution de la présence d'ATP dans le milieu extracellulaire et mène à

l'observation d'une mort cellulaire programmée chez *Arabidopsis thaliana* (Chivasa *et al.*, 2005). L'ajout exogène d'ATP supprime l'effet de la toxine, ce qui confirme que la mort cellulaire entraînée par certaines NHSTs peut être due à une diminution de la concentration en ATP dans le milieu extracellulaire.

Une autre NHST est la sirodesmine PL produite par *L. maculans* (Elliott *et al.*, 2007). Une souche mutante déficiente dans la production de cette toxine engendre des nécroses similaires à celles de la souche sauvage sur colza. En revanche, le mutant s'avère deux fois moins agressif au niveau des tiges, ce qui semble suggérer que ce métabolite pourrait être impliqué dans les phases tardives de l'infection (nécrose du collet) et pas dans les phases précoces (infection des cotylédons) (Howlett, 2006).

Le pouvoir pathogène de *B. cinerea* repose en partie sur la production de deux NHSTs qui sont le botrydial et l'acide botcinique (Dalmais *et al.*, 2011). Ces deux métabolites ainsi que leurs dérivés respectifs sont au cœur du sujet de ce manuscrit et seront donc plus largement présentés plus loin dans ce document.

2.4. Agencement en clusters des gènes du métabolisme secondaire

Durant l'ère pré-génomique, l'étude des métabolites secondaires était largement dominée par les sociétés industrielles qui possédaient des méthodes de criblage à haut débit pour identifier et commercialiser des substances bioactives (Keller *et al.*, 2005). De façon générale, seule la structure moléculaire de ces substances était étudiée et l'optimisation des conditions de culture était le seul levier pour moduler la production des métabolites secondaires. Néanmoins, quelques voies de biosynthèse de métabolites secondaires ont fait l'objet d'études grâce notamment à l'utilisation de mutants déficients dans la production de ces métabolites et de marqueurs isotopiques. Entre la découverte des opérons dans les années 1960 et jusqu'aux années 1990, il était admis que les gènes qui, chez les eucaryotes, étaient impliqués dans un même processus biologique n'étaient pas liés au sein du génome. Ce n'est qu'avec le développement croissant des techniques et du nombre de clonages de gènes eucaryotiques qu'un dogme a été établi : les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse

d'un métabolite secondaire sont dans la plupart des cas agencés en « clusters » au sein du génome (Keller et Hohn, 1997). Cette caractéristique est particulièrement intéressante dans le cadre de l'exploitation des génomes (*genome mining*) et est notamment utilisée par les outils de prédiction des clusters comme SMURF (Khaldi *et al.*, 2010) ou antiSMASH (Weber *et al.*, 2015). Il a été spéculé que le regroupement physique de ces gènes du métabolisme secondaire pourrait avoir eu lieu durant l'évolution en raison du fait que cette organisation pourrait conférer un avantage écologique sélectif (Martin et Liras, 1989). Deux grandes hypothèses ont été émises pour expliquer cet agencement conservé : (i) il permet une régulation commune des gènes par des phénomènes chromatinien et (ii) cela aurait un intérêt évolutif dans le cadre de transferts horizontaux qui permettent l'acquisition simultanée des gènes permettant la production d'un métabolite (Keller *et al.*, 2005).

L'étude de nombreuses voies de biosynthèse a permis de mettre en évidence que les clusters du métabolisme secondaire fongique sont généralement constitués de gènes codant une ou plusieurs enzymes clé (les PKS ou les NRPS par exemple). Ces enzymes sont responsables de l'entrée dans la voie de biosynthèse des métabolites secondaires à partir d'un précurseur du métabolisme primaire comme le tryptophane. Des enzymes de modification sont également produites par des gènes des clusters du métabolisme secondaire. Ces enzymes sont impliquées dans la modification de la molécule core produite par les enzymes clés. Il peut par exemple s'agir de mono-oxygénases, de déshydrogénases ou encore de thioestérases. Dans certains clusters du métabolisme secondaire (60 % d'après Brakhage, 2012), un facteur de transcription (FT) est produit à partir d'un des gènes du cluster. Dans ce cas, le FT régule spécifiquement les gènes du cluster. Certains clusters contiennent plusieurs régulateurs qu'ils soient des FTs ou des régulateurs de type NmrA-like (Cf. **Chapitre I**; Wiemann *et al.*, 2009; Studt *et al.*, 2016). Des gènes impliqués dans la détoxification vis-à-vis d'un métabolite toxique peuvent aussi se trouver dans les clusters. Finalement, un transporteur impliqué dans l'excrétion des métabolites générés à partir du cluster est parfois produit par un des gènes. La **Fig. 11** présente le cluster chez *Fusarium fujikuroi* permettant la production de bikavérine (Wiemann *et al.*, 2009).

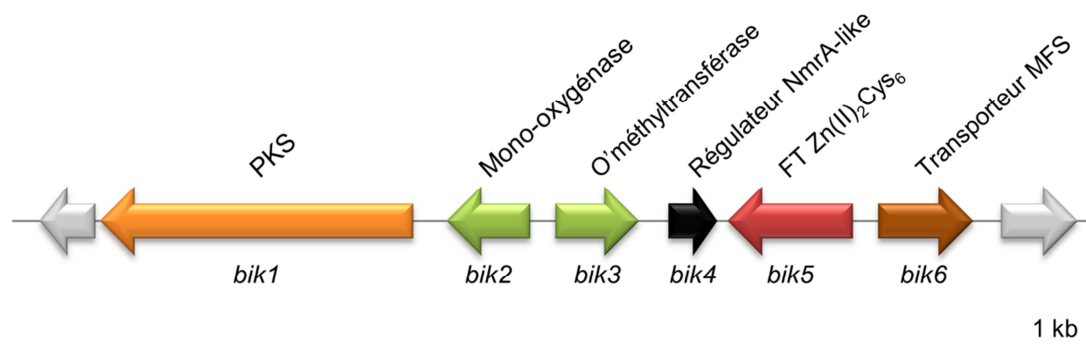


Fig. 11. Présentation du cluster de la bikavérine chez *Fusarium fujikuroi*.

Le cluster présenté possède plusieurs éléments typiques des clusters du métabolisme secondaire fongique, c'est-à-dire des gènes codant une enzyme clé de type PKS (*bik1*), des enzymes de modification (*bik2* et *bik3*), un FT de type $Zn(II)_2Cys_6$ (*bik5*) ainsi qu'un transporteur MFS (*bik6*). De plus, ce cluster possède un gène (*bik4*) codant un régulateur de type NmrA-like (assez rarement retrouvé dans les clusters du métabolisme secondaire fongique) dont le mode d'action n'a jusqu'ici pas été expliqué.

3. La régulation du métabolisme secondaire fongique

Les champignons sont des organismes qui ne sont pas à proprement parler capables de se mouvoir et sont donc contraints de subir leur environnement. Afin de répondre de façon appropriée aux différents changements environnementaux, des mécanismes de régulation très fins ont été sélectionnés au cours de l'évolution. La régulation de l'expression génique est notamment influencée par des signaux environnementaux perçus par les champignons au niveau de récepteurs. Ces signaux sont ensuite transduits en signaux intracellulaires impliquant des événements de phosphorylation ou des systèmes avec messagers secondaires et résultent finalement en l'activation/l'inactivation de facteurs de transcriptions (FTs). La modulation de l'expression génique qui en résulte permet la réponse rapide appropriée aux stimuli. Certaines voies de transduction des signaux sont conservées parmi les levures, les champignons filamenteux, les plantes ou les animaux alors que d'autres ne sont retrouvées qu'au sein de certains organismes (Bahn *et al.*, 2007). Sachant que le répertoire de FTs de chaque espèce lui est spécifique, les voies de transduction des signaux conservées peuvent mener à des réponses différentes au sein d'organismes très proches.

Nous avons vu précédemment que les métabolites secondaires pouvait dans certains cas conférer un avantage à son organisme producteur et que leur production était limitée et orchestrée de façon précise dans le temps, souvent en parallèle d'une transition développementale ou en fonction

des conditions environnementales. La partie suivante vise à présenter le double contrôle (chromatinien / transcriptionnel) impliqué dans la régulation du métabolisme secondaire fongique.

3.1. L'implication des facteurs de transcriptions (FTs)

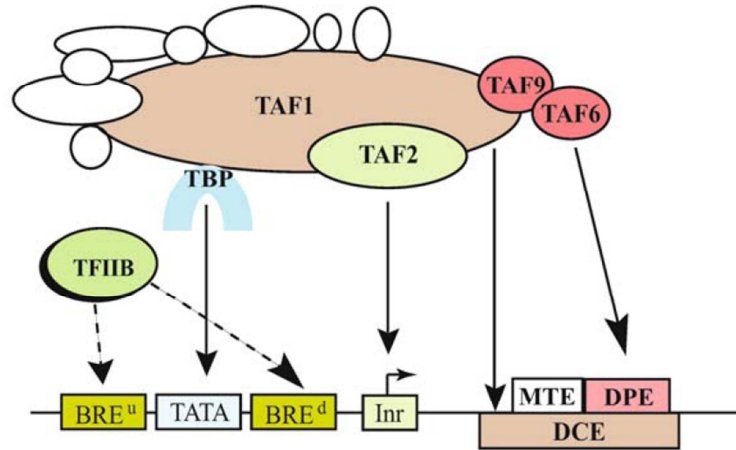
3.1.1. Les FTs ont un rôle fondamental dans le contrôle de la transcription

La transcription, qui permet la synthèse d'un brin d'ARN à partir d'une matrice d'ADN, est fondamentale pour la production des protéines et donc pour tous les mécanismes vitaux pour les organismes. Néanmoins, pour assurer le bon développement et la bonne organisation morphologique, l'ensemble des gènes ne doit pas être exprimé simultanément. Des mécanismes de régulation interviennent ainsi pour permettre l'activation ou la répression de la transcription dans le temps et dans l'espace.

La transcription implique le recrutement de différents FTs dits généraux formant la machinerie transcriptionnelle de base (Thomas et Chiang, 2006) au niveau d'une séquence appelée core promoteur (Smale et Kadonaga, 2003). Ces protéines permettent le recrutement de l'ARN polymérase II pour former le complexe de pré-initiation. Les différentes séquences du core promoteur et leur rôle sont résumés dans la **Fig. 12**. La plus connue d'entre elles est probablement la TATA box, requise pour l'activation de certains gènes, qui est conservée des Archées à l'Homme. La présence de ces protéines ne permet néanmoins qu'une expression génique faible. L'intervention de FTs agissant en amont du core promoteur au niveau de l'ADN permet de réguler (positivement ou négativement) l'intensité de la transcription. On parle de régulation en cis. Les séquences auxquelles se lient les FTs sont communément appelées UAS pour Upstream Activator Sequence.

La complexité et la multiplicité des mécanismes impliqués dans la transcription permettent aux organismes de pouvoir répondre à un nombre important de stimuli de façon différente en modulant l'expression génique. Le phénotype observé dans ces différentes conditions découle ainsi directement de ces phénomènes de régulation. Il a été démontré que chez les organismes les plus complexes (Vertébrés), le nombre ou l'acquisition des gènes n'étaient pas impliqués dans une évolution plus importante par rapport aux moins évolués (Invertébrés). En revanche, la complexité

croissante des organismes proviendrait plutôt de l'élaboration progressive des systèmes de régulation des gènes. Ainsi, plus un organisme est complexe et plus sa richesse et sa diversité en FTs sont importantes (Levine et Tjian, 2003; Amoutzias *et al.*, 2006). Le génome de la levure contient environ 300 FTs (Wyrick et Young, 2002) et ceux du nématode *Caenorhabditis elegans* et de la drosophile environ 1000 (Ruvkun et Hobert, 1998; Aoyagi et Wassarman, 2000). Chez l'Homme, on compte environ 3000 de ces protéines (Lander *et al.*, 2001). Le ratio du nombre de FTs par rapport au nombre de gènes s'élève alors à 1/20 pour la levure contre 1/10 chez l'Homme. Ce doublement du nombre relatif de FTs mène à une complexité des mécanismes de régulation bien plus importante. En plus d'un nombre plus élevé de FTs, les organismes les plus évolués (comme les Métazoaires) possèdent plus de co-activateurs ou de mécanismes de remodelage de la chromatine que les organismes plus basiques comme la levure (Levine et Tjian, 2003).



Core Promoter Element	Position	Consensus Sequence (5' to 3')	Bound Protein
BRE ^u	-38 to -32	(G/C)(G/C)(G/A)CGCC	TFIIB
TATA	-31 to -24	TATA(A/T)A(A/T)(A/G)	TBP
BRE ^d	-23 to -17	(G/A)T(T/G/A)(T/G)(G/T)(T/G)(T/G)	TFIIB
Inr	-2 to +5	PyPyAN(T/A)PyPy	TAF1/TAF2
MTE	+18 to +29	C(G/C)A(A/G)C(G/C)(G/C)AACG(G/C)	n.a.
DPE	+28 to +34	(A/G)G(A/T)CGTG	TAF6/TAF9
DCE	3 subelements +6 to +11 +16 to +21 +30 to +34	core sequence: S _I CTTC S _{II} CTGT S _{III} AGC	TAF1

Fig. 12. Schéma de la formation du complexe de pré-initiation au niveau des éléments conservés du core promoteur.

La TATA box est une séquence conservée chez les organismes et qui est présente dans les promoteurs de certains gènes. Elle permet le recrutement de TBP (TATA-Binding Protein) qui se fixe à cette séquence et entraîne la formation du complexe de pré-initiation. La séquence Inr (Initiator) est capable d'initier la transcription seule ou de concert avec la TATA box. Les séquences DPE (Downstream Promoter Element), DCE (Downstream Core Element) et MTE (Motif Ten Element) sont également impliquées dans la formation du complexe de pré-initiation. Les séquences DPE et DCE semblent mutuellement exclusives. Finalement, les séquences BRE^u et BRE^d (BRE : TFIIB-recognition Element) permettent le recrutement des FTs généraux et semblent présents même au sein des promoteurs ne contenant pas de TATA box. Les informations présentées ont été obtenues à partir de différentes études sur des organismes eucaryotes. L'illustration et les informations sont extraites de Thomas et Chiang (2006).

3.1.2. Structure des FTs et présentation de différentes familles chez les champignons

Les FTs sont des protéines qui sont généralement composées de plusieurs domaines impliqués dans trois fonctions majeures. La première fonction est l'établissement du contact avec l'ADN qui s'effectue à travers le domaine de liaison à l'ADN aussi appelé DBD (pour DNA Binding Domain). C'est sur la base de ce domaine que sont généralement classés les FTs (**Cf. ci-dessous**). Les FTs peuvent, *via* une interaction avec des co-facteurs, également se lier à la machinerie transcriptionnelle de base. Les domaines impliqués dans ces phénomènes sont dénommés domaines de trans-activation (TAD pour Trans-Activation Domain) et sont généralement distincts des DBD. Les FTs peuvent former des dimères pour réguler l'expression de gènes. Il peut s'agir d'homodimères entre deux FTs identiques ou d'hétérodimères quand deux FTs différents sont impliqués. Cette interaction directe protéine-protéine peut s'effectuer selon les cas au niveau du DBD, du domaine de trans-activation ou encore d'autres régions distinctes. Optionnellement, un domaine dit SSD (pour Signal Sensing Domain) peut être présent directement au sein du FT. Ce domaine permet de recevoir un signal (*via* une molécule) et de transmettre l'information en allant réguler différents gènes.

Les FTs peuvent être classés en différentes catégories. Les superfamilles (disponibles sur Superfamily database par Madera 2004) sont basées sur la classification structurale des protéines (SCOP ; Murzin 1995). Les membres d'une même superfamille présentent des indices d'une ascendance évolutive commune au niveau structural, fonctionnel et de séquence. Les familles, qui représentent un rang inférieur aux superfamilles, regroupent des protéines qui possèdent des domaines conservés. Elles sont définies par les prédictions PFAM (Bateman, 2004). Dans la partie qui suit, les superfamilles/familles les plus communément rencontrées chez les champignons sont présentées.

3.1.2.1. Les FTs à DBD basique

3.1.2.1.1. Les FTs à glissière à leucine (PF00170)

Ces FTs possèdent un domaine nommé bZIP (basic leucine ZIPper). Ce dernier est composé d'une région N terminale basique impliquée dans la liaison à l'ADN (Ellenberger *et al.*, 1992) et d'une glissière à leucine en C terminale impliquée dans la dimérisation des FTs (Landschulz *et al.*, 1988). La

région de glissière à leucine est composée de deux hélices alpha parallèles qui sont enroulées l'une autour de l'autre pour former une structure dite coiled-coil qui est impliquée dans la dimérisation (Baxevanis et Vinson, 1993). Cette structure super-secondaire est généralement schématisée sous la forme $(abcdefg)_n$ où les acides aminés qui se trouvent en position a et d sont hydrophobes. Lorsque la protéine est repliée, ce sont ces acides aminés qui vont pouvoir interagir avec une protéine qui possède une structure identique. Dans le cas des FTs bZIP, les acides aminés d sont des résidus leucine, ainsi espacés régulièrement par 6 acides aminés (LxxxxxxL) et formant 4 heptades répétées (Hurst, 1995). Le schéma de l'interaction entre un dimère de FTs bZIP et l'ADN est présenté en **Fig. 13**.

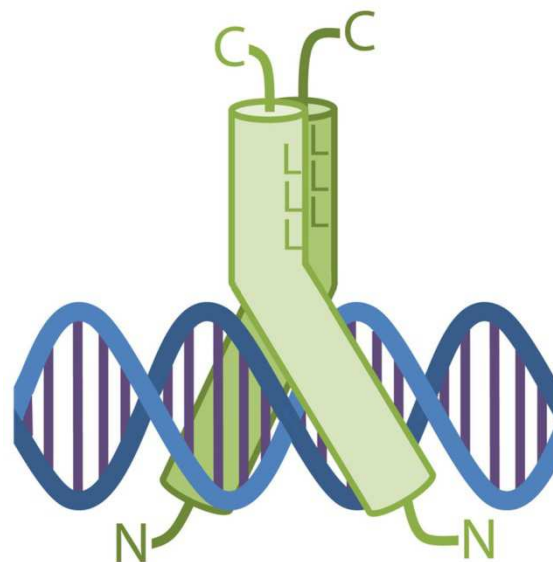


Fig. 13. Schéma de l'interaction entre un dimères de FTs bZIP et une molécule d'ADN.
Les L représentent les leucines impliquées dans la dimérisation du dimère bZIP. L'image a été extraite de Llorca *et al.* (2014).

Parmi les champignons filamenteux, de nombreux FTs bZIP ont d'ores-et-déjà été caractérisés. Ces régulateurs interviennent généralement dans des fonctions universellement conservées parmi les différents règnes comme par exemple la réponse aux stress, l'autophagie ou encore l'acquisition de nutriments dans des conditions de carence. Un des exemples les plus connu est l'homologue du FT YAP1 de la levure qui intervient dans la survie des champignons *C. heterostrophus* et *A. fumigatus* en réponse à un fort stress oxydatif (Lev *et al.*, 2005; Lessing *et al.*,

2007). MeaB, un composant de la voie de régulation de l'azote chez *A. nidulans* (Wong *et al.*, 2007) est un autre exemple de ce type de FT.

3.1.2.1.2. Les FTs bHLH (superfamille 47459)

Les FTs de type basique hélice-boucle-hélice (bHLH pour basic Helix-Loop-Helix) sont caractérisés par leur DBD bipartite conservé qui est impliqué dans le mécanisme de dimérisation qui rend le monomère inactif en dimères capables d'activer l'expression génique. Le DBD, présenté en **Fig. 14**, est composé de deux hélices alpha reliées par une boucle. L'une de ces hélices est plus grande que l'autre et contient des acides aminés basiques qui permettront, lorsqu'un dimère sera formé, la liaison à la molécule d'ADN. L'autre hélice, plus petite, intervient dans l'interaction avec le second membre du dimère (homodimère ou hétérodimère). Il a été démontré que chez les Mammifères ainsi que chez la levure, ce type de FTs pouvait former de multiples combinaisons d'hétérodimères (Robinson *et al.*, 2000). La séquence consensus appelée E-box à laquelle se lient les dimères de FTs BHLH est la suivante : CANNTG (Revue par Massari et Murre 2000). Chez les champignons filamenteux, assez peu de FTs bHLH ont été caractérisés. Chez *N. crassa*, NUC-1 est impliqué dans l'acquisition du phosphore (Peleg *et al.*, 1996). Chez *A. nidulans*, devR est un composant de la voie de transduction de l'histidine kinase TcsA et est requis pour la formation de conidies et le développement sexué (Tüncher *et al.*, 2004).

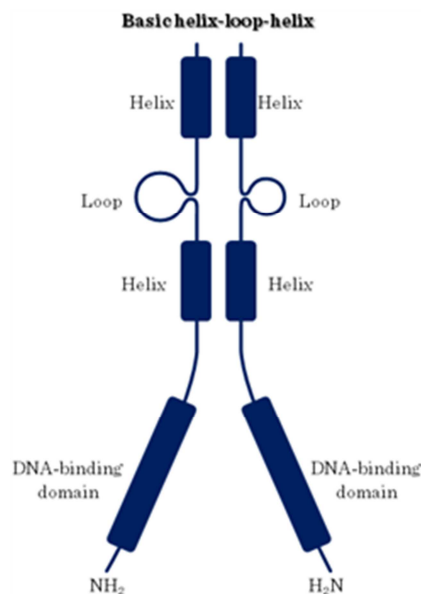


Fig. 14. Représentation schématique du DBD des FTs de type bHLH.

L'illustration a été extraite du lien suivant :

http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalalom/tamop425/0011_1A_Jelatvitel_en_book/ch02.html

3.1.2.1.3. Les FTs à doigts de zinc

Les FTs à doigts de zinc comportent plusieurs familles en fonction des types de DBD. Les trois principales sont présentées dans le **Tableau 1**. Le nom doigt de zinc provient de la capacité de ces protéines à lier un ou plusieurs atomes de zinc. C'est cette liaison qui permet par la suite l'interaction avec l'ADN.

Tableau 1. Présentation des trois familles principales de FTs à doigts de zinc.

D'après MacPherson *et al.* (2006)

Famille de FTs à doigt de zinc	Séquence consensus du DBD	Exemple
C ₂ H ₂	Cys-X ₂₋₄ -Cys-X ₁₂ -His-X ₃₋₅ -His	TFIIIA (Xénope)
GATA	Cys-X ₂ -Cys-X _n -Cys-X ₂ -Cys-X _n -Cys-X ₂ -Cys-X _n -Cys-X ₂ -Cys	Récepteurs aux glucocorticoïdes
Zn(II) ₂ Cys ₆	Cys-X ₂ -Cys-X ₆ -Cys-X ₅₋₁₂ -Cys-X ₂ -Cys-X ₆₋₈ -Cys	Gal4p (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)

3.1.2.1.4. Les FTs GATA (PF00320)

Ce type de FTs peut lier un atome de zinc grâce à un domaine qui comporte le motif suivant : Cys-X₂-Cys-X_n-Cys-X₂-Cys-X_n-Cys-X₂-Cys-X_n-Cys-X₂-Cys. Il permet la liaison au niveau des séquences GATA/GATC de l'ADN. Chez les champignons filamenteux, des FTs GATA sont impliqués dans divers mécanismes. Un exemple connu est le FT global AreA qui a été démontré comme étant un régulateur clé du métabolisme azoté chez plusieurs champignons filamenteux (Fu et Marzluf, 1987). D'autres FTs GATA conservés parmi les champignons sont WC-1 et WC-2 (White Collar) qui sont des protéines agissant en dimères pour réguler en réponse à la lumière des processus clés comme la conidiation, la synthèse de caroténoïdes ou encore le rythme circadien (Ballario et Macino, 1997; Chen *et al.*, 2009). Chez *B. cinerea*, BcWcl1 et BcWcl2 sont impliqués dans la différenciation morphologique en réponse à la lumière (Canessa *et al.*, 2013).

3.1.2.1.5. Les FTs Zn(II)₂Cys₆ (PF00172)

Les FTs les plus représentés chez les champignons Ascomycètes sont les FTs appartenant à la superfamille Zn(II)₂Cys₆ aussi retrouvée sous le nom de Zn₂Cys₆ ou zinc cluster. Contrairement aux autres FTs à doigts de zinc, les FTs zinc cluster possèdent six résidus cystéines qui vont être impliqués dans la liaison de deux atomes de zinc. Le domaine correspondant est très conservé et se présente sous la forme CX₂CX₆CX₆CX₂CX₆C. La première protéine caractérisée possédant ce domaine est Gal4p chez *S. cerevisiae* qui est impliquée dans l'utilisation du galactose (Pan et Coleman, 1990). Ce type de DBD semble d'après les données disponibles jusqu'ici uniquement présents chez les champignons. Les FTs zinc cluster peuvent agir dans de multiples configurations (revue par MacPherson, Larochelle, et Turcotte 2006). On les retrouve par exemple en monomères, homodimères ou hétérodimères. La structure de l'interaction entre Gal4p et l'ADN est représentée en **Fig. 15**. Les FTs Zn(II)₂Cys₆ sont impliqués dans de nombreux et divers processus au sein de la cellule comme le métabolisme des sucres ou des acides aminés, la respiration, le développement de structures de reproduction ou encore l'utilisation du nitrate. De nombreux régulateurs du métabolisme secondaire fongique font également partie de cette superfamille (**Cf. partie 3.1.4**). Quelques exemples de FTs zinc cluster caractérisés sont présentés dans le **Tableau 2**.

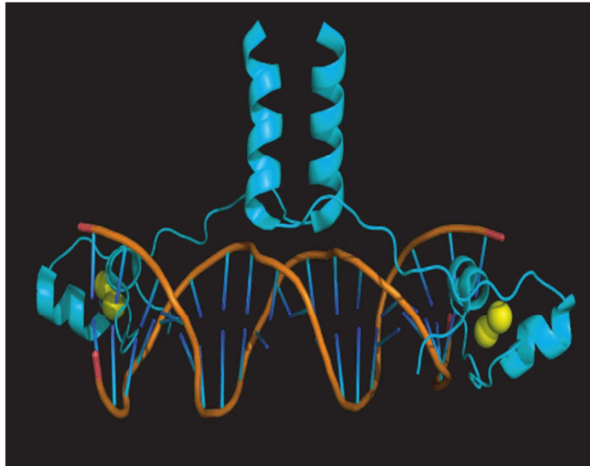


Fig. 15. Représentation de la structure cristalline du DBD de Gal4p lors de l'interaction avec l'ADN.

Gal4p forme un homodimère et se lie à l'ADN au niveau de motifs répétés inversés (MacPherson *et al.*, 2006). Les sphères jaunes correspondent aux atomes de zinc.

Tableau 2. Présentation de rôles divers de FT Zn(II)₂Cys₆ fongiques.

FT Zn(II) ₂ Cys ₆	Rôle	Organisme	Référence
PnA	voie catabolique de la proline	<i>Aspergillus nidulans</i>	Gómez <i>et al.</i> (2002)
FacB	activation des gènes de régulation de l'acétate	<i>Aspergillus nidulans</i>	Todd <i>et al.</i> (1998)
Pro1+	développement des structures de reproduction	<i>Sordaria macrospora</i>	Masloff <i>et al.</i> (1999)
Nit4	activateur de la voie d'assimilation du nitrate	<i>Neurospora crassa</i>	Feng et Marzluf (1998)
AflR	régulation des gènes de l'aflatoxine	<i>Aspergillus spp.</i>	Fernandes <i>et al.</i> (1998)

Les FTs $Zn(II)_2Cys_6$ auraient une tendance à se fixer à l'ADN au niveau de régions contenant des triplets composés de G et C (souvent CGG). La répétition de ces motifs sur l'ADN peut être présente sous forme directe, inversée ou retournée (**Fig. 16**). L'espacement entre ces triplets est important pour la liaison du FT. Par exemple, Gal4p se lie à deux triplets CGG inversés espacés de 11 pb (Vashee *et al.*, 1993), soit le motif suivant : CGG-N₁₁-CCG.

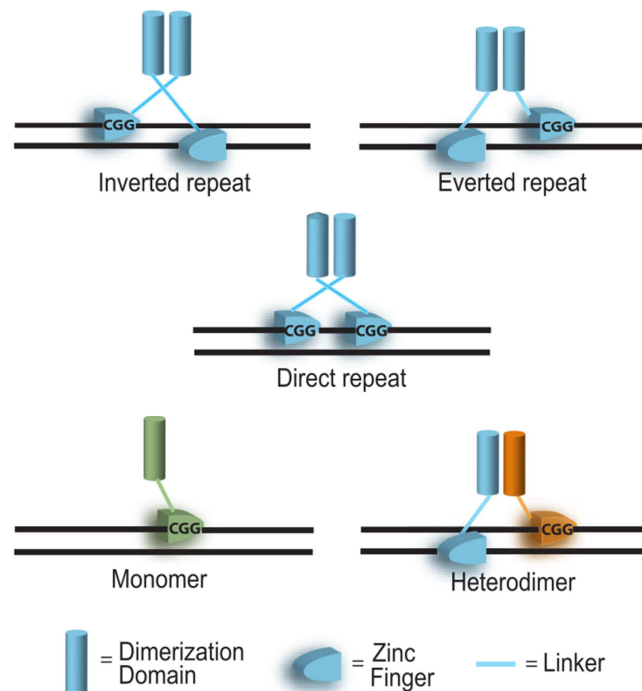


Fig. 16. Représentation des différents cas de figures pour l'interaction entre les FTs $Zn(II)_2Cys_6$ et les motifs de fixation.

Les FTs de type $Zn(II)_2Cys_6$ peuvent se lier à l'ADN sous forme de monomère, d'homodimère ou d'hétérodimère. La répétition des motifs de fixation peut être inversée, retournée ou directe. Illustration extraite de MacPherson *et al.* (2006).

3.1.2.1.6. Les FTs à domaine Fungal Trans (PF04082)

Il arrive dans de nombreux cas que les FTs zinc cluster possèdent en plus de leur DBD caractéristique un domaine dit Fungal Trans ou Middle Homology Region (MHR). Ce domaine dont le rôle est jusqu'ici inconnu, est positionné en aval du domaine $Zn(II)_2Cys_6$ qui a tendance à être localisé en partie Nter de la protéine. Il est supposé que le domaine Fungal Trans pourrait avoir un rôle dans la structure ou la fonction des protéines (Schjerling et Holmberg, 1996). Cependant, il arrive aussi que des protéines présentent un domaine Fungal Trans sans domaine de liaison à l'ADN $Zn(II)_2Cys_6$. Un

article datant de 2015 (par Kim *et al.*) démontre le rôle d'une telle protéine (Sol4) en tant que régulateur spécifique d'un cluster du métabolisme secondaire impliqué dans la production de solanapyrones chez *Ascochyta rabiei*. La caractérisation d'autres protéines de ce type reste néanmoins requise pour confirmer le rôle de ce domaine et des approches mécanistiques devront être menées pour déterminer son mode d'action.

3.1.2.1.7. Les FTs C₂H₂ (PF00096)

Les FTs appartenant à la famille des C₂H₂ sont ubiquistes et sont largement représentés parmi les plantes, les animaux mais aussi chez l'Homme. Le domaine correspondant est caractérisé par le motif Cys-X₂₋₄-Cys-X₁₂-His-X₃₋₅-His. Les deux cystéines et les deux histidines sont impliquées dans la liaison d'un atome de zinc (**Fig. 17**). C'est la deuxième famille la plus représentée chez les champignons filamenteux. Ils sont impliqués dans une plénitude de mécanismes cellulaires comme le développement, la différenciation, le cycle cellulaire ou encore la réponse au stress ou le pouvoir pathogène. Un des FTs C₂H₂ les plus connus est Crz1. Il s'agit d'une protéine qui intervient dans la voie de la calcineurine, une phosphatase activée par le complexe Ca²⁺/calmoduline. Chez *S. cerevisiae*, la calcineurine est dispensable dans le cadre d'une croissance sur milieu standard mais requis pour faire face à différents stress. Chez *A. fumigatus*, son rôle dans la croissance, la morphologie hyphale, la conidiation ou encore le pouvoir pathogène a été mis en évidence (Steinbach *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007). Chez *M. oryzae*, la calcineurine est notamment impliquée dans la formation de l'appressorium (Viaud *et al.*, 2002).

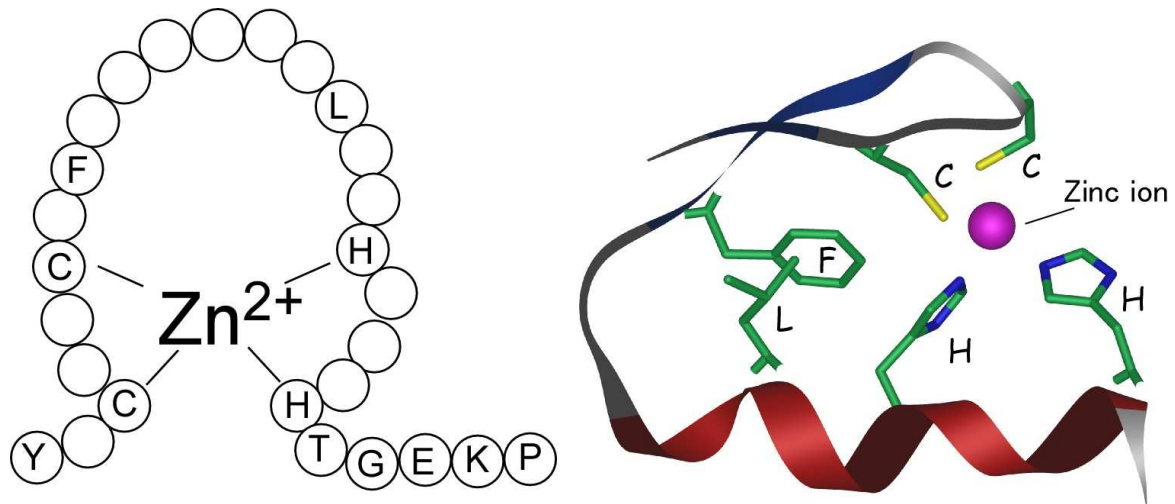


Fig. 17. Représentation schématique de la structure du DBD des FTs C₂H₂.

Illustration extraites du site web de l'université de Nagasaki

(http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/phrmch1/lcn/interspersed_NLS.htm).

Il existe d'autres familles de FTs qui ne seront pas présentées ici qui interviennent également dans divers mécanismes cellulaires. On peut citer par exemple les FTs à domaine Homeobox (PF00046) ou les FTs à domaine Myb-like (PF00249).

3.1.3. Répertoires des FTs des champignons filamenteux et de *B. cinerea*

Les FTs interviennent dans tous les processus de la vie d'un organisme et la présence ou l'absence de ces protéines chez différents organismes est intimement liée à leur diversité. L'acquisition d'un répertoire spécifique de FTs peut donner des informations sur l'histoire évolutive de l'organisme étudié. Shelest (2008) a mené une étude sur les FTs fongiques et a permis de faire l'inventaire de la diversité de ces protéines. Les résultats indiquent que chez les champignons, environ ¼ des superfamilles et familles connues sont retrouvées (12 superfamilles sur 37 et 37 familles sur 145 considérées dans l'étude). Ces résultats vont dans le sens de l'hypothèse énoncée précédemment qui est basée sur le fait que la complexité des organismes croît avec leur proportion en éléments de régulation. Parmi ces superfamilles/familles, certaines comme celles des FTs à domaine Zn(II)₂Cys₆, Fungal Trans ou APSES sont spécifiques des champignons. De façon surprenante, ces FTs fongiques interviennent dans des processus conservés dans les autres règnes. Ces faits indiquent que durant l'évolution, ces fonctions conservées régulées par d'autres FTs au sein des autres règnes ont été

assignées à des FTs spécifiques des champignons. D'après Shelest, il pourrait s'agir d'une convergence évolutive des FTs des différents règnes.

Le **Tableau 3** présente le résumé du répertoire de FTs de B05.10. Ces données montrent que comme chez les autres champignons Ascomycètes, les FTs Zn(II)₂Cys₆ sont les plus représentés. Les familles qui comptent le plus grand nombre de FTs sont ensuite les C₂H₂ et les bZIP. Au sein du laboratoire, une banque de FTs a été créée par Adeline Simon (2013) pour l'utilisation de l'outil simple hybride (Y1H). Le nombre de FTs clonés avec succès est représenté.

Tableau 3. Résumé du répertoire de FTs chez *B. cinerea*.

Domaine de liaison à l'ADN	Domaines InterPro	Nombre de FTs prédits	Nombre de FTs clonés en Y1H
Zn(II)2Cys6	IPR001138 ou SMART	133	107
Zn(II)2Cys6 + Fungal_trans	IPR001138 + IPR007219	94	71
Cys2His2	IPR007087 et/ou IPR015880 ou SMART	101	90
Cys2His2 + Fungal_trans	IPR007087 + IPR015880 + IPR007219	6	6
Zn(II)2Cys6 + Cys2His2	IPR001138 + IPR007087	1	1
Zn(II)2Cys6 + Cys2His2 + Fungal_trans	IPR001138 + IPR007087 + IPR015880 + IPR007219	6	6
bZip	IPR004827	23	22
HMG (high mobility group)	IPR009071	10	9
Helix-loop-helix (HLH)	IPR011598	9	9
GATA zinc finger	IPR000679 et/ou IPR013088	8	8
Homeobox	IPR001356	7	5
Cys2His2 + Homeobox	IPR007087 + IPR015880 + IPR001356	1	1
Fork head	IPR001766	4	3
CCAAT	IPR005612 et/ou IPR001289	4	2
MADS box	IPR002100	3	2
Regulatory Factor X (RFX)	IPR003150	2	1
Transcription factor CBF/NFY/archaeal histone	IPR003958	6	5
Zinc finger, DHHC-type	IPR001594	5	5
Fungal_trans	IPR007219	10	5
TOTAL		433	358

Les domaines ont été prédits avec InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>) ou le cas échéant avec SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) en utilisant l'annotation Bcin de B05.10 (van Kan *et al.*, 2016).

3.1.4. L'implication des FTs dans la régulation du métabolisme secondaire

La co-régulation des gènes d'un cluster du métabolisme secondaire peut en partie s'expliquer par un contrôle transcriptionnel dû à des acteurs intervenant à différents niveaux hiérarchiques. Les FTs représentent le premier type de ces régulateurs. Ces protéines peuvent avoir une activité de régulation spécifique des gènes d'un cluster ou globale pour notamment répondre aux stimuli environnementaux. Différents complexes protéiques ont également été identifiés comme régulant les clusters du métabolisme secondaire fongique.

3.1.4.1. Les FTs spécifiques

Il a été abordé précédemment que de façon générale, les gènes impliqués dans la biosynthèse d'un même métabolite secondaire sont localisés au sein d'un cluster dans le génome de l'organisme producteur. De nombreux exemples de la littérature suggèrent qu'un FT codé par un gène se trouvant dans un cluster du métabolisme secondaire fongique régule uniquement l'ensemble ou une partie des gènes de ce cluster. On parle dans ce cas de FT spécifique. Le **Tableau 4** présente certains de ces régulateurs caractérisés ainsi que les clusters régulés et les organismes étudiés. Parfois, les FTs spécifiques peuvent s'auto-réguler. C'est notamment le cas du régulateur AfIR de l'aflatoxine chez *A. parasiticus* (Chang *et al.*, 1995; Kenneth C. Ehrlich *et al.*, 1999). Il a été estimé que 90% des FTs se trouvant dans des clusters dont l'enzyme clé est une PKS appartiennent à la famille des Zn(II)₂Cys₆. Au contraire, les FTs spécifiques des clusters contenant des NRPS appartiennent à des familles variées (Brakhage, 2012).

Tableau 4. Exemples de FTs Zn(II)₂Cys₆ impliqués dans la régulation spécifique de clusters du métabolisme secondaire chez les champignons. D'après Knox et Keller (2015).

FT	Cluster	Espèce	Référence
AflR	Aflatoxine /Stérigmatocystine	<i>Aspergillus nidulans</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Brown <i>et al.</i> (1996) Woloshuk <i>et al.</i> (1994) Chang <i>et al.</i> (1995)
AfoA	Aspefuranone	<i>Aspergillus nidulans</i>	Chiang <i>et al.</i> (2009)
ApdR	Aspirydone	<i>Aspergillus nidulans</i>	Bergmann <i>et al.</i> (2007)
Bik5	Bikavérine	<i>Fusarium fujikoroii</i>	Wiemann <i>et al.</i> (2009)
CTB8	Cercosporine	<i>Cercospora nicotianae</i>	Chen <i>et al.</i> (2007)
CtnA	Citrinine	<i>Monascus purpureus</i>	Shimizu <i>et al.</i> (2007)
DEP6	Dépuδέcine	<i>Alternaria brassicicola</i>	Wight <i>et al.</i> (2009)
FapR	Fumagilline/Pseurotine	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Wiemann <i>et al.</i> (2013)
FUM21	Fumosinine	<i>Fusarium verticillioides</i>	Brown <i>et al.</i> (2007)
GIP2	Aurofusarine	<i>Fusarium graminearum</i>	Kim <i>et al.</i> (2006)
GliZ	Gliotoxine	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Bok <i>et al.</i> (2006)
LovE	Lovastatine	<i>Aspergillus terreus</i>	Huang and Li (2009)
MdpE	Monodictyphénone	<i>Aspergillus nidulans</i>	Chiang <i>et al.</i> (2010)
MlcR	Compactine	<i>Penicillium citrinum</i>	Abe <i>et al.</i> (2002)
MokH	Monacoline K	<i>Monascus pilosus</i>	Chen <i>et al.</i> (2010)
ORFR	AK-toxine	<i>Alternaria alternata</i>	Tanaka et Tsuge (2000)
SirZ	Sirodesmine PL	<i>Leptosphaeria maculans</i>	Fox <i>et al.</i> (2008)
ZFR1	Fumonisine	<i>Fusarium verticillioides</i>	Flaherty et Woloshuk (2004)

A. parasiticus et *A. flavus* sont connus pour produire la substance cancérigène aflatoxine alors qu'*A. nidulans* ne possède que les gènes permettant d'aller jusqu'à la production de stérigmatocystine, son précurseur lui aussi toxique. Les clusters de gènes qui permettent la synthèse de ces métabolites sont probablement les mieux caractérisés au sein du métabolisme secondaire fongique. Parmi les différents gènes, *aflR*, codant un FT spécifique, a été cloné et caractérisé (Chang *et al.*, 1993; Payne *et al.*, 1993). Plusieurs études se sont intéressées au site de liaison d'AflR au niveau des promoteurs de certains gènes du cluster dont *aflR* lui-même (Chang *et al.*, 1995; Fernandes *et al.*, 1998; K. C. Ehrlich *et al.*, 1999; Kenneth C. Ehrlich *et al.*, 1999). Cependant, dans le cadre d'une étude transcriptomique globale par puce à ADN réalisée sur une souche sauvage d'*A. parasiticus* et du Δ *aflR* correspondant, Price *et al.* (2006) ont démontré qu'en plus des 18 gènes connus du cluster aflatoxine, trois gènes proches du cluster étaient aussi affectés par la délétion d'*aflR*. De même mais de façon plus surprenante, deux gènes se trouvant ailleurs dans le génome se sont avérés sous-exprimés chez le mutant. Il s'agit de *niiA* codant pour la nitrite réductase chez *A. parasiticus* et *hlyC* codant un homologue de l' α -hémolysine d'*Aeromonas hydrophyla*. AflR serait impliqué de façon directe dans la

régulation de ces gènes puisque le motif de fixation (5'-TCGSWNNSCGR-3') décrit par Ehrlich *et al.* (1999) est retrouvé dans le promoteur de ces trois gènes.

Un cas opposé à celui d'AfIR a été décrit par Wiemann *et al.* (2009). *Fusarium fujikuroi* est un champignon capable de produire la bikavérine. Il s'agit d'un pigment de couleur rose / rouge qui a un rôle toxique vis-à-vis de certains prédateurs ou compétiteurs (Balan *et al.*, 1970; Kwon *et al.*, 2007; Son *et al.*, 2008). Lors de leur étude sur la caractérisation du cluster responsable de la production de ce métabolite, les auteurs ont montré que le mutant $\Delta bik5$ (codant un FT putatif de type $Zn(II)_2Cys_6$) produisait 100 fois moins de bikavérine que la souche sauvage mais que seule l'expression de trois des cinq gènes restant est affectée.

Certains clusters du métabolisme secondaire fongique ont également été rapportés comme ne possédant pas de FTs spécifiques prédits. C'est notamment le cas des clusters de l'ergovaline chez *Neotyphodium lolii* (Fleetwood *et al.*, 2007), du lolitrème chez *E. festucae* (Young *et al.*, 2006) ou encore du célèbre cluster pénicilline chez *P. chrysogenum* (Kosalková *et al.*, 2009). Dans ce cas, la régulation des gènes semble être gouvernée par des FTs globaux (Brakhage *et al.*, 2004).

3.1.4.2. Les FTs globaux et les complexes multiprotéiques

A l'inverse des FTs spécifiques qui ne régulent qu'un nombre restreints de gènes, d'autres FTs dits globaux contrôlent l'expression d'un nombre plus important de gènes cibles. Les gènes qui codent ces FTs n'appartiennent à aucun cluster du métabolisme secondaire et sont également impliqués dans la régulation de gènes qui ne font pas partie du métabolisme secondaire.

Plusieurs FTs globaux régulent les gènes du métabolisme secondaire en réponse à des stimuli de l'environnement comme par exemple la source de carbone ou d'azote, la lumière, le pH, la température, la présence d'acides aminés ou d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), l'hypoxie, la quantité de fer disponible ou encore la présence de stimuli générés par d'autres organismes (Brakhage, 2012). La **Fig. 18** présente les FTs impliqués dans la réponse à ces différents stress. Parmi eux plusieurs ont été caractérisés chez *B. cinerea* (**Cf. partie 4**).

Un des régulateurs globaux ayant une action sur plusieurs clusters du métabolisme secondaire fongique est le FT GATA AreA (Tudzynski, 2014). Cette protéine est l'acteur majeur d'un phénomène nommé NMR (Nitrogen Metabolite Repression). Ce dernier consiste à maintenir éteints un certain nombre de gènes lorsque le champignon croît sur un milieu qui contient des sources préférées d'azote (comme l'ammonium ou la glutamine). Lorsqu'en revanche le milieu ne contient que des sources d'azotes secondaires (comme le nitrate), AreA va réguler ses gènes cibles, impliqués notamment dans l'utilisation de ces sources d'azotes alternatives mais aussi dans la production de métabolites secondaires. Par exemple, le cluster permettant la production des gibbérellines est directement régulé par AreA chez *Fusarium fujikuroi* (Mihlan *et al.*, 2003).

En plus des FTs qui agissent seuls, des complexes multiprotéiques sont impliqués dans la régulation du métabolisme secondaire chez les champignons. L'un d'entre eux est le complexe Velvet. Il a été découvert chez *A. nidulans* où il est composé des protéines VeA, VelB et LaeA (Bayram *et al.*, 2008). Il est spécifique aux champignons filamenteux au sein desquels il régule le développement et le métabolisme secondaire en réponse à la lumière. En plus de l'hypothèse d'une régulation chromatinienne par le complexe Velvet, il a récemment été démontré par CHIP-seq chez *P. chrysogenum* que l'homologue de VeA (PcVelA) interagissait directement au niveau des promoteurs de gènes cibles impliqués notamment dans le métabolisme secondaire. La putative méthyltransférase LaeA, qui est considérée comme un régulateur global du métabolisme secondaire fongique, a été caractérisée chez de nombreuses espèces (Bok et Keller, 2004; Perrin *et al.*, 2007; Hoff *et al.*, 2010; Wiemann *et al.*, 2010; Butchko *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012). Les membres du complexe Velvet ont été caractérisés chez *B. cinerea* où ils régulent la différenciation morphologique et le métabolisme secondaire (Schumacher *et al.*, 2012; Schumacher, Simon, Kim Christopher Cohrs, *et al.*, 2015)(**Cf. partie 4**).

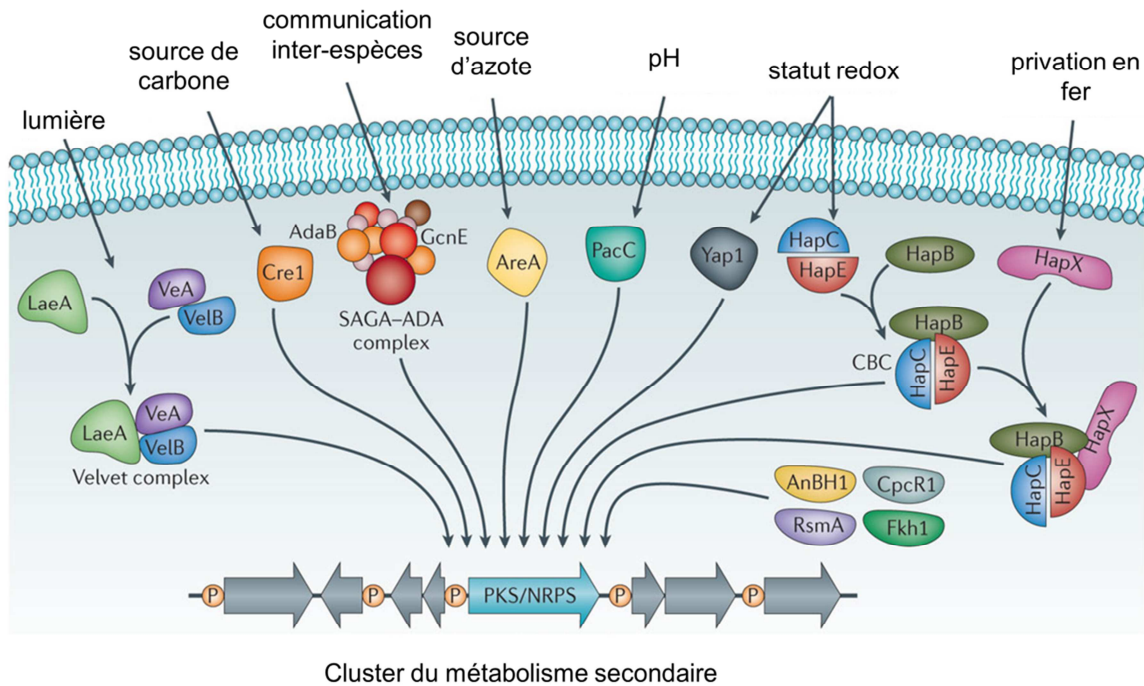


Fig. 18. Régulation du métabolisme secondaire fongique par des régulateurs globaux.

Les signaux environnementaux peuvent influencer l'expression des gènes des clusters du métabolisme secondaire (impliquant ici une PKS, une NRPS ou une PKS-NRPS) à travers des régulateurs globaux qui en réponse aux stimuli modulent l'expression de leurs gènes cibles. CBC : CCAAT-binding complex, CpcR1 : cephalosporin C regulator 1, LaeA : loss of aflR expression A, RsmA : restorer of secondary metabolism A, SAGA-ADA : Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase-ADA. Adapté de Brakhage (2012).

3.2. La régulation chromatinienne

Il est bien documenté que la seule présence des FTs ne suffit pas à induire la transcription des gènes (Spitz et Furlong, 2012). En plus, un état chromatinien favorable est nécessaire afin de permettre la fixation des FTs ainsi que de la machinerie transcriptionnelle de base. Il a été démontré que chez les champignons, le métabolisme secondaire est régulé par la structure de la chromatine. Avant de présenter quelques exemples, une brève explication des mécanismes permettant le remodelage de cette structure est présentée.

La chromatine est composée d'ADN enroulé autour d'autour de protéines appelées histones. L'unité de base est le nucléosome qui comporte un octamère d'histones ainsi que l'ADN qui l'entoure (147 pb, Richmond et Davey, 2003). De façon générale, un octamère d'histones est composé de deux

copies des histones canoniques H2A, H2B, H3 et H4. Néanmoins, il existe des variantes à ces protéines qui leurs sont substituées dans certains cas. C'est notamment le cas de CenH3 (Smith *et al.*, 2011, 2012) chez les champignons qui est localisée au niveau de l'ADN centromérique et qui est impliquée dans l'assemblage des kinétochores (Verdaasdonk et Bloom, 2011). Un autre exemple est H2A.Z ou H2A.X qui sont associés respectivement aux phénomènes de transcription et réparation de l'ADN (Talbert et Henikoff, 2010). La chromatine est une structure qui permet à la cellule de compacter l'ADN de façon à comporter une quantité importante de cette molécule dans un espace restreint (le noyau) (**Fig. 19**).

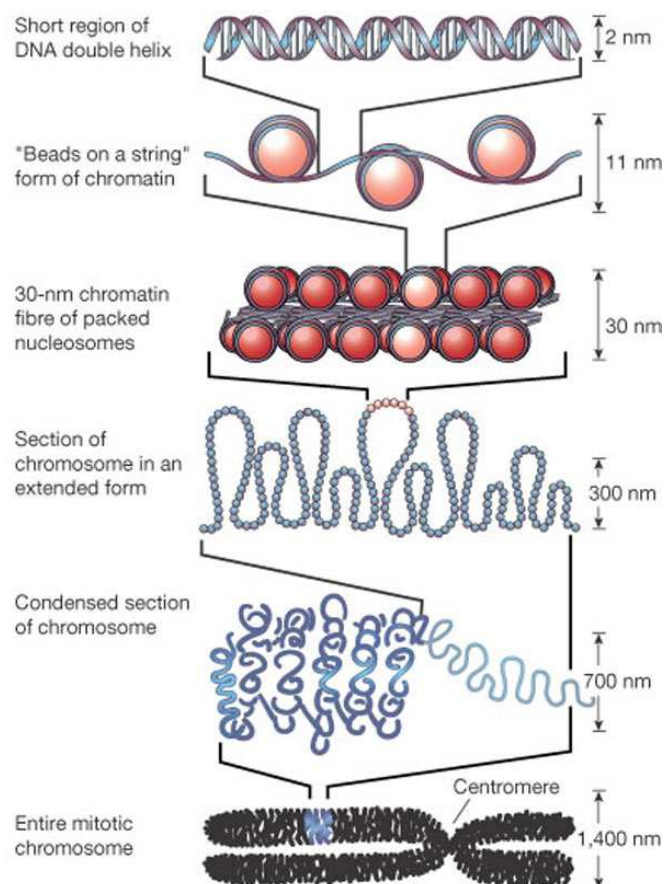


Fig. 19. Présentation des différents niveaux de compaction de la chromatine. Illustration extraite de Felsenfeld et Groudine (2003).

La structure de la chromatine peut se présenter sous deux formes :

- l'euchromatine correspond à une structure relâchée de la chromatine et possède un faible nombre de nucléosomes. C'est une structure permissive à la fixation des FTs et de la machinerie de base et donc à l'expression des gènes.

- l'hétérochromatine est, à l'inverse une structure compacte de la chromatine. Les nucléosomes y sont présents en forte densité, rendant ainsi impossible la fixation des acteurs de la transcription. On distingue deux types de chromatine :

- la chromatine constitutive est une structure permanente, irréversible, qui est principalement présente au niveau des centromères et des télomères et qui assure notamment le maintien de l'intégrité du génome (Freitag, 2014).

- l'hétérochromatine facultative est une structure dynamique, réversible, qui est notamment régulée en fonction du stade de développement et qui permet la répression de l'expression des gènes qui se trouvent dans ces régions.

La structure de la chromatine est dynamique et réversible. Le passage de l'euchromatine à l'hétérochromatine et *vice versa* s'effectue *via* l'ajout ou la suppression de modifications post-traductionnelles au niveau des queues N-terminale de certains acides aminés des histones (Jenuwein et Allis, 2001) (**Fig. 20**). De nombreuses marques peuvent intervenir dans le phénomène de modification de la chromatine (**Fig. 21**) mais les plus largement distribuées sont la méthylation et l'acétylation. La combinaison des modifications présentes sur les queues des histones dicte la structure de la chromatine et est connue sous le nom de « code histone » (Strahl et Allis, 2000). Ce type de régulation est parfois défini comme faisant partie de l'épigénétique. Ce terme a pour la première fois été utilisé par Conrad Waddington en 1942 pour définir, au cours du développement, les mécanismes qui permettent l'observation de phénotypes différents à partir d'un génotype mais sans affecter la séquence d'ADN (Waddington, 2012). Par la suite, il a été réutilisé mais dans différents contextes, en incluant notamment ou pas la notion de transmission à la descendance, ce qui fait que cette notion est sujette à débat au sein de la communauté (Deans et Maggert, 2015; Georgel, 2015). L'épigénétique regroupe

donc un ensemble de mécanismes qui gouvernent l'expression des gènes en fonction de différents facteurs sans modification de la séquence nucléotidique. Pour éviter toute confusion, nous utiliserons dans ce manuscrit le terme de régulation chromatinienne.

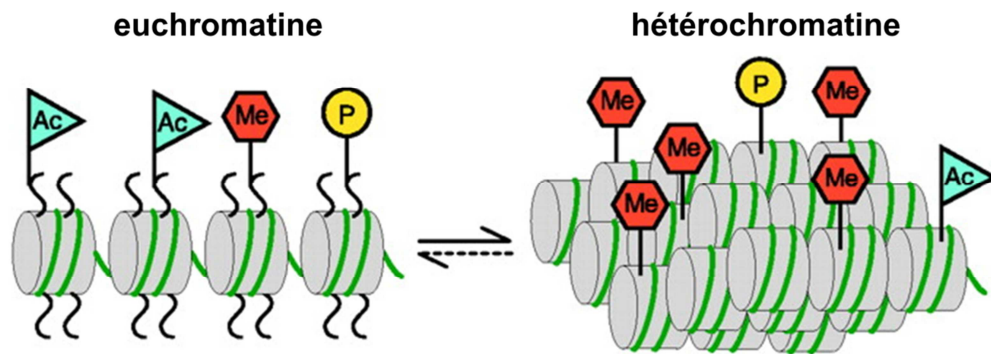


Fig. 20. Dynamique de la chromatine selon le code histone.

Le passage vers l'une ou l'autre des formes de la chromatine dépend de la présence de modifications post-traductionnelles au niveau des résidus des queues Nter des histones. Certaines de ces modification sont représentées (Ac : acétylation, Me : méthylation, P : phosphorylation). Adapté de Jenuwein et Allis (2001).

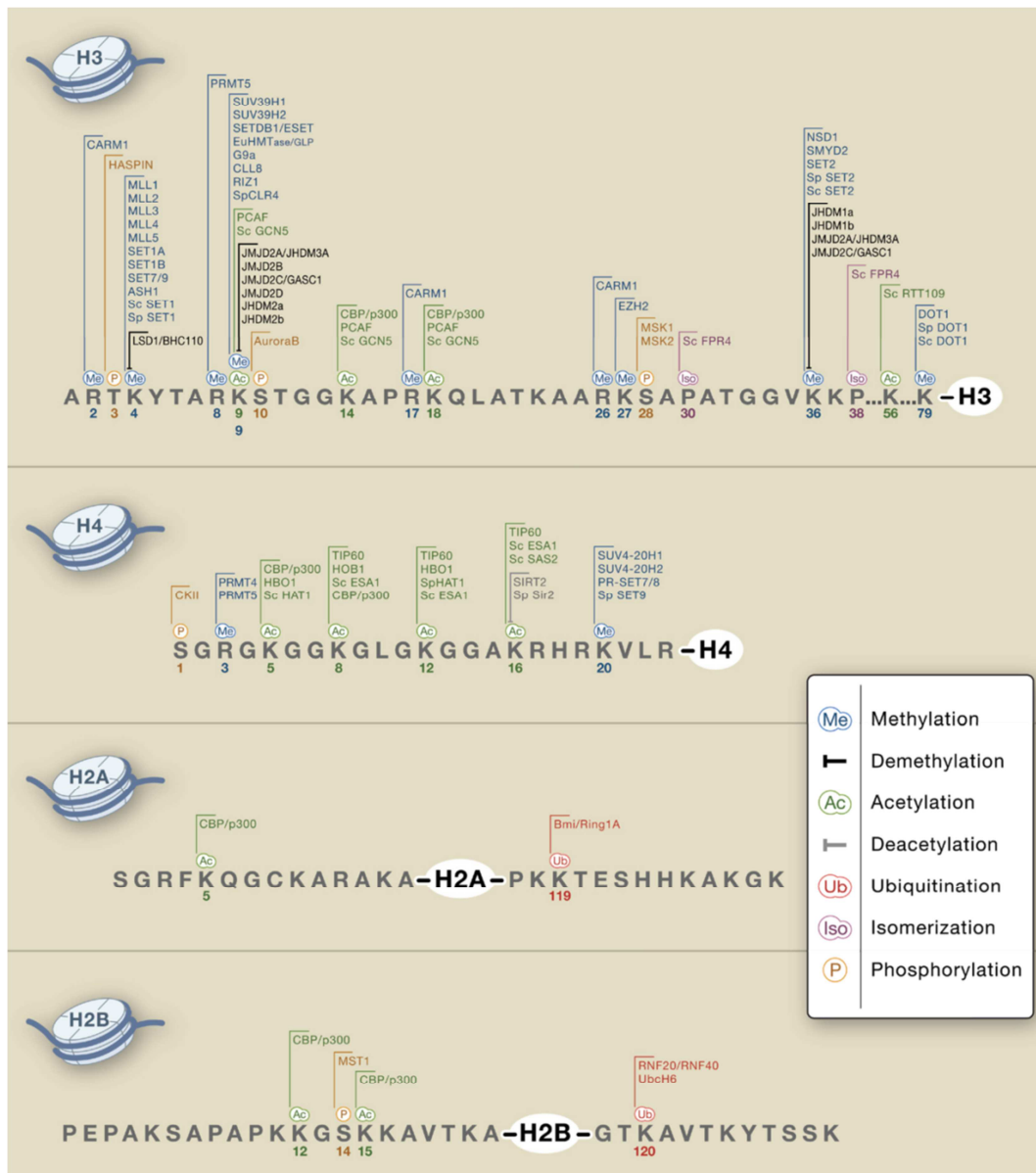


Fig. 21. Présentation des modifications post-traductionnelles des histones ainsi que des modificateurs chromatinienns impliqués.
D'après Kouzarides (2007).

Les protéines responsables de l'ajout ou de la suppression des modifications post-traductionnelles impliquées dans le remodelage de la chromatine sont appelées modificateurs chromatinienns. Chez les champignons, de nombreux modificateurs chromatinienns ont déjà été identifiés (Freitag, 2014). Le **Tableau 5** les présente ainsi que les homologues que nous avons pu identifier (par BDBH) chez *B. cinerea*.

Tableau 5. Modifications des histones et protéines responsables de ces modifications chez plusieurs organismes fongiques et homologues chez *B. cinerea*.

Modification	Résidue	Exemple	Enzyme	Bcin	Sc	Nc	An	Sp	Fg		
Acétylation	Lys (K)	H4K5/12ac	KAT1	07g01920	Hat1	HAT-1					
		H3K9/14/18/36ac	KAT2	05g01870	Gcn5	NGF-1					
		H3ac and H4ac	KAT4	05g04040	Taf1	HAT-3					
		H4K5/8/12/16ac	KAT5	12g06640	Esa1	HAT-4	ESAA				
		H3K14ac	KAT6	03g05250	Sas3	HAT-6					
		H4K16ac	KAT8	07g00450	Sas2	HAT-5					
		H3ac	KAT9	10g01520	Elp3	ELP-3					
		H3K14ac	KAT10	02g03320	Hap2						
		H3K56ac	KAT11	02g03150	Rtt109						
		Déacétylation	AcLys (acK)	H3ac, H4ac	Rpd3	05g02590	Rpd3	HDA-3	RPDA		Rpd3
				H3ac? H4ac?	Hda1	15g02130	Hda1	HDA-1	HDAA		HdF3
H3ac, H4ac	Hos2			01g03610	Hos2	HDA-2	HosA		HdF1		
H3ac, H4ac	Hos3			12g01310	Hos3	HDA-4	HosB		HdF3		
H3K9/14/56ac, H4K16ac	SIRT1			11g04080	Hst1	NST-1					
H3K9/14/56ac	SIRT2			06g03080	Hst2	NST-2	HSTA				
H4ac?	SIRT1 bis			11g03810	Hst4	NST-3					
?	SIRT3			12g00540	Hst3	NST-4					
H4ac?	SIRT4			10g02470		NST-5					
?	SIRT5			16g00570		NST-6					
	Nucleolus			SIRT7		NST-7					
Méthylation	Lys (K)	H3K9me2, -3	KMT1	11g02360		DIM-5	CLRD	Clr4	KMT1		
		H3K4me2, -3	KMT2	06g06760		SET-1		Set1	KMT2		
		H3K36me2, -3	KMT3	10g05250	Set2	SET-2			KMT3		
		H3K79me	KMT4	08g04180	Dot1	DOT-1			KMT4		
		H4K20me	KMT5	16g03730		SET-9			KMT5		
		H3K27me3	KMT6	06g04490		SET-7			KMT6		
	Arg (R)	H4R3me	PRMT1	14g05420	Hmt1	RPM-1					
		Nonhistone proteins	PRMT3	13g04670		PRM-3					
		H3R8me, H4R3me	PRMT5	13g02360	Hsl7	PP-2			Skb1		
		H3K4me, H3K9me	KDM1	07g04610				HDMA	Lsd1		
Déméthylation	MeLys (meK)	H3K36me	KDM2		Jhd1						
		H3K9me	KDM3								
		H3K9me, H3K36me	KDM4	07g03050	Rph1		KdmA				
		H3K4me	KDM5	02g00190	Jhd2			Jmj2 Lid1			
		H3K27me	KDM6								
Phosphorylation	Ser (S)	H3S10ph	Aurora B	16g01390	Ip11		NIMA				
		H4S1ph	CKII	11g04810	CkII						
	Thr (T)	H3T45ph	CDC7	02g05150	Cdc7						

Adapté de Freitag (2014). Bcin, Annotation Bcin de *B. cinerea* ; Sc, *Saccharomyces cerevisiae* ; Nc, *Neurospora crassa* ; An, *Saccharomyces pombe* ; Fg, *Fusarium graminearum*.

3.2.1. L'acétylation des histones

L'acétylation des histones est une modification post-traductionnelle qui consiste en l'ajout d'un groupement acétyle au niveau des lysines (K). Le niveau d'acétylation des lysines est régulé par deux familles de protéines ayant des rôles opposés : les histones acétyltransférases (HATs) et les histones déacétylases (HDACs). Les HATs utilisent le groupement acétyle de l'acétyl-CoA pour le transférer sur un groupement ϵ -amine de la chaîne latérale d'un résidu lysine. Le retrait de ce groupement acétyle (déacétylation) s'effectue grâce à l'action des HDACs.

Deux explications sont proposées pour expliquer l'influence de l'acétylation sur la structure de la chromatine. La première repose sur une action directe de cette modification post-traductionnelle. Effectivement, les lysines des histones sont chargées positivement et l'acétylation permet de neutraliser ces charges et par conséquent de diminuer la force des interactions entre les histones et l'ADN (Hong *et al.*, 1993; **Fig. 22**). Le fait que l'acétylation mène à un état relâché de la chromatine et donc à une plus grande accessibilité par des protéines interagissantes a pu être démontré *in vivo* par une plus grande sensibilité à la DNase I des régions acétylées (Hebbes *et al.*, 1994; Krajewski et Becker, 1998). Cette caractéristique explique que l'on associe souvent l'acétylation des histones avec un état euchromatinien même si des contre-exemples existent (Carrozza *et al.*, 2003). La seconde hypothèse est que l'acétylation sert de site d'ancrage à des protéines effectrices dites « lectrices » qui vont jouer un rôle de régulation (positif ou négatif). Cette hypothèse est renforcée par le fait que de nombreux régulateurs transcriptionnels possèdent un bromodomaine impliqué dans la reconnaissance spécifique de ces marques (Dhalluin *et al.*, 1999).

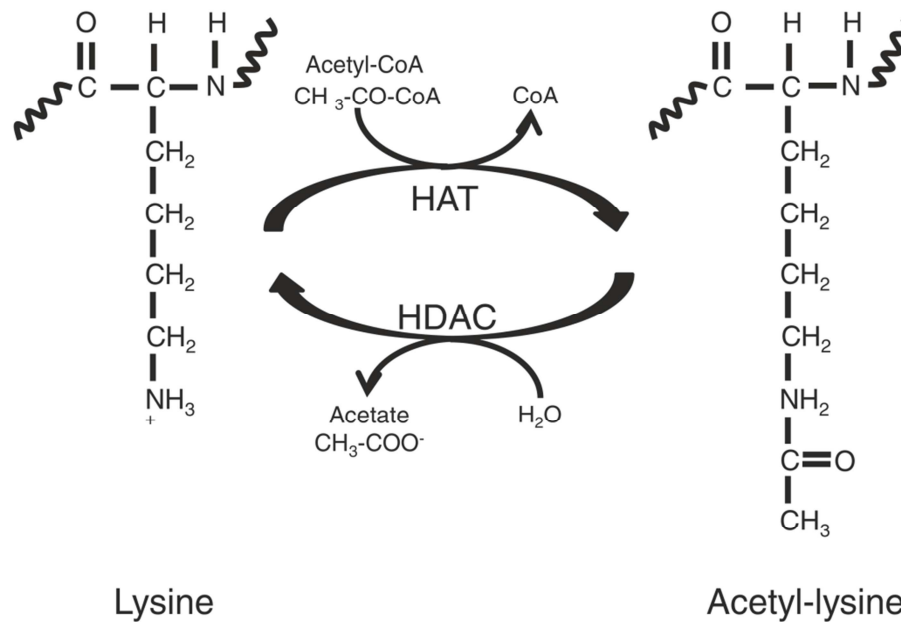


Fig. 22. L'acétylation neutralise la charge positive des lysines.

Les lysines sont chargées positivement (NH_3^+) et l'acétylation par une histone acétyltransférase (HAT) permet la neutralisation de cette charge. La déacétylation par des lysines déacétylases (HDAC) la restaure. D'après Gutierrez et Romero-Oliva (2013).

L'acétylation n'est pas une modification déposée de façon aléatoire sur les résidus des queues des histones mais est spécifiquement déposée sur des résidus cibles. Les lysines 9, 14, 18 et 23 de l'histone 3 ainsi que les 5, 8, 12 et 16 de l'histone 4 sont ainsi préférentiellement acétylés au sein du noyau.

3.2.2. La méthylation des histones

La méthylation des histones est également une modification post-traductionnelle apportée sur les queues Nter des histones. Elle consiste en l'ajout d'un groupement méthyle majoritairement sur les résidus lysines et arginines. Les enzymes impliquées dans sa mise en place sont les histones méthyltransférases (HMTs) qui utilisent le S-adenosyléthionine (SAM) comme co-facteur et les enzymes qui retirent cette marque sont appelées histones déméthylases (HDMs). A l'inverse de l'acétylation, la méthylation des histones n'a pas d'action directe sur la chromatine en modifiant les charges des résidus des histones. En revanche, l'augmentation du degré de méthylation (mono-, di- ou tri-méthylation) augmente la basicité et l'hydrophobicité des queues des histones (**Fig. 23**) augmentant leur affinité pour des molécules anioniques comme l'ADN et résultant en une résistance plus

importante à la digestion par la trypsine (Byvoet *et al.*, 1972; Baxter et Byvoet, 1975). Ainsi, la méthylation est souvent associée à un état hétérochromatinien puisqu'elle semble augmenter l'interaction entre les histones et l'ADN rendant difficile l'accès à cette molécule pour d'autres protéines. Néanmoins, la méthylation de certains résidus comme la H3K4 est associée avec un état transcriptionnel actif (Freitag, 2014). La méthylation sert également de signal pour le recrutement de protéines « lectrices » au niveau de certaines marques. Ces protéines possèdent un chromodomaine permettant la reconnaissance spécifique de ces marques et sont impliquées dans les mécanismes d'activation ou de répression de la transcription. Par exemple chez *N. crassa*, l'hétérochromatine protéine 1 (HP1) est recrutée au niveau des H3K9 di- ou tri-méthylées pour la formation d'hétérochromatine et donc le silencing des gènes (Freitag *et al.*, 2004). A l'inverse, chez *S. cerevisiae*, CHD1 (chromodomain helicase DNA binding protein 1) est recrutée par les H3K4 méthylées au niveau de gènes transcriptionnellement actifs (euchromatine)(Pray-Grant *et al.*, 2005).

Les marques H3K9me3 sont souvent considérées comme impliquées dans la formation d'hétérochromatine constitutive localisée notamment au niveau des régions riches en éléments transposables et des centromères. A l'inverse, l'hétérochromatine facultative est souvent attribuée aux marques H3K27me3 qui sont retrouvées dans des régions riches en gènes. Néanmoins, au fur et à mesure des études, il apparaît que des contre-exemples existent. Notamment, chez *Zymoseptoria tritici*, des régions riches en éléments transposables contiennent les deux types de marques, ce qui démontre que ces dernières ne sont pas exclusives (Schotanus *et al.*, 2015). De plus, les auteurs de cette étude ont démontré que les centromères contenaient des gènes actifs, ce qui suggère que la chromatine dite constitutive est aussi probablement sujette à modification.

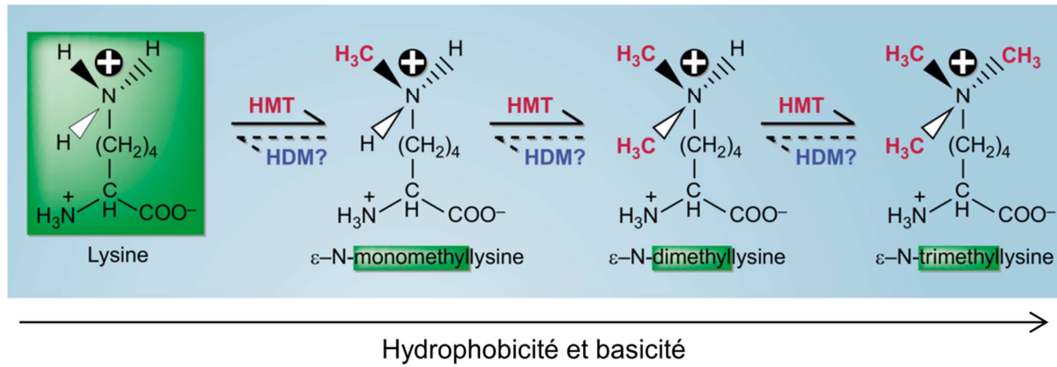


Fig. 23. La méthylation des lysines augmente l'hydrophobicité et la basicité.

Les méthylations successives par des histones méthyltransférases (HMT) augmentent l'hydrophobicité et la basicité des résidus lysines modifiés. Adapté de Rice et Allis (2001).

3.2.3. L'interférence entre acétylation et méthylation des histones

La multiplicité des cibles pour l'acétylation et la méthylation des histones (en plus des autres modifications existantes) permet un large nombre de combinaisons possibles (Bannister et Kouzarides, 2011). Ce code histone permet ainsi de réguler de façon précise la structure de la chromatine. Il existe des interférences entre certaines marques comme par exemple la H3K9 qui peut être la cible d'acétylation comme de méthylation. Généralement, on attribue des lysines (K) hyper-acétylées pour les histones 3 et 4 (H3 et H4) et la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4me3) à l'euchromatine. A l'inverse, au niveau de l'hétérochromatine, les lysines sont faiblement acétylées et les marques H3K9me3 et H3K27me3 sont présentes (Freitag, 2014).

3.2.4. La méthylation de l'ADN

En plus de la modification des histones, la méthylation de l'ADN représente une forme de contrôle de la transcription des gènes. Cette modification correspond à l'ajout d'un groupement méthyle au niveau du carbone 5 du cycle pyrimidine. Cette modification qui donne la base nucléique nommée 5-méthylcytosine modifie la structure de la cytosine sans toutefois modifier son appariement avec la guanine. L'ajout du groupement cytosine permet l'inhibition de l'expression des gènes (i) en interférant avec la fixation de protéines comme les FTs et (ii) en recrutant des protéines additionnelles impliquées dans la compaction de la chromatine (Fazzari et Grealley, 2004). Les enzymes responsables de la méthylation de l'ADN sont les ADN méthyltransférases.

3.2.5. Exemple de la formation d'hétérochromatine chez *Neurospora crassa*

Un modèle simple de la formation de l'hétérochromatine a pu être établi chez *N. crassa*. Chez cet organisme, certaines séquences de l'ADN ayant subi l'action du système de défense nommé RIP (Repeat Induced Point mutation), qui mute les bases C en T au niveau de séquences répétées, sont reconnues par la lysine méthyltransférase (KMT) DIM-5. Cette protéine, qui fait partie d'un complexe nommé DCDC, va tri-méthyliser les H3K9. Ces marques (H3K9me3) sont reconnues comme signal pour le recrutement de la protéine lectrice HP1. Une DNA méthyltransférase (DIM-2) va à son tour être recrutée par l'intermédiaire de HP1 pour méthyliser l'ADN au niveau de cytosines (qui deviennent alors des 5-méthylcytosines). L'ensemble de ces événements qui mène à la formation d'hétérochromatine dite constitutive chez *N. crassa* est schématisé en **Fig. 24**. De plus, il a été démontré chez cet organisme que la triméthylation de H3K27 entrainerait la formation d'hétérochromatine facultative qui réprime l'expression de régions différentes de celles réprimées par la voie impliquant DIM-5 (Jamieson *et al.*, 2013).

Chez *B. cinerea*, il a récemment été mis en évidence que la méthylation de l'ADN existe (Breen *et al.*, 2016). Néanmoins, le taux estimé au sein de la souche B05.10 de *B. cinerea* (0,6%) est inférieur à celui déterminé chez *N. crassa* (1,5% ; Foss *et al.*, 1993).

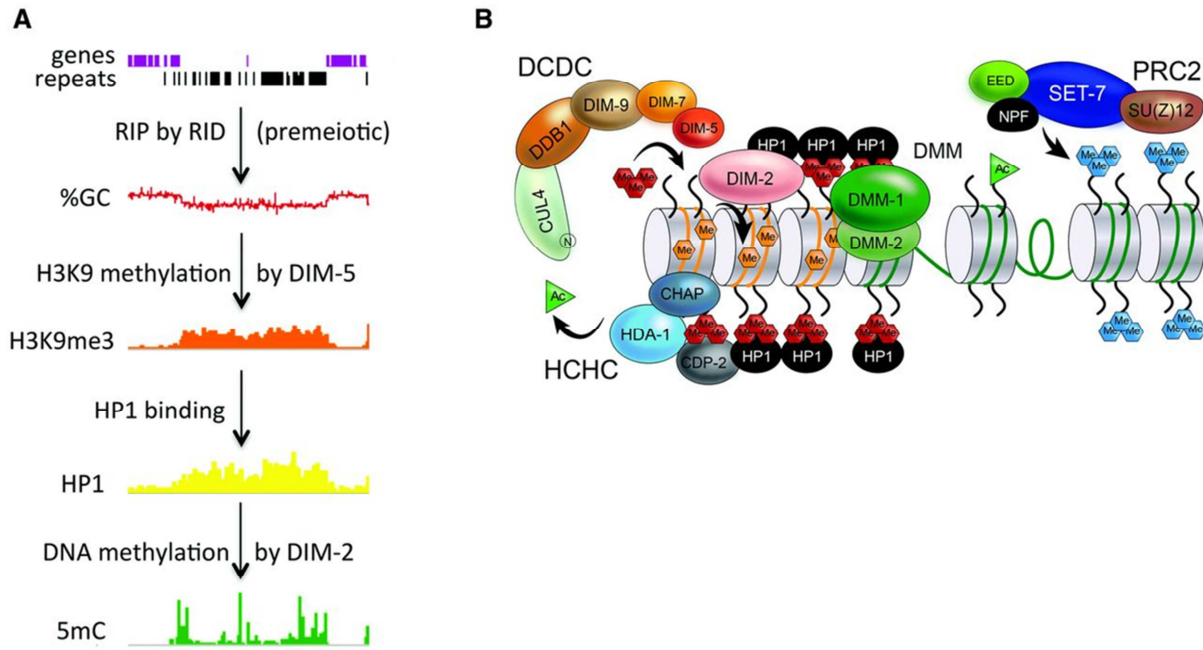


Fig. 24. Formation de l'hétérochromatine chez *Neurospora crassa*.

Chez *N. crassa*, la formation de l'hétérochromatine constitutive implique la triméthylation par DIM-5 (au niveau des séquences RIPées) des H3K9 puis le recrutement successif de HP1 et DIM-2. Ces événements mènent à la méthylation de l'ADN et à la formation subséquente d'hétérochromatine. La partie A représente le déroulement de la formation d'hétérochromatine facultative. La partie B présente les acteurs impliqués dans la formation de l'hétérochromatine constitutive (à gauche) et facultative (à droite).

3.2.6. Le remodelage de la chromatine comme mécanisme de régulation du métabolisme secondaire fongique

Chez plusieurs champignons filamenteux, la structure de la chromatine joue un rôle primordial dans la régulation du métabolisme secondaire. Une étude clé menée en 2010 par Reyes-Dominguez et ses collaborateurs a montré que la régulation de plusieurs clusters du métabolisme secondaire chez *A. nidulans* faisait intervenir un contrôle chromatinien. Dans cette étude, les auteurs ont montré que la délétion de *clrD* (*kmt1*) et de *hepA* (*hp1*) entraîne une dé-répression et une surproduction consécutive de pénicilline, stérigmatocystine et terrequinone A. Chez le WT, pendant la phase de croissance durant laquelle la stérigmatocystine n'est pas produite, le cluster ST est marqué par des H3K9me3 et par la présence de HepA. Lorsque la phase de croissance s'arrête et que la production de stérigmatocystine est induite, la présence des H3K9me3 et de HepA décroissent concomitamment alors que les H3 deviennent hyper-acétylées. Cette régulation par la chromatine est très ciblée puisque la présence de marques d'hétérochromatine persiste directement sur les gènes qui bordent le cluster même lorsque

celui-ci est dé-réprimé. De façon intéressante, la présence de HepA au niveau du promoteur du gène *aflR* est diminuée chez le *AlaeA* suggérant que cette protéine pourrait avoir une activité opposée à la formation d'hétérochromatine.

D'autres modificateurs chromatiniens sont impliqués dans la régulation du métabolisme secondaire fongique. Chez *A. fumigatus*, la protéine CclA (l'homologue de BRE2 impliquée dans le complexe COMPASS chez *S. cerevisiae*) est impliquée dans la di- et tri-méthylation de H3K4 et régule négativement plusieurs clusters du métabolisme secondaire dont celui de la gliotoxine (Palmer *et al.*, 2013).

Outre l'intervention de HMTs, d'autres modificateurs de la chromatine ont un rôle dans la régulation du métabolisme secondaire fongique. Chez *A. nidulans*, la délétion de la lysine déméthylase KdmA (dont la cible est H3K36me3) affecte positivement ou négativement l'expression de plusieurs clusters du métabolisme secondaire (Gacek-Matthews *et al.*, 2015). Chez le même organisme, il a également été démontré que EsaA qui est responsable de l'acétylation de H4K12 est impliqué dans l'activation des quatre clusters stérigmatocystine, pénicilline, terrequinone A et acide orsellinique (Soukup *et al.*, 2012). Deux histone déacétylases (FfHda1 et FfHda2) ont également été rapportées chez *Fusarium fujikuroi* comme étant des régulateurs (positifs et négatifs) du métabolisme secondaire et des facteurs de virulence (Studt *et al.*, 2013).

4. La régulation du métabolisme secondaire chez *B. cinerea*

Le métabolisme secondaire, à travers notamment la production de botrydial et d'acide botcinique, est impliqué dans le pouvoir pathogène de *B. cinerea*. Dans le cadre du livre intitulé « **Host – Pathogen Interaction. Microbial Metabolism, Pathogenicity and Antiinfectives.** » publié en 2016, j'ai participé à la rédaction du chapitre nommé « **Regulation of Secondary Metabolism in the Gray Mold Fungus *Botrytis cinerea*** ». Ce document est présenté ci-dessous. Il aborde le répertoire des enzymes clés identifiées dans le génome de *B. cinerea* ainsi que les données disponibles jusqu'ici concernant la régulation du métabolisme secondaire chez l'agent de la pourriture grise.

11

Regulation of Secondary Metabolism in the Gray Mold Fungus *Botrytis cinerea*

Muriel Viaud*, Julia Schumacher, Antoine Porquier, and Adeline Simon

Abstract

Botrytis cinerea is responsible of the gray mold disease on a wide range of host plants. During the infection process, it produces unspecific phytotoxins (botrydial and botcinic acid) and other secondary metabolites that play a significant role in plant tissue colonization. Regulation of the biosynthesis of these bioactive compounds is therefore crucial for the outcome of fungus/plant interactions. Combining genetics and transcriptomic approaches, the role of different signaling cascades, transcription factors, and other regulators such as those belonging to the VELVET complex have recently been investigated. Overall, these studies suggest a strong link between the regulation of secondary metabolism and the light-dependent development in *B. cinerea*. Further knowledge of the complex regulatory network controlling secondary metabolism in *B. cinerea* is crucial to understand the interaction between *B. cinerea* and its different host plants and may help to define new strategies to control this crop-devastating fungus.

Botrytis cinerea, the Causal Agent of Gray Mold Disease

Botrytis cinerea Pers. Fr. causes severe pre- and postharvest crop losses on more than 200 host plants including important crops and is therefore one of the most studied phytopathogenic fungi [1]. This Ascomycete (Leotiomycetes class, Sclerotiniaceae family) is also named the gray mold agent because of the production of masses of melanized conidia on infected plants. Conidia allow *B. cinerea* to disperse widely on further plants while the ability to form sclerotia allows the fungus to survive in the soil for extended periods. These melanized survival structures can also be fertilized by microconidia from a strain of the opposing mating type to form fruiting bodies (apothecia) with sexual recombinants (ascospores) [2, 3].

B. cinerea is considered a typical necrotroph, inducing host cell death and feeding on dead tissues. Thanks to an arsenal of plant cell wall-degrading enzymes, to

* Corresponding Author

Host – Pathogen Interaction: Microbial Metabolism, Pathogenicity and Antiinfectives, First Edition.

Edited by Gottfried Uden, Eckhard Thines, and Anja Schöffler.

© 2016 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Published 2016 by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

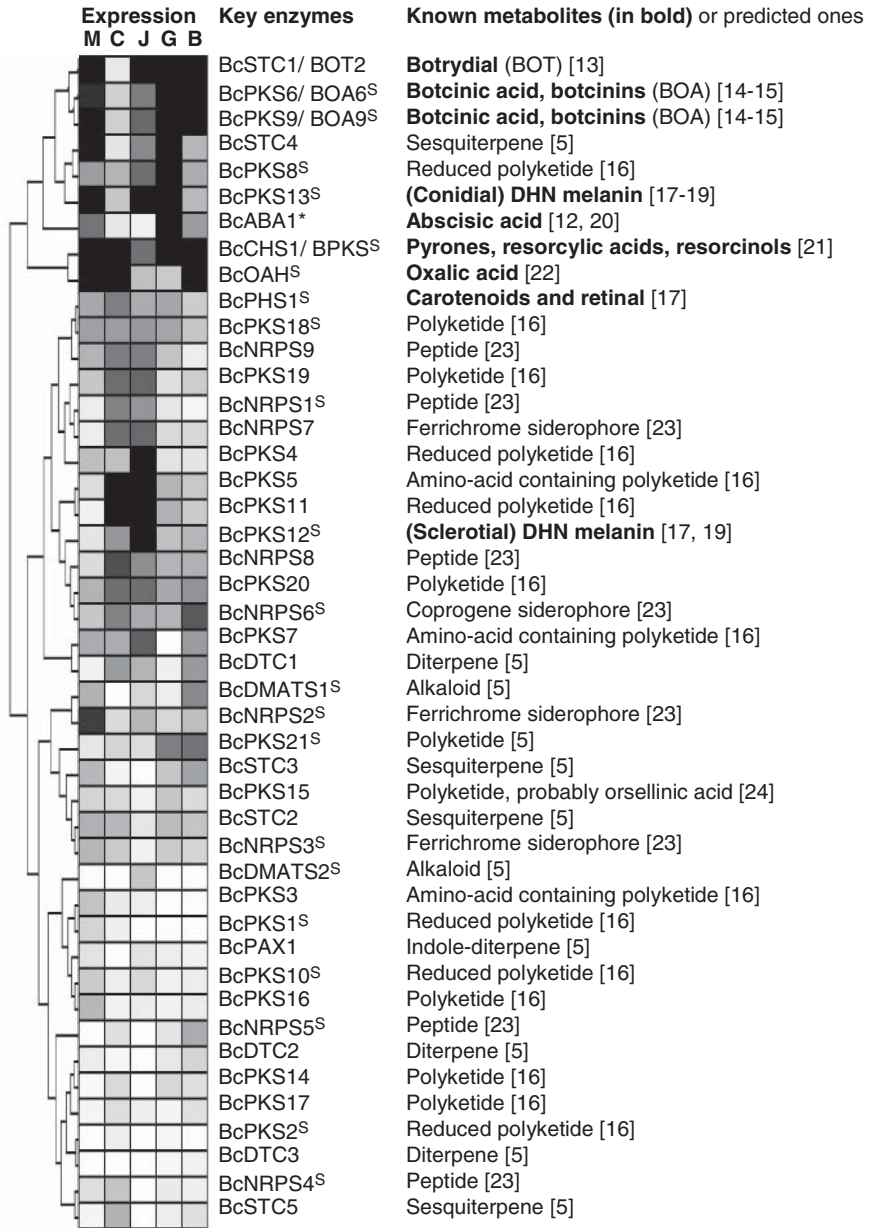


Figure 11.1 Repertoire of the predicted secondary metabolism key enzymes (KE) genes in *Botrytis cinerea* and their expression in different growth conditions. Conidial suspensions of the wild type strain B05.10 were incubated for 48 h on minimal medium (M), complete medium (C), grape Juice medium (J), grape berries (G; *Vitis vinifera*), or on bean leaves (B; *Phaseolus vulgaris*). Expressions (i.e., log₂-normalized intensities) from NimbleGen

array data were clustered and depicted by a color scale, where light gray represent weakly expressed genes and dark gray represent highly expressed genes. ⁵Indicates that the KE is also present in the close species *Sclerotinia sclerotiorum* [5]. *The KE responsible for ABA synthesis remains unknown, so the gene encoding the BcABA1 P450 monooxygenase was included in the analysis [12].

phytotoxic small proteins and metabolites, and to the ability to encounter strong oxidative stress, the fungus can develop on many different host tissues under a wide range of environmental conditions [3–7]. *B. cinerea* is more destructive on mature or senescent tissues, but it can gain entry to these tissues at a much earlier stage and remain quiescent until the host physiology becomes favorable for its proliferation [3]. In some cases, the endophytic behavior of *B. cinerea* was clearly demonstrated [8, 9]. Finally, under specific environmental conditions in vineyards, *B. cinerea* may not cause gray mold but noble mold, which allows the production of sweet wines like Sauternes. In this case, the development of the fungus is limited to the outermost layers of grape epidermis [10]. In conclusion, *B. cinerea* encounters many different biotic and abiotic interactions and consequently modifies its metabolism and physiology to adapt to the altering environmental conditions.

Repertoire of Secondary Metabolites Produced by *B. cinerea*

Secondary metabolites (SMs) are expected to play an essential role in the versatile life of *B. cinerea* as described in the previous section. In the pregenomic era of this fungus, about eight families of SMs have been isolated from *in vitro* mycelium, but sequencing of the genome revealed a repertoire of gene clusters dedicated to the synthesis of approximately 40 different SMs [5, 11]. As in other fungi, these clusters include one (or two) gene(s) encoding the key enzyme (KE) responsible for synthesis of the raw product, genes encoding enzymes for further modifications and in some cases, genes encoding transporters and/or regulators. Among the 44 KEs (Figure 11.1) are many polyketide synthases (21 PKSs) [16, 21, 24], nonribosomal peptide synthetases (9 NRPSs) [23], and sesquiterpene cyclases (5 STCs) and diterpene cyclases (3 DTCs). Notably, only 21 of these KE-encoding genes are shared with the closest related genus *Sclerotinia* [5]. To date, only a small number of SMs have been identified and connected with the genetic make-up of *B. cinerea*. Among them are the predominant nonspecific toxins botrydial (BOT) and botcinic acid (BOA) (Figure 11.2) and other SMs that may be involved in plant/fungus interactions:

- *Botrydial* (BOT) and related compounds are sesquiterpenoids [26]. The discovery of the genetic basis for BOT biosynthesis included the identification of a cluster of coregulated genes [13, 27]. Deletion analyses of *bcbot1*, *bcbot3*,

bcbot4 encoding cytochrome P450 monooxygenases and *bcbot2/bcstc1* encoding a STC proved their requirements for BOT biosynthesis [13, 25] (I.G. Collado *et al.*, unpublished). BOT would trigger plant cell death via induction of the hypersensitive response [28].

- *Botcinic acid (BOA)* and its derivatives (botcinins) are combined polyketides [29, 30]. The cluster of coregulated genes (*bchoa1-17*; Figure 11.2) includes two PKS-encoding genes essential for BOA biosynthesis: BcBOA6 mediates the formation of the tetraketide core, whereas BcBOA9 is responsible for the synthesis of the side chain [14, 15]. Analysis of mutants lacking the ability to produce BOT, BOA, or both toxins suggested a redundant role in plant tissue colonization [14]. Additionally, several botcinins would have antifungal activities [29, 30].
- *Abscisic acid (ABA)* is a plant hormone and belongs to the group of sesquiterpenoids [31]. While in higher plants, its biosynthesis is mediated via the carotenoid (CAR) pathway, *B. cinerea* synthesizes ABA directly from farnesyl diphosphate via different oxidative steps. The *B. cinerea* KE gene responsible for the first step of ABA biosynthesis remains unknown but a cluster of four genes (*bcaba1-4*) involved in the later steps was characterized [12, 20]. To date, no evidence exists that fungus-derived ABA influences fungus–host interactions (V. Siewers and P. Tudzynski, unpublished).
- *Oxalic acid (OA)* is a compound that is produced via the oxaloacetate acetylhydrolase (OAH) in *B. cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. Loss of OA formation affects virulence in closely related fungi in different ways: while it results in avirulent mutants in *S. sclerotiorum*, *bcoahA* mutants are still able to colonize the host tissue [22, 32, 33].

B. cinerea also produces several pigments that can act as protectants against UV and other exogenous stresses (oxidative stresses, desiccation):

- *1,8-Dihydroxynaphthalene (DHN)-melanin* is a polyketide derivative accumulating in the conidiophores, conidia, and sclerotia of *B. cinerea*, giving them their characteristic color [34, 35]. In contrast to other DHN-melanin forming fungi, *B. cinerea* possesses two developmentally regulated PKS (KE)-encoding genes (*bcpks12*, *bcpks13*), while the other melanogenic genes are present in single copies [17]. Recently, it was shown that BcPKS12 and BcPKS13 provide the precursors for sclerotial and conidial melanogenesis, respectively [18, 19].
- *Carotenoids (CARs)* are tetraterpenoids produced by plants and fungi to protect cells from free radicals and singlet oxygen [36]. A cluster of four light-induced genes (*bop2-bcphd1-bcphs1-bccao1*) was recently identified in *B. cinerea* [17] that shares similarity with the CAR gene cluster in *Fusarium fujikuroi* suggesting that *B. cinerea* produces CAR via a similar biosynthetic pathway than *F. fujikuroi* [37].
- *Bikaverin (BIK)*, a red pigment, is a well-known polyketide in some *Fusarium* species [38] but that is also produced by rare strains of *B. cinerea* due to a probable horizontal gene transfer [39, 40].

The repertoire of KEs (Figure 11.1) suggests that *B. cinerea* can also produce several siderophores [23] and many other SMs that remain to be chemically identified.

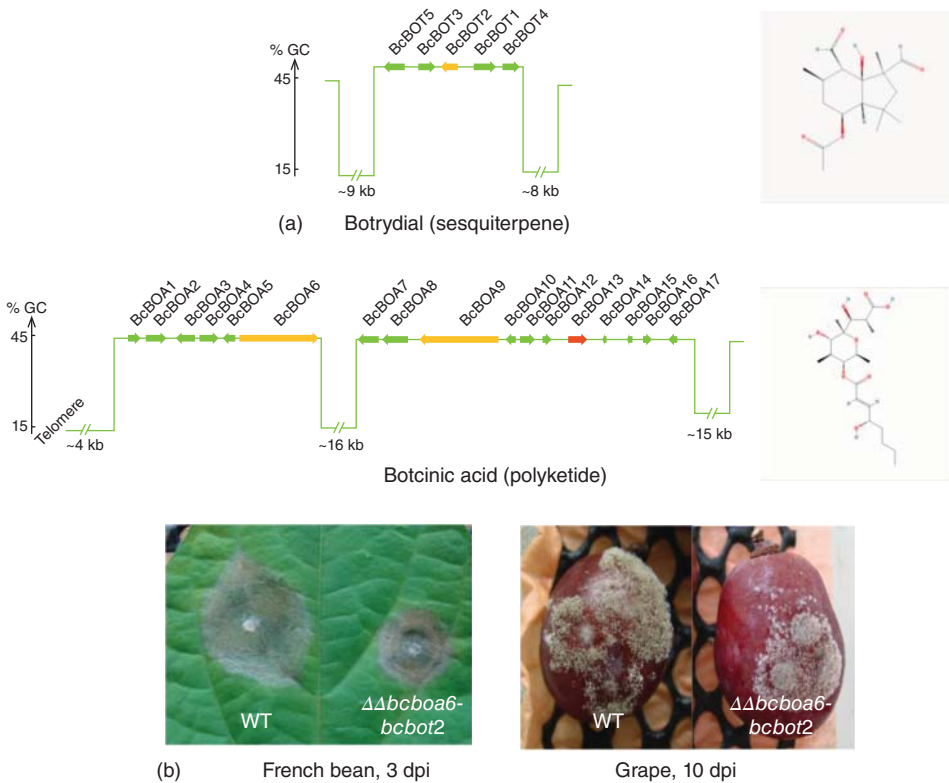


Figure 11.2 The two toxins botcinic acid (BOA) and botrydial (BOT) are produced from clusters of co-regulated genes and have a redundant role in virulence. (a) BOT and BOA clusters predicted in the wild strain B05.10 [13, 14] and surrounding AT-rich regions (J. van Kan *et al.*, unpublished); chemical structures of BOT and BOA (PubChem). The KE for BOT synthesis is the Sesquiterpene cyclase (STC) encoded by *bcbot2/stc1*. Other co-regulated genes encode for P450 monooxygenases (*bcbot1*, 3, and 4) also involved in BOT synthesis [12] (I. G. Collado *et al.*, unpublished) and a putative acetyl transferase (*bcbot5*). Two KEs are required for BOA synthesis: the polyketide synthases (PKSs) *bcbot6/pks6* and *bcbot9/pks9* [14, 15]. Other co-regulated genes encode for putative monooxygenases (*bcbot2*, 3, 4, and 7),

dehydrogenases (*bcbot5* and 17), a FAD-binding protein (*bcbot8*), a dehydratase (*bcbot16*), a thioesterase (*bcbot10*), a transferase (*bcbot11*), and unknown proteins (*bcbot12*, 14, and 16). A pathway-specific Zn(II)₂Cys₆ transcription factor (TF) is encoded by *bcbot13* and a Nmr-A like regulator is putatively encoded by *bcbot1*. (b) While both single mutants $\Delta bcbot6$ and $\Delta bcbot2$, impaired in BOA and BOT production, respectively, are not altered in virulence compared to the wild type (WT) strain (not shown), the double $\Delta bcbot6$ -*bcbot2* mutant, unable to produce any toxin, causes significant smaller necrotic lesions on several host plants. Here, conidial suspensions were inoculated on leaves of *Phaseolus vulgaris* (French bean) and *Vitis vinifera* (grape) berries.

Importantly, the property to produce the mentioned SMs varies among *B. cinerea* wild strains. ABA and BIK are only formed by few strains [12, 40], and not all wild strains produce OA, BOT, and BOA [41, 42].

Expression of SM Genes during *In Vitro* and *In Planta* Conditions

In the past years, several genome-wide expression studies were designed to investigate the transcriptome of *B. cinerea* either during saprophytic growth on various culture media or during the infection process on different host plants. Figure 11.1 presents the expression patterns of the SM KE-encoding genes of the model strain B05.10 after 2 days of growth in three *in vitro* conditions versus two *in planta* conditions. The media used were minimal medium (**M**) [43], complete medium (**C**) [17], and grape juice medium (**J**) [44]. The *in planta* conditions are grape berries (**G**) [43] and bean leaves (**B**) [41] both at 48-h postinfection. Figure 11.1 highlights several features about the regulation of SM in *B. cinerea*:

- About half of the KE-encoding genes (mainly those on the top of the Figure 11.1) are highly expressed in at least one of the culture conditions. Among the tested media, the one made with grape juice stimulates the highest number of KE-encoding genes (16 genes highly expressed). This medium with a high sugar content (about 200 g l⁻¹), a low pH (around 4), and the presence of plant compounds was originally designed to mimic the conditions that the fungus encounters during infection of grape berries [44] and then chosen to compare the expression of SM genes in different regulation mutants (see Section 11.5 and Figure 11.3).
- In opposite, five of the KE-encoding genes (e.g., *bcpks2* or *bcdtc3*) are not expressed in any condition tested. Whether these genes are functional in *B. cinerea* remains to be elucidated.
- Finally, the clustering shows that BOT and BOA KE-encoding genes have similar expression patterns. This coregulation includes also the other *bcbot* and *bcboa* genes presented in Figure 11.2. These data indicate that the biosynthesis of both toxins is activated during plant tissue colonization and in grape juice medium but also in synthetic minimal medium. The moderate expression under *in vitro* conditions has allowed for the identification of the underlying biosynthetic pathways [45].

Overall, the transcriptomic data indicate that, on one hand, the SM genes belonging to one cluster are tightly coregulated [13, 14, 20] and, on the other hand, almost each cluster has its own expression pattern when we consider the different growth conditions. It is known from other fungi that the regulation of SM gene clusters occurs at several levels, that is, by pathway-specific transcription factors (TFs) that are usually encoded by a cluster gene, by broad domain TFs that integrate environmental signals such as the availability of carbon and nitrogen sources and the ambient pH, and by other global regulators that could affect gene expression via chromatin remodeling [46–48]. Recent advances regarding *B. cinerea* are presented in the following sections.

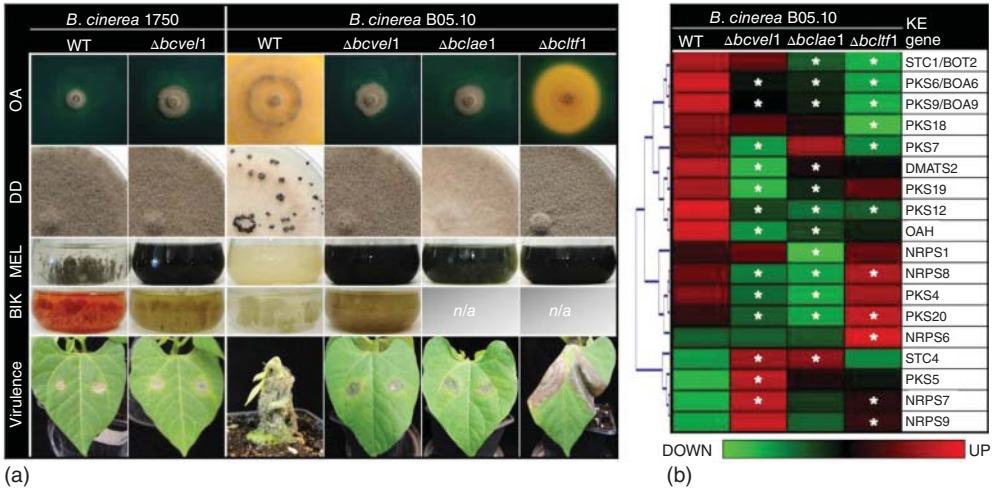


Figure 11.3 Members of the VELVET complex (BcVEL1, BcLAE1) and the light-responsive transcription factor BcLTF1 control light-dependent differentiation, secondary metabolism, and virulence. (a) Phenotypes of the deletion mutants in wild strain 1750 (BIK producer) and the standard recipient strain B05.10. OA – detection of oxalic formation by acidification of the culture medium 6 dpi (bluish green: pH >7, yellow pH <6). DD – differentiation phenotype 12 dpi in constant darkness; the WT:B05.10 produces sclerotia while the other strains produce conidia. MEL – accumulation of DHN melanin in liquid cultures 7 dpi (minimal medium with NaNO_3 as nitrogen source). BIK – accumulation of bikaverin in liquid cultures 7 dpi (minimal medium with NH_4NO_3 as nitrogen source). Virulence – lesion formation on primary leaves

of *Phaseolus vulgaris* (French bean) 6 dpi. (b) Comparative gene expression studies of the mutants. Conidial suspensions of the wild type B05.10 and the three deletion mutants were incubated for 48 h on solid grape juice medium with cellophane overlays. Material from four biological replicates were used for hybridization of NimbleGen arrays. Statistical analyses revealed 18 KE-encoding genes that are differentially expressed in at least one mutant (*: fold change >2; $p < 0.05$). Relative expression values of these genes (i.e., log₂-normalized intensities scaled by gene) were clustered and depicted by color scale, in which shades of green and red represent under- and overexpressed genes, respectively. GEO accession GSE63021 and (A. Simon *et al.*, unpublished).

Pathway-Specific Regulation by Transcription Factors

Many fungal SM gene clusters contain a gene that encodes a Zn(II)2Cys₆ zinc finger TF that specifically regulates the adjacent biosynthetic genes [48]. In *B. cinerea*, 40% of the SM clusters, including the BOA one, contain a gene encoding such a candidate TF [5, 14]. The function of the candidate *bcboa13* (Figure 11.2) was recently investigated by gene deletion and expression analysis. Results indicated that BcBOA13 regulates genes that are part of the BOA cluster but not other SM genes such as those of the BOT cluster, suggesting that BcBOA13 is indeed a BOA-specific TF (A. Porquier *et al.*, unpublished). Another pathway-specific TF identified in *B. cinerea* is the Zn(II)2Cys₆ protein BcRUM1 (regulator of unknown metabolite).

Bcrum1 inactivation demonstrated that this TF is required for the co-expression of the four adjacent genes that are all possibly involved in the biosynthesis of an unknown metabolite during the early stages of the infection process [49].

As opposed to the BOA cluster, the predicted BOT cluster lacks a TF-encoding gene (Figure 11.2) [13]. Therefore, a yeast one-hybrid (YOH) approach was developed to identify regulators of the BOT genes [44]. The bidirectional promoter of *bcbot1/bcbot2* was used as bait for screening a library containing 396 out of 406 *B. cinerea* TFs, revealing a physical interaction of the BOT promoter with a Cys2His2 TF (BcYOH1). A global transcriptomic analysis of the $\Delta bcyoh1$ mutant further revealed that this TF is not specific to the BOT cluster but is rather involved in the regulation of a wide range of genes. The expression of 22 SM clusters including the BOT and BOA ones appeared BcYOH1 dependent. Moreover, the expression of genes involved in other processes such as carbohydrate metabolism, transport, virulence, or detoxification was also affected in the $\Delta bcyoh1$ mutant [44]. Further experiments are ongoing to identify a possible BOT-specific TF.

Concerted Regulation of Secondary Metabolism and Light-Dependent Development

A prominent global regulator of fungal SM is the putative methyltransferase LaeA (loss of aflR expression) that was first identified in *Aspergillus nidulans* as a regulator of SM gene clusters [50, 51]. Later, LaeA was shown to form a protein (VELVET) complex with the fungal regulatory proteins VeA and VelB that coordinates development and secondary metabolism in response to light in *A. nidulans* and other filamentous ascomycetes [52–54]. Light is also an important environmental cue for *B. cinerea* as it triggers the formation of macroconidia and represses the formation of sclerotia. Like *A. nidulans*, *B. cinerea* contains a VELVET complex composed of the orthologs BcVEL1 (VeA), BcVEL2 (VelB), and BcLAE1 (LaeA) whereby BcVEL1 functions as the bridging partner by interacting with both BcVEL2 and BcLAE1 [55]. General features of $\Delta bcvcl1$ and $\Delta bclae1$ mutants are the “always conidia” phenotype (conidiation in light and darkness accompanied by the loss of sclerotia formation), increased production of conidial/BcPKS13-derived melanin, loss of OA formation, deregulation of several SM-related genes, and reduced virulence on bean and tomato (Figure 11.3) [41, 55]. The deletion of the VelB ortholog BcVEL2 results in a similar phenotype to that of $\Delta bcvcl1$ regarding differentiation and virulence [56], which is in accordance with the interaction found between these two proteins. The outstanding role of BcVEL1 as the central part of the VELVET complex that links development and virulence is furthermore supported by the finding that mutations of this gene (single nucleotide polymorphisms causing stop codons) were identified in two wild strains (T4, 1750) showing the “always conidia” phenotype and reduced aggressiveness on the host [40, 41]. The latter strain (1750) belongs to the group of the BIK producers; and by targeted deletion of the whole *bcvcl1* in this genetic background it was shown that the formation of the red pigment depends on the VELVET complex (Figure 11.3) [40].

Recently, the light-responsive TF1 (BcLTF1) was identified by a random mutagenesis approach. As deletion mutants of the VELVET complex, the $\Delta bcltf1$ mutant exhibits hyper-conidiation accompanied by increased production of conidial/BcPKS13-derived melanin and loss of sclerotia formation (Figure 11.3). However, in contrast to the other mutants, $\Delta bcltf1$ mutants massively suffer from oxidative stress and are therefore severely impaired in growth in the light. Microarray analyses were performed to compare the transcriptional responses to 60 min of light treatment between undifferentiated mycelia of the wild type and the mutant demonstrating that BcLTF1 is required for proper regulation of the majority of light-responsive genes and additionally for the regulation of SM-related genes in a light-independent manner [17]. However, the question remains open whether BcLTF1 directly affects SM by its function as a TF or whether the effect is indirect and possibly due to changes in primary metabolism and/or the cellular redox status.

For the direct comparison of the impacts of BcVEL1, BcLAE1, and BcLTF1 on gene expression, a microarray approach was performed using grape juice medium and the three deletion mutants (Figure 11.3). Even under this condition, the deletion of *bcltf1* affected the expression profile of 11 KE-encoding genes; six genes are underexpressed and five genes are overexpressed compared to the wild type. *BcPKS13* is also overexpressed in the mutant, but to a lesser extent than on complete medium [17]. This is because *bcpks13* is already strongly expressed in the wild type on grape juice medium compared to the complete medium (Figure 11.1). The deletions of both VELVET complex members affect the expression levels of several KE-encoding genes; the profiles were similar but not identical. Thus, *bcpks7* is underexpressed in $\Delta bcvcl1$ and $\Delta bcltf1$ but not in $\Delta bclae1$, and *bcnrps1* is underexpressed in $\Delta bclae1$ only [55] (J. Schumacher *et al.*, unpublished).

BcWCL1 (“white collar”-like 1) is an example for a broad-domain TF that allows for the integration of light signals due to a blue light-sensing LOV (light-oxygen-voltage) domain. Deletion mutants exhibit hyper-conidiation as well but are not affected in OA formation and virulence in standard illumination conditions. Moreover, the mutants are partially “blind”: expression of certain light-responsive genes is no longer induced by light [57]. Recent genome-wide expression analyses revealed that a couple of KE-encoding genes are differentially expressed in the mutant, for example, *bcpks13* (conidial melanin) is overexpressed while *bcpks1* (CARs and retinal) is not induced in response to light treatment in the mutant (J. Schumacher *et al.*, unpublished).

The strong interdependence of SM and light-dependent development in *B. cinerea* is furthermore supported by identification of other mutants that are affected in both processes. For instance, the deletion of the bZIP-TF BcATF1 results in increased accumulation of aerial hyphae, reduced conidiation, loss of sclerotia formation, and increased production of BOA and BOT, which is accompanied by slightly increased colonization efficiencies on different host plants. Though BOA- and BOT-encoding genes are underexpressed in the mutant, no physical interactions between their promoters and BcATF1 could be established by yeast one-hybrid experiments, which suggests an indirect effect on SM-related gene expression [58].

Regulation of Secondary Metabolism by Conserved Signal Transduction Pathways

Another level of regulation of SM is mediated by conserved signal transduction pathways that comprise cAMP (cyclic adenosine monophosphate) and Ca^{2+} as second messengers and further include Ras superfamily proteins and mitogen-activated protein (MAP) kinases. These pathways may regulate broad domain and pathway-specific TFs. The key components of the pathways including the three MAP kinases BMP1 (FUS3/KSS1 ortholog), BMP3 (SLT2 ortholog) and BcSAK1 (HOG (high osmolarity glycerol) ortholog), the adenylate cyclase BAC and the protein kinase A (PKA) that are part of the cAMP cascade, and the calcineurin phosphatase (CN) as one of the main actors of the Ca^{2+} signaling pathway. Heterotrimeric G proteins that act as upstream elements have also been functionally studied in *B. cinerea* with regard to development, responses to different kinds of stresses as well as virulence [59, 60]. However, not much is known how these signaling pathways influence SM. The deletions of the three MAP kinases affect the production of melanin, which is accompanied by defects in proper differentiation of conidia and/or sclerotia [61]. A recent study revealed impact of the stress-activated MAP kinase BcSAK1 on the formation of the known phytotoxins: BOT, BOA, and its derivatives are produced in much lower quantities in axenic cultures of $\Delta bcsak1$ mutants compared to the wild type [62]. The same effect was found in deletion mutants of the $G\alpha$ subunit BCG1. As mutants of the cAMP pathway, that is, Δbac and $\Delta bcpkal$ mutants are not impaired in the formation of toxins [63], a second downstream pathway of BCG1 has been hypothesized. This turned out to be the Ca^{2+} /CN pathway that is linked with the heterotrimeric G protein *via* a phospholipase C (BcPLC1) [64]. The inhibition of CN by cyclosporine A and the deletion of components of the latter pathway such as the CN regulator BcRCN1 and the CN-responsive TF BcCRZ1 resulted in decreased expression levels of BOT- and BOA-biosynthetic genes [27, 66]. More recently, the contribution of Ca^{2+} -dependent signal transduction to the regulation of the carotenogenic genes has been revealed; their expression levels are induced by Ca^{2+} addition, suggesting a link between Ca^{2+} - and light-/BcWCL1-dependent signaling (J. Schumacher *et al.*, unpublished).

Role of the Chromatin Landscape in the Regulation of Secondary Metabolism?

Active TFs are not always sufficient to express SM genes as clusters can be embedded within transcriptionally silent heterochromatin. Chromatin-based regulation through histone acetylation and methylation has recently been shown to play a significant role in the regulation of SM clusters in *A. nidulans* and other model fungi [47, 48, 67]. In *B. cinerea*, the occurrence of such mechanisms has not yet been shown, but several relevant clues are already available.

Firstly, some of the clusters are in particular genomic environments. The whole genome sequence of *B. cinerea* was recently assembled into 16 core chromosomes

(J. van Kan *et al.*, unpublished) and this revealed that six SM gene clusters including the BOA one are located in subtelomeric regions. *bcboa1* is even the closest gene to one of the telomeres of chromosome 1. Studies in other fungi have shown that these regions are more often subjected to chromatin-mediated regulation [67]. In addition, both BOT and BOA clusters are surrounded by several kb of AT-rich regions (>80%; Figure 11.2) [14] (J. van Kan *et al.*, unpublished). In the case of the BOA cluster, a 16 kb-stretch of AT-rich sequence is even present inside the cluster between *bcboa6* and *bcboa7*. Again, such AT-rich regions may correspond to heterochromatin structure and may be under the control of histone modifiers as demonstrated for effector genes that are specifically expressed during infection in *Leptosphaeria maculans* [68]. The fact that the clusters encoding the two main phytoalexins of *B. cinerea* share similar AT-rich surrounding regions raises questions about the importance of the role of these genomic features in chromatin structure and gene expression.

Secondly, the characterization of several regulators in *B. cinerea* revealed a possible involvement of chromatin-mediated regulation. The mode of action of the global regulator LaeA mentioned above remains enigmatic, but there are some evidences in *A. nidulans* that it counteracts some silencing heterochromatic marks [69].

Another example is the transcriptional regulator BcREG1 that is required for conidiogenesis, production of BOA and BOT, and colonization of the host tissues [70]. The mode of action of BcREG1 remains obscure, but a recent study on the ortholog SGE1 in *Fusarium fujikuroi* suggests that these regulators may act on the chromatin level [71].

Finally, the mutation of *bcspt3*, encoding a component of the multisubunit SAGA (Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase) complex, resulted in an altered brownish/yellowish pigmentation suggesting that the disruption of the SAGA complex may affect the repertoire of expressed SM genes in *B. cinerea* [72]. The SAGA complex is required to activate transcription of a subset of RNA polymerase II-dependent genes by modifying the histones, especially in response to environmental stresses [73, 74].

Genetic studies on histone modifiers are currently in progress to investigate the role of chromatin modifications (methylation and acetylation) in the regulation of secondary metabolism in *B. cinerea* (J. Schumacher *et al.*, unpublished; A. Porquier *et al.*, unpublished).

Concluding Remarks

Although many actors of the regulation of the secondary metabolism in *B. cinerea* have been identified in the past years, important studies remain to be conducted to understand the complex regulatory network from the upstream environmental signals to the downstream regulators that directly interact with SM biosynthetic gene clusters to allow the production of bioactive compounds. This knowledge is crucial to understand the development and virulence of *B. cinerea* and may provide useful start points for the identification of new biological targets to control

this crop-devastating fungus. This knowledge could also provide approaches to “wake up” silent SM clusters during *in vitro* growth and discover new bioactive compounds. Possible approaches include genetic engineering (e.g., overexpression of pathway-specific TFs, modification of the chromatin landscape) and co-culturing with other microorganisms [47, 74]. In addition to their activities toward plants, new SMs isolated from *B. cinerea* could have interesting toxic activities toward other organisms (fungi, oomycetes, insects, bacteria, nematodes, etc.) that can be exploited in biotechnology. Indeed, as more fungal genome sequences are becoming available and more SM biosynthetic genes are being identified, fungi re-emerge as important resources for new therapeutic and agrochemical agents [75, 76].

References

- Dean, R. *et al.* (2012) The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.*, **13** (4), 414–430.
- Coley-Smith, J.R., Verhoeff, K., and Jarvis, W.R. (1980) *The Biology of Botrytis cinerea*, Academic Press, London.
- Williamson, B. *et al.* (2007) Botrytis cinerea: the cause of grey mould disease. *Mol. Plant Pathol.*, **8** (5), 561–580.
- Choquer, M. *et al.* (2007) Botrytis cinerea virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiol. Lett.*, **277** (1), 1–10.
- Amselem, J. *et al.* (2011) Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genet.*, **7** (8), e1002230.
- van Kan, J.A. (2006) Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci.*, **11** (5), 247–253.
- Hahn, M., Viaud, M., and van Kan, J. (2014) in *Genomics of Plant-Associated Fungi and Oomycetes* (eds R. Dean, A. Lichens-Park, and C. Kole), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 19–44.
- Barnes, S.E. and Shaw, M.W. (2003) Infection of commercial hybrid primula seed by botrytis cinerea and latent disease spread through the plants. *Phytopathology*, **93** (5), 573–578.
- van Kan, J.A., Shaw, M.W., and Grant-Downton, R.T. (2014) Botrytis species: relentless necrotrophic thugs or endophytes gone rogue? *Mol. Plant Pathol.*, **15** (9), 957–961.
- Pucheu-Planté, B. and Mercier, M. (1983) Etude ultrastructurale de l'interrelation hôte-parasite entre le raisin et le champignon *Botrytis cinerea*: exemple de la pourriture noble en Sauternais. *Can. J. Bot.*, **61** (6), 1785–1797.
- Collado, I.G. and Viaud, M. (2016) Secondary metabolism in Botrytis cinerea: combining genomic and metabolomic approaches, in *Botrytis – The Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems* (eds S. Fillinger and Y. Elad), Springer, International Publishing, pp. 291–313.
- Siewers, V., Smedsgaard, J., and Tudzynski, P. (2004) The P450 monooxygenase BcABA1 is essential for abscisic acid biosynthesis in Botrytis cinerea. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70** (7), 3868–3876.
- Pinedo, C. *et al.* (2008) Sesquiterpene synthase from the botrydial biosynthetic gene cluster of the phytopathogen Botrytis cinerea. *ACS Chem. Biol.*, **3** (12), 791–801.
- Dalmaï, B. *et al.* (2011) The Botrytis cinerea phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. *Mol. Plant Pathol.*, **12** (6), 564–579.
- Massaroli, M. *et al.* (2013) A shared biosynthetic pathway for botcinins and botrylactones revealed through gene deletions. *ChemBioChem*, **14** (1), 132–136.

- 16 Kroken, S. *et al.* (2003) Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100** (26), 15670–15675.
- 17 Schumacher, J. *et al.* (2014) The transcription factor BcLTF1 regulates virulence and light responses in the necrotrophic plant pathogen *Botrytis cinerea*. *PLoS Genet.*, **10** (1), e1004040.
- 18 Zhang, C. *et al.* (2015) Loss of *bcbnr1* and *bcpks13* in *Botrytis cinerea* not only blocks melanization but also increases vegetative growth and virulence. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **28** (10), 1091–1101
- 19 Schumacher, J. (2015) DHN melanin biosynthesis in the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea* is based on two developmentally regulated key enzyme (PKS)-encoding genes. *Mol. Microbiol.* (in press) doi: 10.1111/mmi.13262.
- 20 Siewers, V. *et al.* (2006) Identification of an abscisic acid gene cluster in the grey mold *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72** (7), 4619–4626.
- 21 Jeya, M. *et al.* (2012) The *Botrytis cinerea* type III polyketide synthase shows unprecedented high catalytic efficiency toward long chain acyl-CoAs. *Mol. Biosyst.*, **8** (11), 2864–2867.
- 22 Han, Y. *et al.* (2007) Oxaloacetate hydrolyase, the C-C bond lyase of oxalate secreting fungi. *J. Biol. Chem.*, **282** (13), 9581–9590.
- 23 Bushley, K.E. and Turgeon, B.G. (2010) Phylogenomics reveals subfamilies of fungal nonribosomal peptide synthetases and their evolutionary relationships. *BMC Evol. Biol.*, **10**, 26.
- 24 Jorgensen, S.H. *et al.* (2014) *Fusarium graminearum* PKS14 is involved in orsellinic acid and orcinol synthesis. *Fungal Genet. Biol.*, **70**, 24–31.
- 25 Siewers, V. *et al.* (2005) Functional analysis of the cytochrome P450 monooxygenase gene *bcbot1* of *Botrytis cinerea* indicates that botrydial is a strain-specific virulence factor. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **18** (6), 602–612.
- 26 Collado, I.G., Sanchez, A.J., and Hanson, J.R. (2007) Fungal terpene metabolites: biosynthetic relationships and the control of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Nat. Prod. Rep.*, **24** (4), 674–686.
- 27 Viaud, M. *et al.* (2003) Cyclophilin A and calcineurin functions investigated by gene inactivation, cyclosporin A inhibition and cDNA arrays approaches in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Mol. Microbiol.*, **50** (5), 1451–1465.
- 28 Rossi, F.R. *et al.* (2011) The sesquiterpene botrydial produced by *Botrytis cinerea* induces the hypersensitive response on plant tissues and its action is modulated by salicylic acid and jasmonic acid signaling. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **24** (8), 888–896.
- 29 Tani, H. *et al.* (2005) Botcinins A, B, C, and D, metabolites produced by *Botrytis cinerea*, and their antifungal activity against *Magnaporthe grisea*, a pathogen of rice blast disease. *J. Nat. Prod.*, **68**, 1768–1772.
- 30 Tani, H. *et al.* (2006) Botcinins E and F and botcinolide from *Botrytis cinerea* and structural revision of botcinolides. *J. Nat. Prod.*, **69**, 722–725.
- 31 Oritani, T. and Kiyota, H. (2003) Biosynthesis and metabolism of abscisic acid and related compounds. *Nat. Prod. Rep.*, **20** (4), 414–425.
- 32 Liang, X. *et al.* (2015) Oxaloacetate acetylhydrolase gene mutants of *Sclerotinia sclerotiorum* do not accumulate oxalic acid, but do produce limited lesions on host plants. *Mol. Plant Pathol.*, **16** (6), 559–571.
- 33 Stefanato, F.L. *et al.* (2008) Oxaloacetate acetylhydrolase is responsible for oxalic acid production in *Botrytis cinerea* and required for lesion expansion on some, but not on most host plants. 3rd *Botrytis Genome Workshop*, Tenerife, Spain.
- 34 Doss, R.P. *et al.* (2003) Melanin in the extracellular matrix of germlings of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, **63** (6), 687–691.
- 35 Zeun, R. and Buchenauer, H. (1985) Effect of tricyclazole on production and melanin contents of sclerotia of *Botrytis cinerea*. *Phytopathol. Z.*, **112**, 259–267.
- 36 Gao, Q. and Garcia-Pichel, F. (2011) Microbial ultraviolet sunscreens. *Nat. Rev. Microbiol.*, **9** (11), 791–802.

- 37 Avalos, J. and Estrada, A.F. (2010) Regulation by light in *Fusarium*. *Fungal Genet. Biol.*, **47** (11), 930–938.
- 38 Wiemann, P. *et al.* (2009) Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation. *Mol. Microbiol.*, **72** (4), 931–946.
- 39 Campbell, M.A., Rokas, A., and Slot, J.C. (2012) Horizontal transfer and death of a fungal secondary metabolic gene cluster. *Genome Biol. Evol.*, **4** (3), 289–293.
- 40 Schumacher, J. *et al.* (2013) A functional bikaverin biosynthesis gene cluster in rare strains of *Botrytis cinerea* is positively controlled by VELVET. *PLoS One*, **8** (1), e53729.
- 41 Schumacher, J. *et al.* (2012) Natural variation in the VELVET gene *bcvel1* affects virulence and light-dependent differentiation in *Botrytis cinerea*. *PLoS One*, **7** (10), e47840.
- 42 Reino, J.L. *et al.* (2004) Virulence-toxin production relationship in isolates of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *J. Phytopathol.*, **152**, 563–566.
- 43 Kelloniemi, J. *et al.* (2015) Analysis of the molecular dialogue between gray mold (*Botrytis cinerea*) and grapevine (*Vitis vinifera*) reveals a clear shift in defense mechanisms during berry ripening. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **28** (11), 1167–1180.
- 44 Simon, A. *et al.* (2013) Screening of a *Botrytis cinerea* one-hybrid library reveals a Cys2His2 transcription factor involved in the regulation of secondary metabolism gene clusters. *Fungal Genet. Biol.*, **52**, 9–19.
- 45 Collado, I.G. *et al.* (2000) *Botrytis* species: an intriguing source of metabolites with wide ranges of biological activities. Structure, chemistry and bioactivity of metabolites isolated from *Botrytis* species. *Curr. Org. Chem.*, **4**, 1261–1286.
- 46 Hoffmeister, D. and Keller, N.P. (2007) Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Nat. Prod. Rep.*, **24** (2), 393–416.
- 47 Brakhage, A.A. (2013) Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.*, **11** (1), 21–32.
- 48 Wiemann, P. and Keller, N.P. (2014) Strategies for mining fungal natural products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **41** (2), 301–313.
- 49 Leroch, M. *et al.* (2013) Transcriptome profiling of *Botrytis cinerea* conidial germination reveals upregulation of infection-related genes during the prepenetration stage. *Eukaryot. Cell*, **12** (4), 614–626.
- 50 Bok, J.W. *et al.* (2005) *LaeA*, a regulator of morphogenetic fungal virulence factors. *Eukaryot. Cell*, **4** (9), 1574–1582.
- 51 Bok, J.W. and Keller, N.P. (2004) *LaeA*, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot. Cell*, **3** (2), 527–535.
- 52 Bayram, O. *et al.* (2008) *VelB/VeA/LaeA* complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science*, **320** (5882), 1504–1506.
- 53 Bayram, O. and Braus, G.H. (2012) Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol. Rev.*, **36** (1), 1–24.
- 54 Sarikaya-Bayram, O. *et al.* (2015) One Juliet and four Romeos: *VeA* and its methyltransferases. *Front. Microbiol.*, **6**, 1.
- 55 Schumacher, J. *et al.* (2015) The VELVET complex in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*: impact of *BcLAE1* on differentiation, secondary metabolism, and virulence. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **28** (6), 659–674.
- 56 Yang, Q., Chen, Y., and Ma, Z. (2013) Involvement of *BcVeA* and *BcVelB* in regulating conidiation, pigmentation and virulence in *Botrytis cinerea*. *Fungal Genet. Biol.*, **50**, 63–71.
- 57 Canessa, P. *et al.* (2013) Assessing the effects of light on differentiation and virulence of the plant pathogen *Botrytis cinerea*: characterization of the white collar complex. *PLoS One*, **8** (12), e84223.
- 58 Temme, N. *et al.* (2012) *BcAtf1*, a global regulator, controls various differentiation processes and phytotoxin production in *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.*, **13** (7), 704–718.

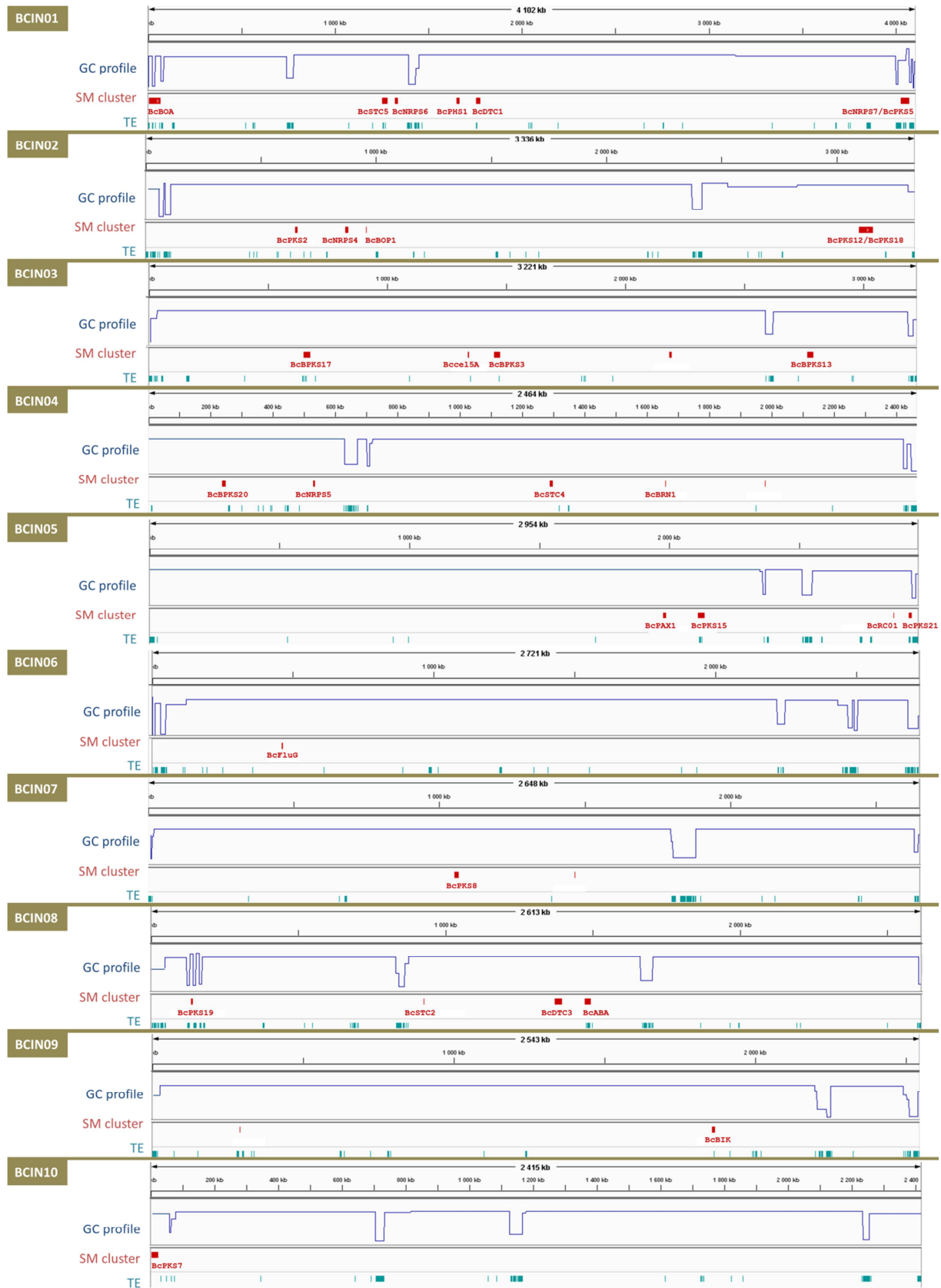
- 59 Schumacher, J. and Tudzynski, P. (2012) in *Morphogenesis and Pathogenicity in Fungi* (eds J. Pérez-Martín and A. Di Pietro), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 225–241.
- 60 Schumacher, J. (2016) Signal transduction cascades regulating differentiation and virulence in *Botrytis cinerea*, in *Botrytis – The Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems* (eds S. Fillinger and Y. Elad), Springer International Publishing, pp. 247–267.
- 61 Liu, W. *et al.* (2011) The osmosensing signal transduction pathway from *Botrytis cinerea* regulates cell wall integrity and MAP kinase pathways control melanin biosynthesis with influence of light. *Fungal Genet. Biol.*, **48** (4), 377–387.
- 62 Heller, J. *et al.* (2012) The mitogen-activated protein kinase BcSak1 of *Botrytis cinerea* is required for pathogenic development and has broad regulatory functions beyond stress response. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **25** (6), 802–816.
- 63 Schumacher, J. *et al.* (2008) The cAMP-dependent signaling pathway and its role in conidial germination, growth, and virulence of the gray mold *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **21** (11), 1443–1459.
- 64 Schumacher, J. *et al.* (2008) The Galpha subunit BCG1, the phospholipase C (BcPLC1) and the calcineurin phosphatase co-ordinately regulate gene expression in the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *Mol. Microbiol.*, **67** (5), 1027–1050.
- 65 Harren, K., Schumacher, J., and Tudzynski, B. (2012) The Ca²⁺/calcineurin-dependent signaling pathway in the gray mold *Botrytis cinerea*: the role of calcipressin in modulating calcineurin activity. *PLoS One*, **7** (7), e41761.
- 66 Schumacher, J., de Larrinoa, I.F., and Tudzynski, B. (2008) Calcineurin-responsive zinc finger transcription factor CRZ1 of *Botrytis cinerea* is required for growth, development, and full virulence on bean plants. *Eukaryot. Cell*, **7** (4), 584–601.
- 67 Galazka, J.M. and Freitag, M. (2014) Variability of chromosome structure in pathogenic fungi--of 'ends and odds'. *Curr. Opin. Microbiol.*, **20**, 19–26.
- 68 Soyer, J.L. *et al.* (2014) Epigenetic control of effector gene expression in the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *PLoS Genet.*, **10** (3), e1004227.
- 69 Reyes-Dominguez, Y. *et al.* (2010) Heterochromatic marks are associated with the repression of secondary metabolism clusters in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.*, **76** (6), 1376–1386.
- 70 Michielse, C.B. *et al.* (2011) The *Botrytis cinerea* Reg1 protein, a putative transcriptional regulator, is required for pathogenicity, conidiogenesis, and the production of secondary metabolites. *Mol Plant Microbe Interact.*, **24** (9), 1074–1085.
- 71 Michielse, C.B. *et al.* (2015) The global regulator FFSge1 is required for expression of secondary metabolite gene clusters but not for pathogenicity in *Fusarium fujikuroi*. *Environ Microbiol.*, **17** (8), 2690–2708.
- 72 Giesbert, S. *et al.* (2012) Identification of pathogenesis-associated genes by T-DNA-mediated insertional mutagenesis in *Botrytis cinerea*: a type 2A phosphoprotein phosphatase and an SPT3 transcription factor have significant impact on virulence. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **25** (4), 481–495.
- 73 Baker, S.P. and Grant, P.A. (2007) The SAGA continues: expanding the cellular role of a transcriptional co-activator complex. *Oncogene*, **26** (37), 5329–5340.
- 74 Nutzmann, H.W. *et al.* (2011) Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans* requires Saga/Ada-mediated histone acetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108** (34), 14282–14287.
- 75 Scherlach, K. and Hertweck, C. (2009) Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Org. Biomol. Chem.*, **7** (9), 1753–1760.
- 76 Aghcheh, R.K. and Kubicek, C.P. (2015) Epigenetics as an emerging tool for improvement of fungal strains used in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **99** (15), 6167–6181.

5. Objectifs de mon projet de thèse

Le pouvoir pathogène de *B. cinerea* repose en partie sur la production de phytotoxines impliquées dans l'induction de la mort cellulaire chez l'hôte. Cependant, les mécanismes qui gouvernent la production de ces métabolites restaient inexplicables avant le début de ma thèse. **L'objectif de mon projet était donc d'étudier les mécanismes qui permettent la régulation du métabolisme secondaire chez *B. cinerea*. Plus particulièrement, je me suis intéressé à la régulation de la production de métabolites impliqués dans le processus nécrotrophe.** D'après ce qui a été présenté dans cette introduction générale, des acteurs agissant à différents niveaux hiérarchiques gouvernent l'expression du métabolisme secondaire chez d'autres espèces fongiques. Durant ma thèse, j'ai donc voulu répondre aux questions suivantes : **1. Des facteurs de transcription spécifiques sont-ils impliqués dans la régulation des clusters du métabolisme secondaire chez *B. cinerea* ? 2. Est-ce que la structure de la chromatine a un rôle dans le contrôle de l'expression de ces mêmes clusters ?** Pour répondre à ces questions, je me suis particulièrement intéressé aux clusters BOT (responsable de la production de botrydial), BOA (responsable de la production d'acide botcinique) et PKS7 (responsable de la production d'un métabolite putatif potentiellement impliqué dans le pouvoir pathogène de *B. cinerea*). Dans le **Chapitre I**, nous avons mené la caractérisation de du FT spécifique putatif (**BcBot6**) du cluster BOT. Le **Chapitre II** présente la caractérisation du FT majeur de la production d'acide botcinique (**BcBoa13**). En plus de ces deux phytotoxines connues chez *B. cinerea* (botrydial et acide botcinique), nous nous sommes intéressés à un métabolite putatif produit par le cluster PKS7. Dans le cadre d'un travail annexe à mon objectif principal, nous avons cherché à isoler ce métabolite pour le caractériser. Cette étude est présentée dans le **Chapitre III**. Finalement, pour tester l'hypothèse d'une régulation chromatinienne des clusters BOT, BOA et PKS7, nous avons initié **la caractérisation de trois modificateurs chromatiniens (Chapitre IV)**.

Au cours de ma thèse nous avons eu accès à la nouvelle annotation du génome de B05.10 (van Kan *et al.*, 2016). Grâce à l'obtention de ces informations, nous avons pu localiser les clusters prédits du métabolisme secondaire sur le génome (**Fig. 25**). Ces données sont importantes puisque plusieurs études suggèrent que la localisation et l'environnement génomique des clusters du métabolisme

secondaire sont impliqués dans leur régulation. Ces aspects sont discutés dans les différents chapitres de ce manuscrit.



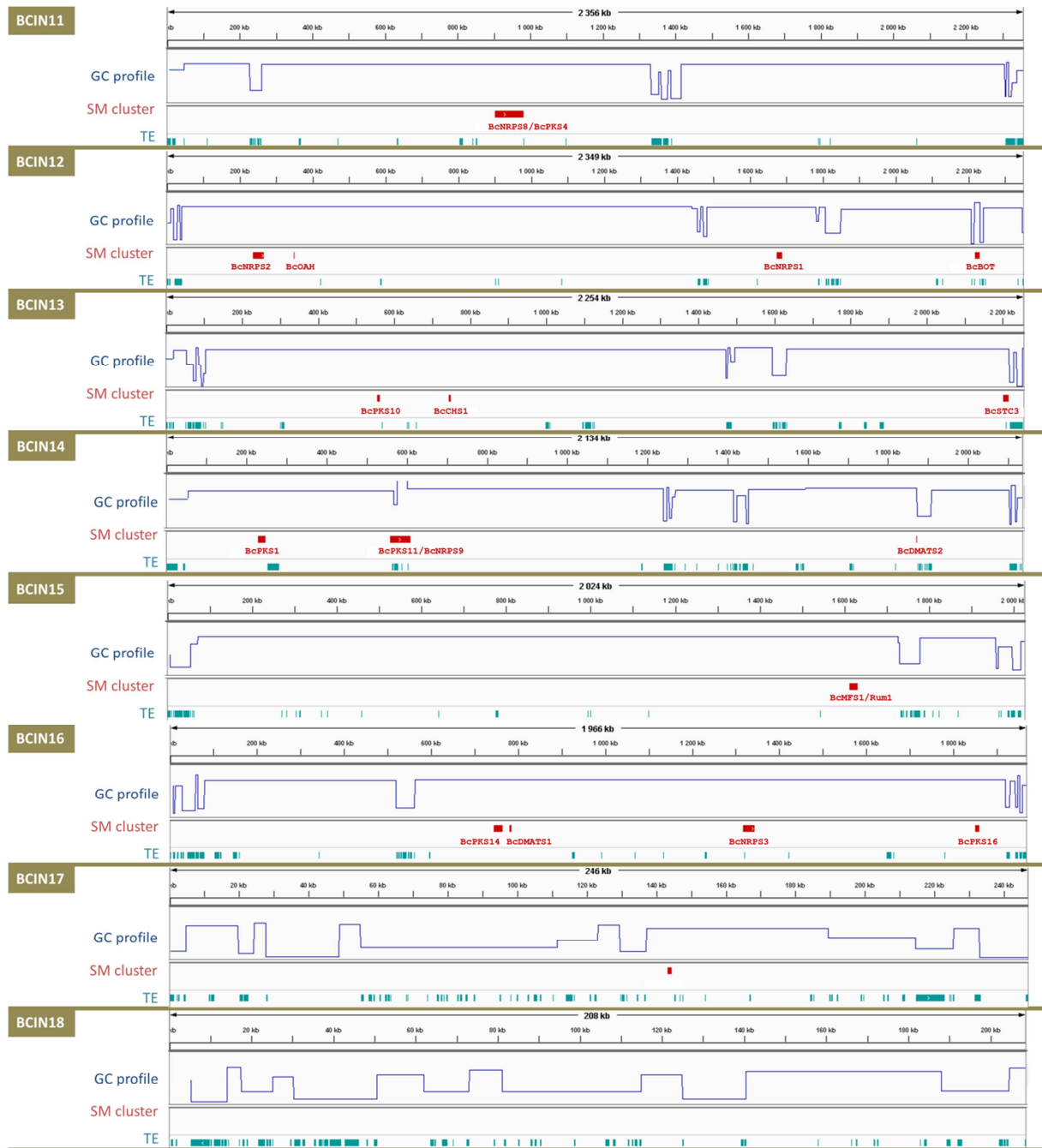


Fig. 25. Représentation de la localisation des clusters du métabolisme secondaire, des éléments transposables ainsi que de l'évolution du pourcentage G+C sur les chromosomes chez B05.10.

Les clusters du métabolisme secondaire chez B05.10 sont présentés dans la **partie 4 de cette Introduction générale**. L'annotation des éléments transposables (TE ici) a été réalisée sur l'ensemble du génome de référence de B05.10 (Porquier *et al.*, 2016; **Chapitre I**). L'évolution du pourcentage G+C a été visualisée grâce au calcul de points de segmentation par GC-profile (Gao et Zhang, 2006).

Chapitre I

Régulation spécifique du cluster du botrydial chez *B. cinerea*

Présentation de l'article

La production de phytotoxines est impliquée dans le pouvoir pathogène de *B. cinerea* (Siewers *et al.*, 2005; Dalmais *et al.*, 2011; Rossi *et al.*, 2011). Le botrydial est probablement le métabolite le plus connu et le plus étudié parmi les molécules produites par l'agent de la pourriture grise. L'étude des acteurs qui gouvernent l'expression des gènes *Bcbot* responsables de sa synthèse présente donc un intérêt pour avoir une vue globale des mécanismes aboutissant à la production de ce métabolite phytotoxique.

Avec les données génomiques disponibles avant la publication de la nouvelle annotation de B05.10, aucun FT spécifique du cluster BOT n'avait pu être identifié malgré des recherches actives (Simon *et al.*, 2013). Grâce aux nouvelles données génomiques disponibles (van Kan *et al.*, 2016), nous avons identifié un gène candidat localisé à proximité des gènes *Bcbot* déjà caractérisés et susceptible de coder un FT spécifique du cluster BOT. La caractérisation de ce gène est présentée ci-après dans l'article « **The botrydial biosynthetic gene cluster of *Botrytis cinerea* displays a bipartite genomic structure and is positively regulated by the putative Zn(II)₂Cys₆ transcription factor BcBot6.** » publié dans *Fungal Genetics and Biology* en Octobre 2016.



Regular Articles

The botrydial biosynthetic gene cluster of *Botrytis cinerea* displays a bipartite genomic structure and is positively regulated by the putative Zn(II)₂Cys₆ transcription factor BcBot6



Antoine Porquier^{a,b}, Guillaume Morgant^b, Javier Moraga^c, Bérengère Dalmais^b, Isabelle Luyten^d, Adeline Simon^b, Jean-Marc Pradier^b, Joëlle Amselem^d, Isidro González Collado^{c,1}, Muriel Viaud^{b,*,1}

^a Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France

^b UMR BIOGER, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78850 Thiverval-Grignon, France

^c Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz, 11510 Puerto Real, Cádiz, Spain

^d URGI, INRA, Université Paris-Saclay, 78026 Versailles, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 July 2016

Revised 30 September 2016

Accepted 5 October 2016

Available online 6 October 2016

Keywords:

Botrytis cinerea

Secondary metabolism

Toxin

Botrydial

Transcription factor

Zn(II)₂Cys₆

ABSTRACT

Botrydial (BOT) is a non-host specific phytotoxin produced by the polyphagous phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. The genomic region of the BOT biosynthetic gene cluster was investigated and revealed two additional genes named *Bcbot6* and *Bcbot7*. Analysis revealed that the G + C/A + T-equilibrated regions that contain the *Bcbot* genes alternate with A + T-rich regions made of relics of transposable elements that have undergone repeat-induced point mutations (RIP). Furthermore, BcBot6, a Zn(II)₂Cys₆ putative transcription factor was identified as a nuclear protein and the major positive regulator of BOT biosynthesis. In addition, the phenotype of the Δ *Bcbot6* mutant indicated that BcBot6 and therefore BOT are dispensable for the development, pathogenicity and response to abiotic stresses in the *B. cinerea* strain B05.10. Finally, our data revealed that *B. pseudocinerea*, that is also polyphagous and lives in sympatry with *B. cinerea*, lacks the ability to produce BOT. Identification of BcBot6 as the major regulator of BOT synthesis is the first step towards a comprehensive understanding of the complete regulation network of BOT synthesis and of its ecological role in the *B. cinerea* life cycle.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Filamentous fungi are well-known producers of so-called secondary metabolites (SMs) or natural products, many of which confer either beneficial or detrimental properties. For example, the polyketide lovastatin is widely used as an anti-cholesterol drug (Manzoni and Rollini, 2002) whereas aflatoxin is carcinogenic and is a threat for both humans and animals (Hoffmeister and Keller, 2007). These molecules, generally of low molecular weight, can be considered as conditional for fungal growth and their production is often linked to developmental programs (Calvo et al., 2002). In most cases, their role is unknown but some studies

demonstrate their importance for protecting fungi e.g. against predation (Rohlf and Churchill, 2011) or to survive in hostile environment (Eisenman and Casadevall, 2012). Unique features of the genes involved in SM biosynthesis is their genomic colocalization (Smith et al., 1990; Keller and Hohn, 1997; Hoffmeister and Keller, 2007) as well as their co-regulation (Yin and Keller, 2011).

To be able to finely respond to different stimuli, fungi have evolved sophisticated gene regulation mechanisms. In particular, the ability of fungi to produce SMs during orchestrated time and in different environments implies complex hierarchical regulatory mechanisms. Around 60% of known fungal secondary metabolism gene clusters possess a pathway specific transcription factor (TF; Brakhage, 2012). In general, those proteins belong to the Zn(II)₂Cys₆ TF family and specifically regulate the genes of their corresponding cluster (Knox and Keller, 2015).

In addition to a specific type of regulators, broad domain TFs are involved in the regulation of fungal genes involved in SMs produced in response to environmental stimuli (e.g. pH, carbon and

Abbreviations: SM, secondary metabolite; BOT, botrydial; BOA, botcinic acid; PKS, polyketide synthase; TF, transcription factor; TE, transposable element; RIP, repeat-induced point mutation; GFP, green fluorescent protein; HPLC, High-pressure liquid chromatography; NMR, Nuclear Magnetic Resonance.

* Corresponding author.

E-mail address: viaud@versailles.inra.fr (M. Viaud).

¹ Co-senior authors.

nitrogen source or redox status) (Brakhage, 2012). One example is the GATA TF AreA that regulates different clusters in diverse fungal species according to the available nitrogen source (Tudzynski et al., 1999; Kim and Woloshuk, 2008; Tudzynski, 2014).

Even though the action of TFs is necessary to regulate fungal SM genes, it is not always sufficient. Indeed, chromatin is a dynamic structure that can switch from the transcriptionally permissive euchromatin (opened state) to the repressive heterochromatin (condensed state) and *vice versa* (Palmer and Keller, 2010). This process is mediated by post-translational modifications of histone residues such as the trimethylation of the lysine 9 residue of histone 3 (H3K9me3) deposited by DIM-5 in *Neurospora crassa* (Tamaru and Selker, 2001). The presence of H3K9me3 mark is often associated with A + T-rich sequences that result through a process known as RIP for Repeat-Induced Point mutations (Hane et al., 2015). This pre-meiotic defense system aims to protect the genome from invasive elements such as transposable elements (TEs) or viruses by mutating C to T bases within duplicated sequences.

The putative methyltransferase LaeA is another important global regulator of SM in fungi is the putative methyltransferase LaeA. This nuclear protein interacts with VeA and VelB to form the fungal specific Velvet complex that mediates development and SM genes expression in response to light (Bayram et al., 2008). The mode of action of LaeA is currently unknown but a study in *Aspergillus nidulans* by Reyes-Dominguez et al. (2010) suggests that it might counteract the establishment of the repressive H3K9me3 mark and thereby have an impact on chromatin structure.

Botrytis cinerea is an Ascomycetous necrotrophic fungus that induces gray mold disease on more than 1400 plant species (Elad et al., 2016). This fungus is considered as one of the most important fungal plant pathogens and causes important economic losses on grapevine and many other fruits and flowers (Dean et al., 2012). Numerous SMs have been isolated from *B. cinerea* fermentation cultures (Collado et al., 2007; Collado and Viaud, 2016) including two non-host specific phytotoxins: the sesquiterpene botrydial (BOT) and its derivatives (botryanes) as well as the polyketide botcinic acid (BOA) and the structurally related botcinins. The genes involved in the production of both BOT and BOA are organized in clusters within the *B. cinerea* genome. The BOT gene cluster contains five genes encoding biosynthesis enzymes. *Bcbot2* encodes a sesquiterpene cyclase which is the first fungal key enzyme demonstrated to be able to convert farnesyl pyrophosphate into presilphiperfolan-8-β-ol (Pinedo et al., 2008). *Bcbot1*, *Bcbot3* and *Bcbot4* encode cytochrome P450 proteins. Finally, *Bcbot5* encodes a putative acetyl transferase probably also involved in the biosynthesis of the toxin (Siewers et al., 2005; Collado and Viaud, 2016). The BOA cluster is composed of sixteen predicted genes with two encoding the polyketide synthase (PKS) key enzymes (namely *Bcboa6* and *Bcboa9*), ten encoding enzymes putatively involved in the further steps of the biosynthesis and two encoding putative regulators: a putative NmrA-like regulator (*Bcboa1*) and a putative specific regulator encoding a Zn(II)₂Cys₆ TF (*Bcboa13*) (Dalmais et al., 2011).

Both BOT and BOA are phytotoxic. BOT is produced during infection in *planta* (Deighton et al., 2001) and has been shown to induce chlorosis symptoms typical of the gray mold when applied exogenously (Rebordinos et al., 1996; Colmenares et al., 2002). Dihydrobotrydial and other derivatives also display phytotoxic activity but to a lesser extent than BOT (Durán-Patrón et al., 1999; Colmenares et al., 2002; Collado and Viaud, 2016). In the same manner, exogenous application of BOA and derivatives leads to chlorosis and necrosis on different plant hosts underlying their phytotoxic activity (Cutler et al., 1993, 1996). Inactivation of both *Bcbot2* and *Bcboa6* and the subsequent absence of BOT and BOA production showed that these toxins are involved in the colonization of plant tissues (Dalmais et al., 2011). Nevertheless, their

mode of action remains enigmatic and only scarce information is available regarding their regulation.

To date it has been demonstrated that both BOA and BOT gene clusters are under the control of two signal transduction pathways. The first one cascade involves BCG1 α subunit of a heterotrimeric G protein, phospholipase C (BcPlc1), calcineurin phosphatase and the downstream C₂H₂ TF BcCrz1 (Viaud et al., 2003; Pinedo et al., 2008; Schumacher, 2008a, 2008b; Dalmais et al., 2011). The second is the stress-induced MAP kinase cascade (Heller et al., 2012) with the downstream bZIP TF BcAtf1 (Temme et al., 2012) and the BcReg1 transcriptional regulator (Michielse et al., 2011). In addition, it was demonstrated that *B. cinerea* secondary metabolism is greatly influenced by light-dependent development (Viaud et al., 2016). In *B. cinerea*, the perception of light triggers the production of macroconidia and represses the formation of sclerotia. This developmental program involves the members of the Velvet complex BcVel1, BcVel2 and BcLae1 (the orthologs of VeA, VelB and LaeA, respectively) (Schumacher et al., 2012, 2015; Yang et al., 2013). The deletion of the Velvet partners leads to abnormal constant production of conidia even in sclerotia-inducing conditions *i.e.* darkness, increase in conidial melanin (Schumacher, 2016), loss of oxalic acid formation and reduced virulence. In addition, sixteen SM gene clusters are affected by either deletion of *Bcvel1* or *Bclae1* or by both. In particular, the BOT and BOA gene clusters were shown to be positively regulated by BcLae1.

The gene deletion of all the regulators presented above results in pleiotropic phenotypes and does not point to specific regulation of the biosynthesis of the BOT and BOA phytotoxins. As introduced above, the gene *Bcboa13* located in the BOA gene cluster is predicted to encode a Zn(II)₂Cys₆ TF and is likely a pathway specific regulator (Dalmais et al., 2011). In contrast, no gene encoding a putative regulator has been identified to date in the BOT gene cluster. To find a BOT specific regulator, Simon et al. (2013) constructed a Yeast One Hybrid library containing nearly all *B. cinerea* TFs (396 out of the 406 predicted TFs). The screening of the library using the bidirectional promoter of *Bcbot1-2* as bait led to the identification of the C₂H₂ TF BcYoh1. A global transcriptomic analysis of the *ΔBcyoh1* mutant revealed this TF to be a global transcriptional regulator not only acting on the BOT and other SM gene clusters but also on carbohydrate metabolism, transport, virulence and detoxification mechanisms.

Until this report, the existence of a BOT-specific TF was still hypothetical. The publication of the complete *de novo* assembly of the WT strain B05.10 allowed us to identify a putative Zn(II)₂-Cys₆ TF-encoding gene located adjacent to known *Bcbot* genes. In this study, we aimed to functionally characterize this gene and to investigate its presumed regulatory role on the BOT gene cluster. Through gene inactivation, the function of BcBot6 as a positive regulator of BOT production was examined. Moreover, we explored the genomic region containing *Bcbot* genes for A + T-rich regions/islands and the presence of RIPed TEs. Finally, we questioned the role of BOT in fungal development, virulence and response to abiotic stresses through a combination of genetic and molecular approaches.

2. Material and methods

2.1. Cultivation of *B. cinerea* strains

The *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. model strain B05.10 was used as a recipient strain for genetic modifications (Quidde et al., 1998). Routine cultivation of the strains was carried out on rich medium (RM; 20 g/L malt extract, 5 g/L yeast extract and 15 g/L agar) supplemented, for mutant strains, with hygromycin B (Sigma-Aldrich; 100 μg/ml) or nourseothricin (Werner Bioagents; 80 μg/

mL). The plates were incubated in an environmental chamber at 21 °C with an alternation of 12 h of white light and 12 h of darkness. Minimal medium (MM; 20 g/L glucose, 2 g/L NaNO₃, 15 g/L agar, 1 g/L KH₂PO₄, 0.5 g/L KCl, 0.5 g/L MgSO₄, 7H₂O, 0.01 g/L FeSO₄, 7H₂O) and grape juice medium (pH adjusted to 4; 15 g/L agar) were also used for specific purposes. In the modified MM with ammonium, (NH₄)₂SO₄ at 12.5 mM was used instead of NaNO₃. For the expression assays, pre-cultures were grown for 8 days on RM. Then, 300 µl of a 10⁶ conidia/ml suspension were spread onto the indicated medium. The samples were collected after the required growth period. The alternation of white light and darkness was conducted in a Sanyo MLR-350H environmental chamber with fluorescent tubes OSRAM L 36 W/640.

2.2. Bioinformatics

The gapless genome of the strain B05.10 is available at the EnsemblFungi database (van Kan et al., 2016) (Genbank CP009805.1 to CP009822.1). The isochore-like structure of each chromosome was determined by the GC-profile software (Gao and Zhang, 2006) with parameters for detecting isochores in eukaryotic genomes, i.e. minimum length = 3000 bp, halting parameter = 100, gap size < 1% of the chromosome size.

Transposons were searched in the genome sequence using the previously described REPET package (<http://urgi.versailles.inra.fr/tools/REPET>; Amselem et al., 2015). The TEdenovo pipeline (Flutre et al., 2011) was used to detect repeated elements in the genome and to provide a consensus sequence for each family. In the first step, Blaster was used with the following parameters: identity >90%, HSPs (High Scoring Segments Pairs) length >100b and <20 Kb, e-value ≤ 1e−300. Found HSPs were clustered with three different methods: Piler (Edgar and Myers, 2005), Grouper (Quesneville et al., 2005) and Recon (Bao and Eddy, 2002). For each cluster of sequences, a consensus was generated using multiple alignments of the 3–20 longest members. Consensus sequences were then classified according to their structure and similarities with the Repbase Update (v20.05; Jurka et al., 2005), rRNA_Eukaryota.fsa and Pfam27.0_GypsyDB.hmm. Consensus sequences without any known structure or similarity were classified as “noCat” and those noCat consensus built from less than ten HSPs were eliminated. Consensus sequences classified as simple sequence repeats (SSR e.g. micro/mini-satellites) or containing more than 30% of SSR were also eliminated. The resulting library of consensus sequences was used to annotate TE copies in the whole genome using the TEannot pipeline (Quesneville et al., 2005). In addition, a “long join procedure” (Flutre et al., 2011) was used to address the problem of nested TEs i.e. TEs interrupted by other TEs that were inserted more recently. Alignment between the TE detected in the BOT gene cluster and its corresponding TE consensus (DXX-MITE_P15.8) was used to estimate the transition/transversion rate and the RIP mutations, using RIPCAL (Hane and Oliver, 2008). All possible RIP mutations (CA → TA, CT → TT, CC → TC, CG → TG and their reverse complements) were computed. RIP indices were estimated on the chromosome 12 (BCIN12) from genomic position 2205751 to 2248650. RIP indices were analyzed in sliding windows of 500 nt, with 400 nt shifts, for both CA → TA and CT → TT conversions, and their reverse complement TG → TA and AG → AA respectively, by: $RIP_{CA} = TA/(CA + TG)$ and $RIP_{CT} = (TT + AA)/(CT + AG)$, according to (Hane and Oliver, 2008). The G + C percentage was calculated on the same sliding windows.

The nuclear localization signal (NLS) and nuclear export signal (NES) of the BcBot6 protein were respectively predicted with WOLF pSORT (<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>) and NetNES 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>) using the

Bcin12g06420 protein sequence. The Zn(II)₂Cys₆ domain was predicted using InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

The updated functional data regarding the BOT gene cluster were deposited at the Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster (MIBiG) repository with the reference BGC0000631 (<http://mibig.secondarymetabolites.org/>; Medema et al., 2015).

2.3. Standard molecular methods

All primers used in this study are listed in Table S1. Fungal genomic DNA was prepared using a Sarcosyl-based protocol as in Dalmais et al. (2011). For diagnostic PCR reactions, the Mytaq polymerase (Bioline) was used according to the manufacturer recommendations and the high fidelity Accuzyme polymerase (Bioline) was used for cloning purposes. For Southern blot analysis of the *Bcbot6* related mutants and the screening of the *Bcbot2* gene among *Botrytis* species, genomic DNAs were digested with the restriction enzyme ClaI, and EcoRI, respectively. Then, genomic fragments were separated on 0.8% (wt/vol) agarose gel and transferred to Biodyne B (Positive) TM membrane (MPbio). Blot hybridization was performed using the DIG DNA labelling and detection kit by Roche according to the manufacturer's instructions.

2.4. Construction of mutant strains

All designed constructs are presented in Fig. S1. For inactivation of *Bcbot6* (Bcin12g06420), the 5' (0.960 kb) and 3' (0.364 kb) flanking non coding regions of the gene were amplified using the primers AP112 and AP113 and AP114 and AP115, respectively. Those constructs were then assembled with the hygromycin B resistance (*hph*) cassette (*P_{trpC}::hph*, amplified (1047 bp) with primers *hphF* and *hphR* using pCSN44 as template) and EcoRI/XhoI digested pRS426 by yeast recombinational cloning thanks to overlapping tails on the primers. The pRS426 and pCSN44 plasmids, and the yeast strain FY834 were obtained from the Fungal Genetics Stock Center (<http://www.fgsc.net/gpkit.html>; Colot et al., 2006). Two fragments were amplified from the yielded plasmids using AP112 and Hygro 8-5' primers (amplifying the non-coding 5' region of *Bcbot6* and the first part of the cassette) and AP115 and Hygro 7-3' primers (amplifying the non-coding 3' part of *Bcbot6* and the second part of the cassette), purified and used to transform protoplasts of the *B. cinerea* strain B05.10 (Levis et al., 1997) by the split marker technique (Fairhead et al., 1996; Catlett et al., 2003). The integration of the cassette was checked on hygromycin resistant individuals using AP117 (in the non-coding 3' part of *Bcbot6*, outside of the used homologous region) and hygrofinU (inside of the cassette, in *P_{trpC}*) primers. A single round of monospore isolation was necessary to obtain homokaryotic transformants (verified using AP117 and AP118 (inside of the *Bcbot6* ORF) primers). Two homokaryotic mutants were selected to confirm the integration of a single copy of the resistance cassette at the targeted locus by Southern blot analysis using a *hph*-designed probe (using *hphR* and *hygro 8-5'* primers). The *ΔBcbot6 71.3* was chosen to be complemented with the integration of *Bcbot6* both at the native gene locus (*in loco*) and at the nitrate reductase *Bcniad* locus. The vector p^c*ΔBcbot6*^{CIL} was generated in yeast by cotransformation of four PCR products (AP112/AP172, AP173/AP174, AP Nat1 pNDN F/AP Nat1 pNDN R and AP175/AP176) and EcoRI/XhoI digested pRS426 allowing to construct a DNA fragment containing the non-coding 5' region of *Bcbot6*, the *Bcbot6* ORF, the first part of non-coding 3' region of *Bcbot6*, the nourseothricin resistance cassette of pNDN-OGG (Schumacher, 2012) and the second part of the non-coding 3' part of *Bcbot6*. The correct assembly of the complementation cassette was checked by PCR reactions (*Bcniad* 5' sF1/AP118, AP137/AP136) and by sequencing (using primers AP120, AP158,

AP132 and hygromycinU). The vector $p^c\Delta Bcbot6^{niaD}$ was generated in yeast by co-transformation by two PCR products (AP177/AP173 and AP172/AP178) and *SpeI*/*BglII* digested pNDN-OGG (Schumacher, 2012) resulting in a DNA fragment containing the non-coding 5' region of *Bcniad*, the non-coding 3' region of *Bcbot6*, the non-coding 5' region of *Bcbot6*, the nourseothricin resistance cassette (*PoliC::nat1*) and the non-coding 3' part of *Bcniad*. The correct assembly of the complementation cassette targeting the *Bcniad* locus was verified by PCR reactions (AP118/Nat1 hiF and hygromycinU/pRS426short 3R) and by sequencing (using primers pRS426 short 5F, AP132, AP137, AP158 ad AP120). Both vectors $p^c\Delta Bcbot6^{CL}$ and $p^c\Delta Bcbot6^{niaD}$ were digested by *PvuII* (ThermoFisher Scientific) which cuts on both sides of each complementation cassette. Those digestion products were used to transform protoplasts of *B. cinerea* $\Delta Bcbot6$ 71.3. Nourseothricin-resistant transformants were analyzed by PCR for integration at the targeted loci (AP118/AP25 for the *Bcniad* locus and AP117/AP118 for the *Bcbot6* locus).

To be able to localize the BcBot6 protein, the gene was put under the control of a constitutive promoter (*PoliC*) and fused to the green fluorescent protein (GFP) in C terminal position. In order to construct the vector $p^c\Delta Bcbot6^{GFP}$, the *Bcbot6* ORF was amplified using AP154/AP155 primers (which overlap respectively *PoliC* and *gfp*) of the pNDN-OGG (Schumacher, 2012). The PCR product was co-transformed in yeast with *NcoI*-digested pNDN-OGG. The total insert was amplified by PCR using pRS426short 5F/pRS426short 3R primers and was used to transform protoplasts of $\Delta Bcbot6$ 71.3. The insertion of the construct at the targeted locus was verified by diagnostic PCR using AP25/AP27 primers.

2.5. qRT-PCR analyses

Cultures of the WT strain B05.10, $\Delta Bcbot6$ and complemented strains were used to prepare DNA-free RNA. cDNA were obtained from 1 μ g of total RNA by a retro-transcription step realized with the M-MLV (Invitrogen) reverse transcriptase according to the manufacturer's suggestions except that both oligo(dT) (25 ng/ μ l) and random primers (25 ng/ μ l) were used. The RT-qPCR reactions were performed on 1:10 diluted cDNA using MESA Green qPCR Mastermix Plus for SYBR Assay (Eurogentec) and the CFX96 Touch real-time PCR detection system (Bio-Rad). The oligonucleotide primers used (200 nM each) to quantify the transcription level of the genes are listed in Table S1. "No Reverse Transcription" (NRT) controls were performed once on cDNA samples and "No Template Control" (NTC) were made for each pair of primers in every run. The qRT-PCR program consisted in a preliminary 5 min denaturation step at 95 °C followed by 40 amplification cycles of 15 s of denaturation (95 °C) and 1 min of annealing/extension (60 °C). Analysis of the melting curves (increment of 0.1 °C/min) of the final PCR products indicated the absence of contaminations and primer dimers. The data were analyzed with the CFX manager software. Efficiency reactions of the pairs of primers were tested once on the cDNA sample and were all superior to 90%. Gene expression levels were calculated as the ratio between the gene of interest (GOI) and the *BcactA* reference gene or following the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001).

2.6. Localization study

For detection of nuclei, nucleic acids were stained using the fluorescent dye Hoechst 33342 (Sigma). In brief, 10 μ l of an Hoechst solution was freshly prepared according to (Kangatharalingam and Ferguson, 1984) and was added to germinated conidia prior to microscopic observations. Confocal images were acquired on a TCS SPE inverted confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems) with a 63 \times (NA 1.30) ACS APO objective Leica.

Differential interference microscopy (DIC) was used for bright field images when indicated. GFP fluorescence was captured by excitation at 488 nm and emission in the range 493–559 nm; Hoechst 33342 fluorescence was captured by excitation at 40 nm and emission in the range 422–478 nm. All images were acquired at 0.4 Hz and the power output of the laser adjusted to ensure sufficient fluorophore excitation with no saturation of the emission signal. To avoid fluorescent bleed-through, images were acquired sequentially whereby the acquisition bandpass was set as far from each other as possible. Images were analyzed using the Leica Application Software package (LAS-AF v3.1.3 build 8976) and edited with the FigureJ plugin of the ImageJ software (Mutterer and Zinck, 2013).

2.7. Analysis of metabolite production

For analysis of metabolite production, strains were grown on malt agar medium (MA; 20 g/L D-glucose, 10 g/L malt extract, 20 g/L agar, 1 g/L peptone, pH 6.5–7) at 25 °C. Ten 150 mm diameter-Petri dishes containing 100 ml of MA were inoculated with three 4 mm diameter-mycelial plugs each and incubated for either 5 days or 12 days at 25 °C. Then MA was extracted with ethyl acetate (3 \times 0.5 vol.) using an ultrasonic bath, 30 min. The organic extracts were dried over Na₂SO₄ and concentrated to dryness to yield dark oil extracts.

¹H and ¹³C Nuclear Magnetic Resonance (NMR) measurements on metabolites isolated from culture extracts were obtained on Agilent 400-MR NMR and Agilent 500 MHz NMR spectrometers with SiMe₄ as the internal reference. High-pressure liquid chromatography (HPLC) was performed with a Hitachi/Merck L-6270 apparatus equipped with a UV-vis detector (L 6200) and a differential refractometer detector (RI-71). Thin Layer Chromatography (TLC) was performed on Merck Kiesegel 60 F₂₅₄, 0.2 mm thick. Silica gel (Merck) was used for column chromatography. HPLC purification was accomplished with a silica gel column (Hibar 60, 7 m, 1 cm wide, 25 cm long). Chemicals were products of Fluka or Aldrich. All solvents were freshly distilled.

For metabolites isolation and characterization, the dark oil extracts obtained from fermentation experiments of *B. cinerea* strains were separated by means of column chromatography on silica gel, with a mixture of ethyl acetate/hexane (10, 20, 40, 60, 80 and 100% ethyl acetate), and 20% methanol in ethyl acetate as solvent.

Extensive spectroscopic analysis by ¹H-NMR and ¹³C-NMR were used to detect the presence of the various toxins in each fraction. Candidate fractions were further purified by HPLC with an increasing gradient of ethyl acetate to petroleum ether. The toxin structures were analyzed by spectroscopic methods and direct comparison with authentic samples previously isolated from strains of *B. cinerea* (Collado and Viaud, 2016). Semi-preparative HPLC afforded the quantification of the metabolites.

3. Results

3.1. The botrydial biosynthetic gene cluster is nested between stretches of A + T-rich sequences containing relics of transposable elements

Previously, the BOT gene cluster was described as five co-regulated genes that encode the enzymes required for the synthesis of the toxin i.e. the key sesquiterpene cyclase (BcBot2), three P450 mono-oxygenases (BcBot1, 3 and 4) and a putative acetyl transferase (BcBot5) (Fig. 1A, Table 1) (Siewers et al., 2005; Pinedo et al., 2008; Moraga et al., 2016). In those previous studies, A + T-rich regions upstream from *Bcbot4* and downstream from *Bcbot5* led to cloning and sequencing issues and prevented the

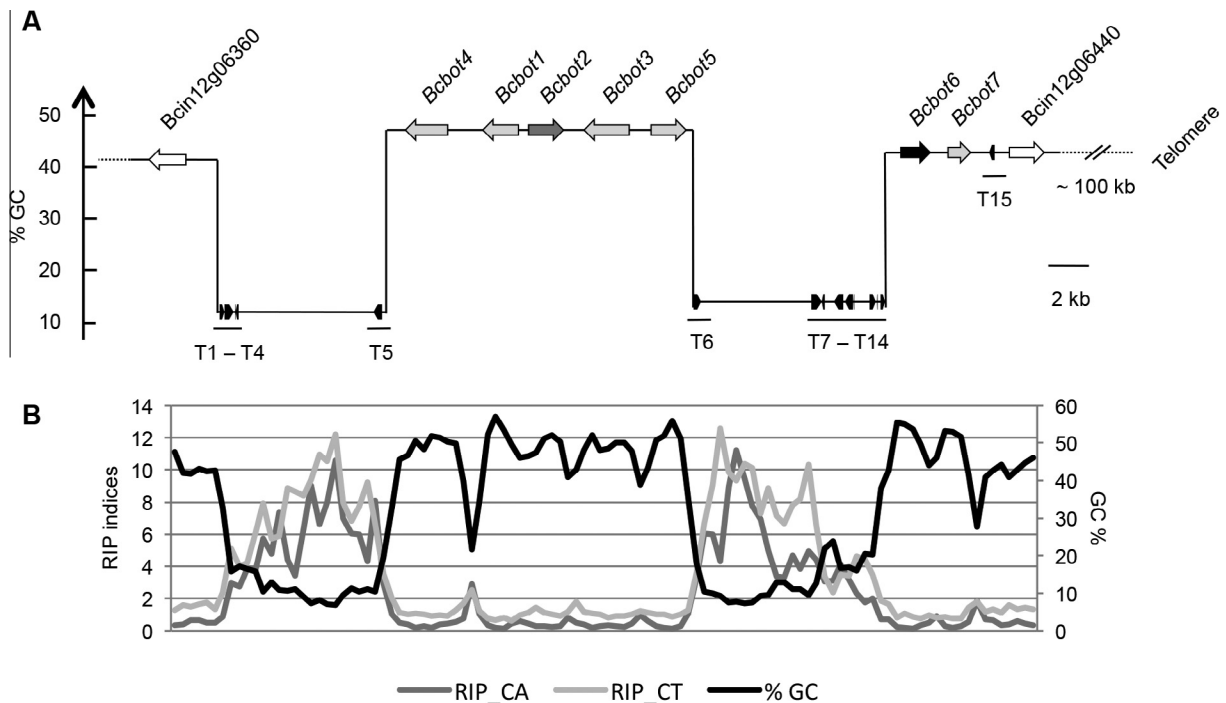


Fig. 1. The botrydial (BOT) gene cluster in the *Botrytis cinerea* strain B05.10 is located in a bipartite genomic region containing A + T-rich sequences mutated by RIP. (A) The BOT gene cluster was assigned to the chromosome 12 of the strain B05.10 (van Kan et al., 2016) which allowed to detect the genes located upstream and downstream from the five previously identified *Bcbot* genes (Pinedo et al., 2008). Transposable elements (TEs) were identified using the REPET package (<http://urgi.versailles.inra.fr/tools/REPET>; Amselem et al., 2015) (see details in Table 1). Variations in G + C content were computed with GC-profile (Gao and Zhang, 2006), allowing the identification of four segmentation points in the BOT cluster. (B) G + C percent and RIP indices were analyzed in 500 nt windows, with 400 nt shifts over the BOT cluster genomic sequence. RIP_CA and RIP_CT represent the ratio of conversion of pre-RIP di-nucleotides to post-RIP dinucleotides CA → TA or CT → TT respectively, and their corresponding reverse complement TG → TA or AG → AA.

Table 1
Genes and copies of transposable elements (TEs) located in the genomic environment of the botrydial gene cluster.

Gene/TE copy	Gene/TE consensus name	Length (bp)	Gene function
	Bcin12g06350	1,912	Putative sugar transporter
	Bcin12g06360	1811	Putative carboxylesterase
T1	noCat_G9	233	
T2	DXX-MITE_P15.8	452	
T3	noCat_G9	43	
T4	DXX-MITE_P15.8	164	
T5	noCat_G9	413	
<i>Bcbot4</i>	Bcin12g06370	2100	Monooxygenase (Moraga et al., 2016)
<i>Bcbot1</i>	Bcin12g06380	1754	Monooxygenase (Siewers et al., 2005)
<i>Bcbot2</i>	Bcin12g06390	1721	Sesquiterpene cyclase (Pinedo et al., 2008)
<i>Bcbot3</i>	Bcin12g06400	2245	Monooxygenase (Moraga et al., 2016)
<i>Bcbot5</i>	Bcin12g06410	1735	Putative acetyl transferase
T6	noCat_G9	365	
T7	noCat_G9	521	
T8	DXX-MITE_P15.8	139	
T9	noCat_G9	436	
T10	noCat_G9	384	
T11	DXX-MITE_G19	36	
T12	DXX-MITE_P15.8	295	
T13	DXX-MITE_P15.8	25	
T14	RLX_P13.1	195	
<i>Bcbot6</i>	Bcin12g06420	1455	Zn(II) ₂ Cys ₆ transcription factor
<i>Bcbot7</i>	Bcin12g06430	1119	Putative dehydrogenase
T15	RLX_P26.1	257	
	Bcin12g06440	1712	Putative DNA methylase

Genes and TE copies are listed in the order they appear on BCIN12 chromosome (see Fig. 1A). The TE consensus names refer to the consensus names listed in Table 2.

identification of neighboring genes. Recently, the genome of the wild type (WT) strain B05.10 was sequenced with the PacBio technology which resulted in a gapless sequence of the sixteen core and two dispensable chromosomes (van Kan et al., 2016). Thanks to this new genome release, the BOT gene cluster was assigned to the core chromosome 12 (BCIN12, 2.3 Mb) at approximately 100 kb from the telomere and the structure of the surrounding genomic region was characterized.

The analysis of G + C content (Fig. 1B) highlights the presence of gene-depleted A + T-rich regions on both sides of the BOT cluster. By contrast, the G + C content of the *Bcbot1*-*Bcbot5* locus and the upstream and downstream gene-containing regions are similar to the overall G + C content of the B05.10 genome (42.75%; Staats and van Kan, 2012). To better visualize and analyze the bipartite structure of this genomic region, we computed the segmentation points on *B. cinerea* chromosomes using the GC-profile webtool (<http://tubic.tju.edu.cn/GC-Profile/> Gao and Zhang, 2006). Nineteen segmentation points were identified on BCIN12. Four of them are located around the BOT gene cluster (Fig. 1A), coinciding with the boundaries of A + T-rich regions and thereby confirming the observation of a difference in G + C composition between gene-containing and gene-depleted genomic regions. Particularly, the area containing *Bcbot1*-*Bcbot5* genes is 47.26% G + C-rich whereas upstream and downstream gene-less regions only contain 11.86 and 13.09% of G + C, respectively. In many fungi including *B. cinerea*, it is well documented that A + T-rich regions may result from a pre-meiotic genome defense mechanism named Repeat-Induced Point mutation (RIP) that silences repeated sequences by mutating C to T consequently increasing the A + T content (Amselem et al., 2015; Hane et al., 2015). We thereby tested the hypothesis that the presence of A + T-rich regions surrounding the BOT gene cluster might originate from transposable elements

(TEs) that would have been silenced by RIP. We used the gapless genomic sequence of B05.10 (van Kan et al., 2016) and undertook the complete annotation of the TEs using the previously described REPET package (Flutre et al., 2011; Amselem et al., 2015). Fifteen consensus sequences representing all the possible TEs among the genome were identified. Each consensus sequence had at least one full-length copy in the genome as well as many incomplete copies. The consensus sequences were classified according to their structure and sequence similarities to characterized eukaryotic transposons (Wicker et al., 2007; Hoede et al., 2014). This classification (Table 2) indicates that the genome of the strain B05.10 contains nine different LTR (Long Terminal Repeats) retrotransposons, four DNA transposons and two unknown repeated elements. Altogether, the TE copies cover 3.72% of the genome. With regards to the BOT gene cluster area, fifteen copies (T1–T15) corresponding to two DNA transposons, two retrotransposons and one unknown repeated element were predicted (Fig. 1A, Table 1). As expected, these copies are located in the A + T-rich regions except T15 that is present within a G + C/A + T equilibrated region (between Bcin12g06430 and Bcin12g06440). The annotated TE copies are short (often less than 400 bp) and are degenerated compared to their consensus. Such TEs may correspond to copies that have undergone RIP-associated C to T mutations as previously described in *B. cinerea* (Amselem et al., 2015). To examine this hypothesis, we used two different strategies. The first one aligns each TE copy to its consensus sequence. Unfortunately, only one TE copy *i.e.* T2 was long enough (>400 nt) and harbored enough identity (>80%) with the corresponding TE consensus sequence (DXX-MITE_P15.8; Tables 1 and 2) to provide a good alignment. This allowed determining the rate of base transitions versus transversions and the number of RIP di-nucleotide mutations using RIPCAL (Hane and Oliver, 2008). The ratio transitions/transversions equaled 5.5, strongly suggesting the occurrence of RIP. Furthermore, all possible RIP induced mutations (CA → TA, CT → TT, CC → TC, CG → TG and their reverse complements) were computed. The results indicated that the RIP mutation at the dinucleotide CA → TA (and reversibly TG → TA) represents 46.4% of all the detected RIP mutations, whereas the CT → TT, CC → TC and CG → TG mutations represent 21.4%, 14.3% and 17.9% respectively. These predominant CA and CT dinucleotide signatures, consistent with previous analysis in *B. cinerea* (Amselem et al., 2015), strongly suggest that this TE copy was submitted to RIP. Alternatively, an overall strategy was performed on the whole BOT genomic region. RIP indices were computed to determine the likely C to T mutation in CA and CT dinucleotides, according to (Hane and Oliver, 2008). The results (Fig. 1B) showed that CA and CT RIP indices massively increased in both A + T-rich regions, suggesting that RIP may have occurred in these regions. On the other hand, RIP indices were low in G + C/A + T equilibrated regions demonstrating no RIP action. An intermediate profile was observed at the T15 locus where G + C content drops to less than 30% and where RIP indices are slightly increased. Interestingly, the same profile was observed in the *Bcbot4* promoter region (Fig. 1).

3.2. BcBot6 regulates the Bcbot genes

Genomic regions upstream and downstream from the known *Bcbot1*–*Bcbot5* cluster were investigated in order to search for a gene encoding a regulator of BOT synthesis as well as possible additional genes that might be involved in the biosynthesis and transport of the toxin (Fig. 1A). Interestingly, the two genes located downstream from the 10 kb A + T-rich stretch adjacent to *Bcbot5* belong to families often found in fungal SM gene clusters: Bcin12g06420 was predicted to encode a Zn(II)₂Cys₆ TF (IPR001138) whereas Bcin12g06430 was predicted to encode a dehydrogenase (IPR002198, IPR016040 and IPR002347) that might

be involved in the conversion of BOT to dihydrobotrydial (Siewers et al., 2005; Collado and Viaud, 2016). These two genes were thereafter named *Bcbot6* and *Bcbot7*, respectively. The gene located downstream from *Bcbot7*, Bcin12g06440, encodes a DNA methylase (IPR002052, IPR029063 and IPR007757) that is likely not part of the studied cluster. Similarly, the gene located upstream from the A + T-rich stretch adjacent to *Bcbot4*, Bcin12g06360, encodes a predicted carboxylesterase (IPR002018, IPR029058 and IPR019819) whose function is probably unrelated to BOT biosynthesis.

To specify the borders of the BOT gene cluster, we further considered available microarrays transcriptomic data sets (Fig. S2). Gene expression during infection of grape berries (Kelloniemi et al., 2015) and in the $\Delta Bcve1$, $\Delta Bclae1$ and $\Delta Bcyoh1$ mutants (Schumacher et al., 2015; Simon et al., 2013) suggests that the *Bcbot1*–*Bcbot7* genes are co-regulated while the surrounding genes have different expression profiles. Finally, orthology analysis (Fig. S2 D) indicated that the *Bcbot1* to *Bcbot7* genes do not have any ortholog in the closely related species *Sclerotinia sclerotiorum* (Amselem et al., 2011) while the adjacent genes Bcin12g06360 and Bcin12g06440 have co-localized orthologs in the genome of *S. sclerotinium* (SSIG_13881 and SSIG_13879). Both expression and synteny data therefore suggest that the BOT gene cluster is restricted to *Bcbot1* to *Bcbot7* genes.

In general, fungal SM gene clusters contain a gene encoding a Zn (II)₂Cys₆ TF that specifically regulates the genes of the cluster (Brakhage, 2012; Knox and Keller, 2015). As the protein encoded by *Bcbot6* displays this DNA-binding domain (IPR001138), we hypothesized that it might be a specific regulator of the BOT gene cluster even though the gene is separated from the *Bcbot5* gene by a 10 kb-long A + T-rich stretch.

To characterize the role of BcBot6, we generated knock out mutants in which the whole ORF of *Bcbot6* was replaced by the hygromycin-resistance *hph* gene (Fig. S1). Two homokaryotic transformants ($\Delta Bcbot6$ 41.1 and 71.3) were selected for this study. To confirm the results obtained with the two mutants, complemented strains were constructed by reintroducing the ORF as well as the 0.729 kb non-coding 5' part and 0.366 kb non-coding 3' part of *Bcbot6* both at the native locus ($\Delta Bcbot6^{CIL}$; CIL: complementation *in loco*) and at the nitrate reductase-encoding gene *BcniaD* locus ($\Delta Bcbot6^{niaD}$) using of the $\Delta Bcbot6$ 71.3 as background strain.

To study the implication of BcBot6 in the regulation of the *Bcbot* genes, qRT-PCR were carried out. The expression of the *Bcbot* genes was monitored in the two independent KO mutants $\Delta Bcbot6$ 41.1 and 71.3 as well as in the WT strain B05.10 (Fig. 2A). Moreover, the expression of the two putative flanking genes (Bcin12g06360 and Bcin12g06440) as well as the putative sugar transporter-encoding gene Bcin12g06350 was also studied. The results showed that all the *Bcbot* genes were significantly under-expressed in both $\Delta Bcbot6$ mutants. The key enzyme encoding-gene *Bcbot2* was about 1000 times less expressed than in the WT strain. The neighbor gene *Bcbot1*, putatively sharing a bidirectional promoter region with *Bcbot2*, exhibited a similar decrease with an expression level 500 times lower than in the WT. *Bcbot3* and *Bcbot5*, also putatively sharing a common promoter region, were around 100 and 200 less expressed than in the WT. Finally, *Bcbot4* and *Bcbot7* were ten times less expressed than in the WT. By contrast, the expression of Bcin12g06350, Bcin12g06360 and Bcin12g06440 exhibited no significant difference between mutants and B05.10. Overall, the expression patterns indicated that the *Bcbot1* to *Bcbot5* genes as well as the newly identified *Bcbot7* gene are dependent on the BcBot6 protein. These data further support our supposition that the BOT gene cluster is indeed composed of *Bcbot1* to *Bcbot7* and that Bcin12g06350, Bcin12g06360 and Bcin12g06440 are not part of the cluster.

Table 2Transposable elements (TEs) identified in the genome of *Botrytis cinerea* strain B05.10.

Repeated element	Consensus name (<i>B. cinerea</i> TE name)	Number of copies	Genome coverage (%)	Copies length (bp)
Class I LTR		554	2.34	21–10,980
	RLX_P17.7	32	0.14	30–6459
	RLX_P21.1 (<i>Boty</i>)	76	0.43	57–6699
	RLX_P26.1 (<i>Boty</i>)	81	0.27	27–6649
	RLX_P6.1 (<i>Boty</i>)	34	0.14	50–6437
	RLX_B-R56	43	0.28	21–7402
	RLX_G54	25	0.14	32–8277
	RLX_G57	164	0.57	24–10,980
	RLX_P13.1 (<i>Boty</i>)	35	0.12	21–6578
	RLX_P27.0	64	0.25	21–6405
Class II TIRE		72	0.15	27–1880
	DTX_G36	31	0.09	31–1880
	DTX_P14.9 (<i>Flipper</i>)	41	0.06	27–1855
Class II MITE		788	0.51	22–849
	DXX-MITE_G19	63	0.04	36–497
	DXX-MITE_P15.8	725	0.47	22–849
Unknown		513	0.72	26–13,266
	noCat_G9	460	0.44	26–639
	noCat_R20	53	0.27	34–13,266
Total		1927	3.72	21–13,266

The new gapless genome sequence (van Kan et al., 2016) was analyzed with the REPET package (<http://urgi.versailles.inra.fr/tools/REPET>). The fifteen consensus sequences were classified according to (Wicker et al., 2007). The sequence of the consensus sequences (BCINB05_10_18Chr_RefTE.fa) as well as their annotation file (BCINB05_10_18Chr_RefTE_annotation.gff3) are available at <https://urgi.versailles.inra.fr/download/fungi/TEs/>.

To confirm that the down-regulation of the BOT gene cluster is due to the inactivation of the *Bcbot6* gene, the expression of *Bcbot6* as well as the key enzyme-encoding gene *Bcbot2* was monitored in the complemented strains $^c\Delta Bcbot6^{CIL}$ and $^c\Delta Bcbot6^{niaD}$ (Fig. S3). The expression of both genes was restored reaching an expression level similar to B05.10 when *Bcbot6* was reintroduced in the mutant background regardless whether the reinsertion occurred at the native (mutated) locus or in the *Bcniad* locus.

To determine if BcBot6 might have a role in the regulation of other SM gene clusters, we performed, as above, expression assays using qRT-PCR on genes belonging to different SM gene clusters that were also shown to be expressed during infection and to be regulated through the Velvet complex (reviewed in Viaud et al., 2016). The first gene tested was *Bchoa6* (Bcin01g00060) that encodes a PKS involved in the production of BOA (Dalmais et al., 2011) and whose expression is positively regulated by both BcVel1 and BcLae1 (Schumacher et al., 2015). The second gene tested encodes a PKS with additional non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) domains (*Bcpks7*; Bcin10g00040) and belongs to a SM gene cluster that is positively regulated by BcVel1 during infection (Schumacher et al., 2012). The results in Fig. 2B were consistent with the previous ones for *Bcbot2* expression. The expression in the WT was about twice as high as the actin encoding gene and dramatically decreased in both $\Delta Bcbot6$ mutants. However, for *Bchoa6* and *Bcpks7*, no significant difference was observed between B05.10 and the mutants, indicating that the *Bchoa6* and *Bcpks7* genes are not regulated by BcBot6. In sum, the results suggest that BcBot6 is the main positive regulator of the BOT gene cluster. As neither *Bchoa6* nor *Bcpks7* expression is affected by the deletion of the *Bcbot6* gene, we hypothesize that this TF is a BOT pathway specific regulator.

3.3. The deletion of *Bcbot6* suppresses the production of botrydial and other botryanes

To support findings from the expression assays presented above, botryanes and botcinins produced by the WT strain B05.10 and the different mutants were investigated (Fig. S4, Tables 3 and S2). As botryanes and botcinins are known to reach their

maximum amount after five and twelve days of fermentation, respectively (Durán-Patrón et al., 2004; Collado et al., unpublished), these two time points were chosen to investigate their production. Toxins were isolated by column chromatography and analyzed by HPLC as well as 1H and ^{13}C NMR.

As expected from previous studies, the WT strain B05.10 produced significant amounts of botryanes (Fig. S4 (1–6), Tables 3 and S2), i.e. 9.1% of the total extract, after 5 days of cultures whereas the $\Delta Bcbot6$ 71.3 did not produce any botryanes even after 12 days of culture. In addition, in the complemented transformants $^c\Delta Bcbot6^{niaD}$, $^c\Delta Bcbot6^{CIL}$ and $^c\Delta Bcbot6^{GFP}$ the production of botryanes was restored demonstrating that BcBot6 is required for the activation of the BOT biosynthesis pathway.

Quantification of botcinins (Fig. S4 (7–8), Tables 3 and S2) also highlighted differences between the studied strains. After 12 days of culture, the $\Delta Bcbot6$ 71.3 accumulated significantly higher quantities of these polyketides compared to the WT strain (5.4% instead of 2.7% of the total extract). In the three complemented strains, $^c\Delta Bcbot6^{niaD}$, $^c\Delta Bcbot6^{CIL}$ and $^c\Delta Bcbot6^{GFP}$, the production of botcinins was similar to those of the WT strain B05.10. This overproduction of botcinins in the absence of botryanes was previously observed with the deletion of the key enzyme-encoding gene *Bcbot2* (Pinedo et al., 2008).

3.4. BcBot6 is a nuclear protein

BcBot6 is a 484 aa protein that in addition to the N-terminal Zn (II)₂Cys₆ domain displays two nuclear localization signal (NLS) and one nuclear export signal (NES) (Fig. 3A). To study the cellular localization of BcBot6 in living hyphae, we transformed the $\Delta Bcbot6$ 71.3 with a cassette containing *Bcbot6* under the control of a constitutive promoter *PoliC* and fused to the codon-optimized GFP (Fig. S1; Leroch et al., 2011). The functionality of the BcBot6-GFP hybrid protein in the resulting strain ($^c\Delta Bcbot6^{GFP}$) was verified by both expression analysis and metabolic studies. The expression of the key enzyme-encoding gene *Bcbot2* (data not shown) as well as the production of botryanes (Tables 3 and S2) were restored in the complemented mutant $^c\Delta Bcbot6^{GFP}$. The confocal microscopy observations presented in Fig. 3B highlight

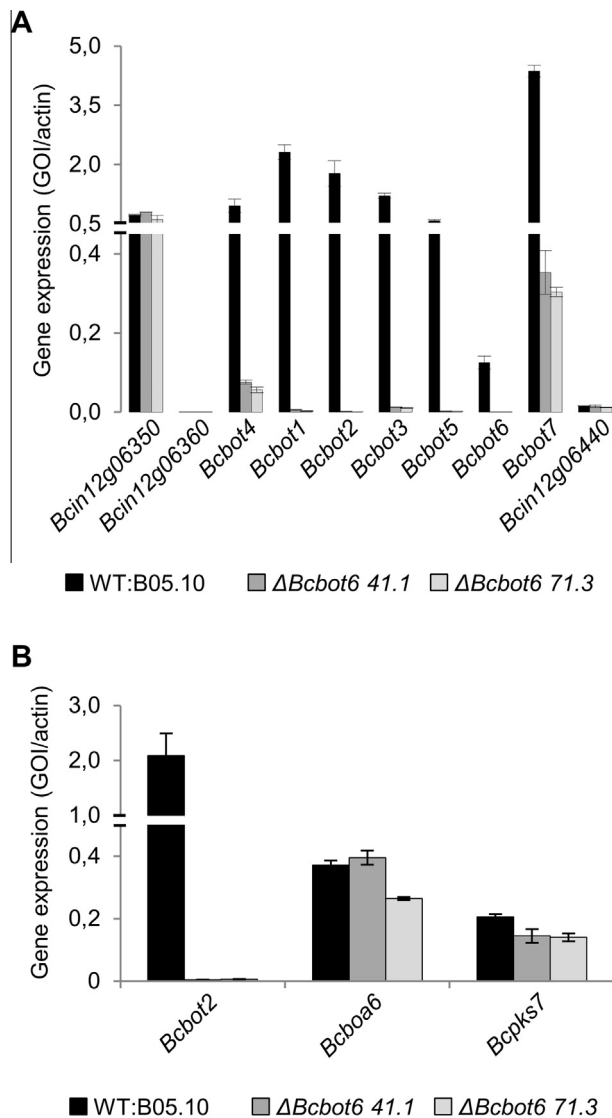


Fig. 2. The putative Zn(II)₂Cys₆ TF BcBot6 positively regulates the botrydial (BOT) gene cluster. (A) The expression of *Bcbot1*–*BcBot7*, *Bcin12g06350*, *Bcin12g06360* and *Bcin12g06440* was monitored by RT-qPCR in the WT strain B05.10 and two independent $\Delta Bcbot6$ mutants. (B) The expression of two SM key enzyme-encoding genes that are not part of the BOT cluster (*Bcboa6* (Bcin01g00060) and *Bcpts7* (Bcin10g00040)) was monitored by RT-qPCR in the WT strain B05.10 and two independent $\Delta Bcbot6$ mutants. For all the results presented here, the strains were grown for 48 h at 23 °C on solid grape juice with a photoperiod of 14 h of darkness and 10 h of white light. Gene expression was calculated as the ratio between the gene of interest (GOI) and the reference gene *BcactA* (Bcin16g02020). Means and standard deviations were collected from two biological replicates and three technical replicates.

the co-localization of BcBot6-GFP with Hoechst stained nuclei suggesting this TF is primarily nuclear localized.

3.5. BcBot6 is dispensable for development, virulence and resistance to abiotic stresses in the B05.10 strain

Previously, studies of $\Delta Bcbot1$ and $\Delta Bcbot2$ demonstrated that the production of BOT is not necessary for either saprophytic growth or conidiation in *B. cinerea*. Moreover, BOT was shown to be a strain specific virulence factor that is dispensable in strains producing BOA i.e. B05.10 or SAS56 (Siewers et al., 2005; Pinedo et al., 2008; Dalmais et al., 2011). Here, the phenotype of the $\Delta Bcbot6$ mutant was first characterized to determine whether the TF may have functions in addition to the synthesis of this toxin. Inoculation of the $\Delta Bcbot6$ mutants on either a rich medium (RM), a synthetic minimal medium (MM) or a grape juice medium indicated that they grow and conidiate as the WT parental strain B05.10 (Fig. S5). In order to test whether illumination conditions could highlight a developmental defect, we grew the mutants on RM either in constant light, or constant darkness or in an alternating light/dark (12 h/12 h) regime. The results indicated that the mutants exhibit a light dependency similar to the WT strain i.e. they conidiate in the presence of light and produce sclerotia in constant darkness (Fig. S5). Finally, pathogenicity tests conducted on French bean leaves using either young mycelium plugs or conidia as inoculum (Fig. 4 and S6) showed that the mutants are as aggressive as the WT strain. In conclusion, these phenotypic data indicate that the absence of the BcBot6 regulator, similarly to the absence of one of the BOT biosynthetic enzymes (e.g. BcBot2; Dalmais et al., 2011), does not alter the development and virulence of the strain B05.10.

The phenotype of the $\Delta Bcbot6$ mutants was further investigated to search for a potential role of BcBot6 in response to several abiotic stresses and two nitrogen sources. The mutants were cultivated on MM supplemented with NaCl or sorbitol to induce an osmotic stress, with hydrogen peroxide (H₂O₂) and menadione to induce a redox stress or with calcofluor white to induce a cell wall stress. In addition, ammonium was used as an alternative nitrogen source to nitrate in the original MM. In all tested conditions, the $\Delta Bcbot6$ mutants exhibited a similar growth rate as the WT strain (Table S3). Altogether, these phenotypic data indicate that the BcBot6 TF is dispensable for development, virulence and tolerance to abiotic stresses in the strain B05.10.

3.6. The expression of the botrydial key enzyme-encoding gene *Bcbot2* is regulated by the nitrogen source

To estimate whether abiotic stresses or nitrogen sources may affect the regulation of the BOT gene cluster, we investigated the expression of the key enzyme-encoding gene *Bcbot2* using the same culture conditions as above. After 96 h of growth, total RNAs

Table 3
Botryanes and botcinins produced by the recipient strain B05.10 and mutants after 5 and 12 days of culture.

Strain	Metabolite production (mg L ⁻¹ (% of total extract))					
	5 days			12 days		
	Total extract	Botryanes	Botcinins	Total extract	Botryanes	Botcinins
WT:B05.10	81 (100)	7.3 (9.1)	0.9 (1.1)	238 (100)	0.6 (0.3)	6.4 (2.7)
$\Delta Bcbot6$ 71.3	149 (100)	0 (0)	2.3 (1.5)	319.8 (100)	0 (0)	17.3 (5.4)
^c $\Delta Bcbot6^{niaD}$	103.5 (100)	12.9 (12.4)	1.1 (1)	261.4 (100)	14.8 (5.7)	5.2 (2)
^c $\Delta Bcbot6^{CIL}$	115.3 (100)	5.8 (5.1)	1.1 (1)	237.2 (100)	4.7 (2)	5.9 (2.5)
^c $\Delta Bcbot6^{GFP}$	111.2 (100)	14.2 (12.8)	1 (0.9)	312.3 (100)	15.2 (4.9)	4.7 (1.5)

The percentage of the indicated metabolite over the total extract of the same strain is indicated in brackets.

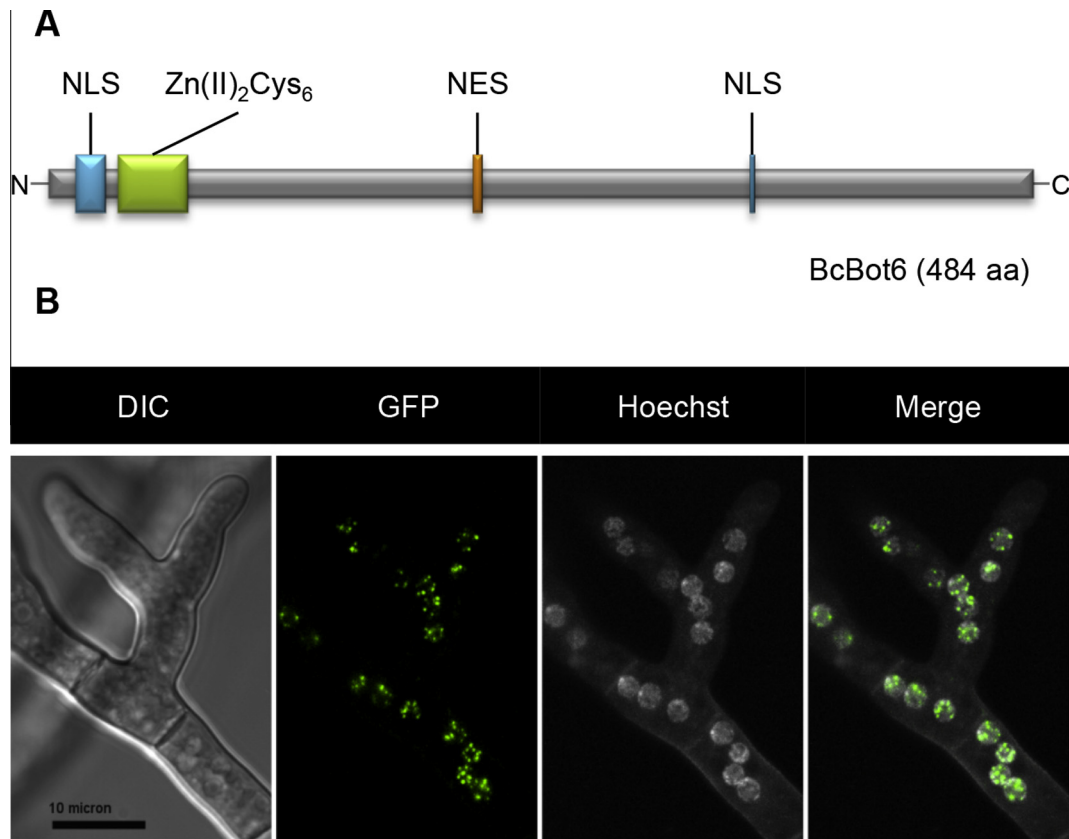


Fig. 3. The putative Zn(II)₂Cys₆ TF BcBot6 is localized into the nucleus. (A) The NLS, NES and Zn(II)₂Cys₆ TF domains were predicted using the whole predicted BcBot6 protein (Bcin12g06420). For more details, see *Experimental procedures*. (B) BcBot6 protein was fused to GFP and localized by fluorescence microscopy. Conidia of the strain Δ Bcbot6^{GFP} were inoculated in NY liquid medium (Malt extract 2%, Yeast extract 0.2%), and deposited on a microscope slide. The observation was conducted after 16 h (10 h of white light and 6 h of darkness) at 23 °C. Nuclei were stained with Hoechst.

were extracted and processed to analyze the expression of *Bcbot2* by qRT-PCR. The synthetic MM was used as control to the representation of the results in Fig. 5. No significant difference for *Bcbot2* expression was detected when cell wall or osmotic stress are applied to the fungus. In contrast, a slight increase (2.5 fold) was observed when B05.10 was grown on medium supplemented with H₂O₂. A decrease (4 fold) was observed on RM and a stronger one (nearly 8 fold) was observed when the nitrogen source in MM was ammonium instead of nitrate. These results suggest that of the tested conditions, the nitrogen source is the only factor that might have an impact, either directly or indirectly, on the expression of *Bcbot2*.

3.7. *B. fabae* and *B. pseudocinerea* species which are closely related to *B. cinerea* lack a functional BOT gene cluster

In order to examine the extent of the BOT cluster in *B. cinerea* populations but also in other *Botrytis* species, we screened a collection of 27 strains for the presence of the key enzyme-encoding gene *Bcbot2*. The results of PCR and Southern hybridizations (Table S4) showed that the *Bcbot2* gene was present in all *B. cinerea* strains tested (*i.e.* twelve) consistent with the observation that all eleven strains tested by Reino et al. (2003) produced botryanes. By contrast, the *Bcbot2* gene was absent in the closely related species *B. fabae* (five strains tested) and *B. pseudocinerea* (five strains tested) that are pathogenic toward fabaceae and polyphagous, respectively. Finally, the gene was detected in the more distant species *B. squamosa* known to produce botryanes (Collado et al., 2000) as well as in *B. aclada* and *B. porri*. These species are all pathogenic towards *Allium* species. In conclusion, our molecular

data point out a patchy distribution of the BOT gene cluster in the *Botrytis* genus. Moreover, they indicate that the closely related polyphagous and sympatric species *B. cinerea* and *B. pseudocinerea* (Walker et al., 2011) differ in their ability to produce BOT.

4. Discussion

In this study, we demonstrated that the *B. cinerea* BcBot6 zinc finger protein, which is located adjacent to five structural genes involved in BOT biosynthesis, is dedicated to the regulation of the BOT gene cluster. The characterization of the BOT gene cluster highlighted its particular genomic environment and depicted its occurrence in the populations of the gray mold agent.

4.1. Botrydial biosynthesis depends on the putative pathway-specific transcription factor BcBot6

One hallmark of fungal SM cluster genes is their co-regulation by pathway-specific TFs (Yu and Keller, 2005). Such proteins, typically harboring a Zn(II)₂Cys₆ TF domain, have been characterized in different fungal species (Knox and Keller, 2015). Nevertheless, the deletion of the genes encoding such regulators not always affects the expression of all the genes in the cluster. For example, the deletion of the *Fusarium fujikoroii* TF-encoding gene *bik5* significantly affected the expression of only three of the five adjacent genes belonging to the bikaverin biosynthetic gene cluster (Wiemann et al., 2009). In the present study, we aimed to investigate the putative regulatory role of BcBot6 on the *Bcbot* genes. The presence of a Zn(II)₂Cys₆ TF domain and the nuclear localization of the protein strongly suggest that BcBot6 is a TF. We showed that

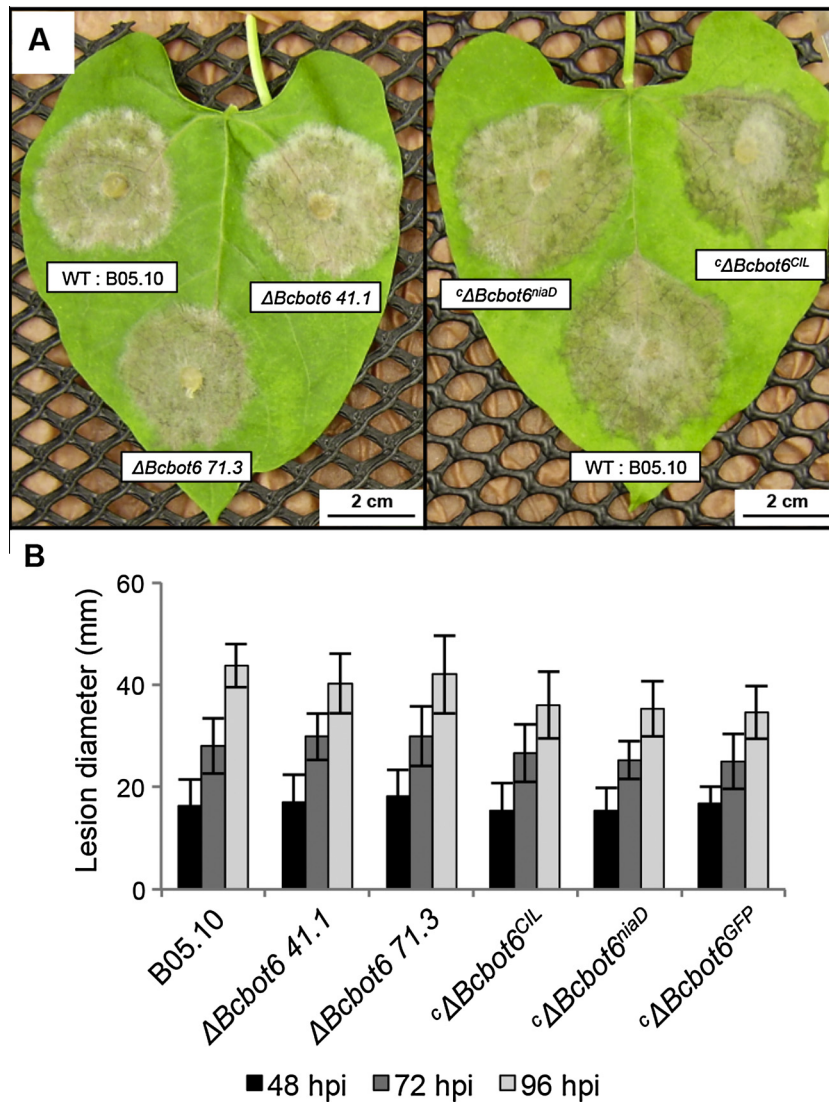


Fig. 4. The deletion of *Bcbot6* gene does not alter the virulence of B05.10. The virulence of the mutant $\Delta Bcbot6$ as well as the complemented strain $c\Delta Bcbot6$ was evaluated on detached leaves of French bean plants (*Phaseolus vulgaris* cv. Caruso grown under glasshouse conditions) inoculated with three days-old mycelial plugs and incubated at 75% relative humidity with a photoperiod of 16 h of white light at 22 °C and 8 h of darkness at 18 °C. (A) Pictures were taken 72 hpi. (B) The virulence of the different strains was monitored from at least ten symptoms observed during two independent assays and was estimated by lesion diameters means and standard deviations. Statistical (*t*-test) analysis did not reveal significant differences between the lesions caused by the transformants and the WT strain B05.10.

the deletion of the gene dramatically impacted the expression of all *Bcbot* genes and led to the inability of the strain to produce BOT, thereby indicating that BcBot6 is a positive regulator of the BOT gene cluster. Moreover, the qRT-PCR results allowed us to determine that the BOT cluster is composed of seven genes (from *Bcbot1* to *Bcbot7*). With the present study, five *Bcbot* genes have now been characterized (Table 1). The two remaining genes whose role in BOT production has still to be confirmed are *Bcbot5* and *Bcbot7*. BcBot5 is thought to be responsible for the introduction of the acetyl group characteristic of BOT (Collado and Viaud, 2016) whereas BcBot7, which is predicted to be a dehydrogenase, might be involved in the conversion of BOT to dihydrobotrydial. As the deletion of *Bcbot6* has no impact on *Bchoa6* and *Bcpks7* expression, development and aggressivity, and does not affect the ability of the fungus to produce other metabolites, it strongly suggests that BcBot6 is a BOT pathway-specific regulator. Nevertheless, we cannot exclude that it could also regulate other genes in the genome. An interesting example is the ability of the AflR TF to regulate not only genes of the aflatoxin gene cluster in *Aspergillus parasiticus* but

also additional genes outside “its” cluster (Price et al., 2006). Thus, to determine the specific regulation of the BOT gene cluster by BcBot6, a global transcriptomic assay would be necessary. A further study would also be required to identify possible DNA-binding motifs. For this purpose, we carried out a yeast one hybrid (Y1H) strategy (Fig. S7) but it failed to confirm a direct interaction between the BcBot6 and the bidirectional promoter of *Bcbot1* and 2, probably due to technical issues such as sensitivity problems. It is also possible that, in this heterologous system, the BcBot6 TF lacks some post-translational modifications or some additional partners to bind its target DNA motif. In conclusion, even if we cannot exclude that the regulation is indirect, the most probable hypothesis is that BcBot6 is a TF acting directly on the promoter of its targeted genes.

It is well known that fungal SMs production is also governed by higher hierarchically acting signal transduction pathways. Notably, the BOT gene cluster has previously been reported to be under the control of both the calcineurin and the stress-induced MAP kinase cascade (Viaud et al., 2016). To gain insight into the whole

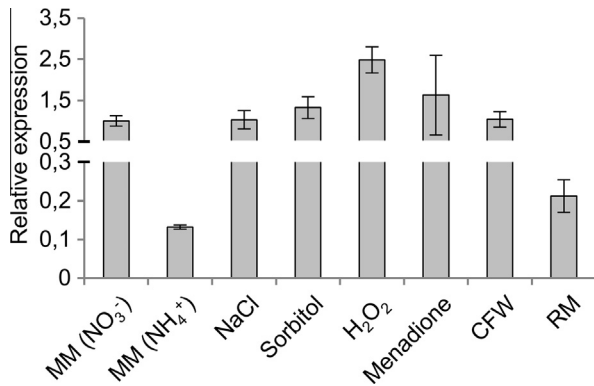


Fig. 5. The expression of the botrydial key enzyme-encoding gene *Bcbot2* is affected by the nitrogen source. The expression of *Bcbot2* was monitored by RT-qPCR in the WT strain B05.10 grown 96 h at 23 °C with a photoperiod of 14 h of darkness and 10 h of white light. The solid minimal medium (MM) that contains 25 mM NaNO₃ was used as a control condition and was supplemented with either NaCl (0.7 M), sorbitol (0.7 M), H₂O₂ (5 mM), menadione (300 μM) or calcofluor white (50 mg/L). Moreover, a MM in which nitrate was replaced by ammonium (12.5 mM (NH₄)₂SO₄) was also used, as well as the RM medium. All plates were covered with a cellophane overlay before fungus inoculation. The relative expressions were obtained with the 2^{-ΔΔCt} method (Livak and Schmittgen, 2001) using the constitutively expressed actin-encoding gene *BcactA* (Bcin16g02020) as a reference. The data were obtained from at least two biological replicates and from at least two technical replicates. Error bars are represented by SEM.

activation process, there is a general need to connect the specific activation of the cluster with those previously characterized pathways. In particular, the repression of the *Bcbot2* gene expression by ammonium suggests that the nitrogen source may have an important role as already described for other fungal SMs (Tudzynski, 2014). For example, the production of aflatoxin is repressed by nitrate but induced by ammonium in *A. parasiticus* and *A. flavus* (Feng and Leonard, 1998; Ehrlich et al., 2002; Tudzynski, 2014). In addition, it has been shown that the major actor of this mechanism *i.e.* the GATA TF AreA is involved in the regulation of several SM clusters in different fungal species (Tudzynski, 2014). Moreover, the direct interaction of AreA and the intergenic region of the regulatory genes *AflR* and *AflJ* was proven in *A. parasiticus* (Chang et al., 2000). The ortholog of AreA in *B. cinerea* remains to be characterized to determine its implication in the nitrogen-dependent regulation of the BOT gene cluster. One interesting clue is the presence of several AreA binding motifs (HGATAR; Ravagnani et al., 1997) into the promoter region of *Bcbot6* (data not shown). Other environmental stimuli likely influence the *Bcbot* genes expression. Nevertheless, our results did not reveal a significant impact of the osmotic or cell wall stresses on *Bcbot2* expression. Only the H₂O₂ treatment suggests a moderate positive effect of oxidative stress on the BOT gene cluster. This result is in agreement with the previous characterization of the stress-activated MAP kinase *BcSak1*: both BOT and BOA phytotoxins are produced in much lower quantities in axenic cultures of the $\Delta Bcsak1$ mutant compared to the WT (Heller et al., 2012). It is likely that the *BcSak1* pathway regulates the expression of the *Bcbot* genes in response to oxidative stress even though there is no evidence that the known downstream TF *i.e.* *BcAtf1* directly acts on the BOT gene cluster (Temme et al., 2012).

4.2. The BOT gene cluster is in a genomic locus with a bipartite structure

As raised above, the PacBio sequencing technology allowed a better definition of the BOT gene cluster genomic region (van Kan et al., 2016). It is now clear that the cluster is located on chromosome 12 (BCIN12) at approximately 100 kb from the telomeric

end. Two A + T-rich regions (above 80% of A + T) are present upstream from the BOT gene cluster and between *Bcbot5* and *Bcbot6* genes. This particular genomic environment has already been described for the solanapyrone gene cluster in *Ascochyta rabiei* (Kim et al., 2015). In their study, the authors pointed out the presence of *Tcl/Mariner*-type TEs and further demonstrated that those sequences probably underwent the action of RIP resulting in A + T-rich regions. For the BOT gene cluster, we hypothesized that the surrounding A + T-rich regions might result from a similar mechanism. On the first hand, we undertook the annotation of the TEs on the whole *B. cinerea* gapless genome. We found that TEs represent 3.72% of the genome, what is consistent with the data published on the first versions of the genomes of B05.10 and T4 strains (Amselem et al., 2011). Moreover, the same families of retrotransposons (such as *Boty*) and DNA transposons (such as *Flipper*) were, once more, identified. Regarding the BOT gene cluster, fifteen degenerated TEs were identified and they were all but one in the A + T-rich regions devoid of genes. Furthermore, we calculated the two main RIP indices bias in *B. cinerea* (mutation from C to T in CA and CT dinucleotide; Amselem et al., 2015). Both RIP indices increase in those regions, suggesting that the TE-containing A + T-rich regions may have undergone RIP action. RIP may have also acted on some precise parts of the G + C/A + T-equilibrated regions as RIP indices were increasing concomitantly with an increase in A + T content notably in the promoter regions of the *Bcbot4* gene. Even if most of the TEs detected in fungal genomes are inactive, they probably had a great impact on gene function and genome structure during genome evolution (Kazazian, 2004; Ayarpadikannan and Kim, 2014). As repeated sequences, they might allow genomic rearrangements by homologous recombination. Moreover, RIP is acting on targeted repeated regions but might sometimes act on flanking sequences (Ohm et al., 2012). In this case, those latter would evolve rapidly and there are accumulating evidences showing that this mechanism gives rise to new pathogenicity-related effector genes alleles. Finally, it has been shown that DIM-5 is able to generate repressive heterochromatin from RIPed A + T-rich sequences in *N. crassa* (Lewis et al., 2009). These three different reasons strongly suggest that TEs have likely played a major role in the BOT gene cluster history.

Interestingly, the SM gene cluster responsible for the second important phytotoxin of *B. cinerea*, BOA, also displays a similar bipartite structure as the BOT genomic region: TEs-containing A + T-rich regions are present both within and downstream from the *Bcboa* genes. In addition, this cluster is located in a subtelomeric region (about 4 kb from one telomere of chromosome BCIN01) (van Kan et al., 2016). Intriguingly, we were able to visualize this kind of bipartite structure for only a restricted number of SM clusters in *B. cinerea* (eight out of 40; data not shown). This raises the question whether this particular organization has an impact on chromatin structure and if it might be related to a chromatin-based regulation mechanism.

4.3. The role of botrydial and other botryanes remains enigmatic

Botrydial has a powerful phytotoxic activity observable on bean leaves at concentration as low as 1 ppm but in infected plants, this concentration could reach approximately 50 ppm (Deighton et al., 2001; Colmenares et al., 2002). The cellular target of BOT remains unknown but the recent work of Rossi et al. (2011) on *Arabidopsis thaliana* suggests that BOT induces the hypersensitive response through the salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways, thereby acting as an effector of plant cell death. This biological activity fits with the available transcriptomic data: the BOT gene cluster is up-regulated during infection of different hosts including *A. thaliana* and *Vitis vinifera* (Gioti et al., 2006; Kelloniemi et al., 2015). In this study, we confirmed that the oxidative stress which

is known to occur during infection is a signal that leads to the activation of the BOT gene cluster. Additionally, we showed that ammonium strongly represses this SM gene cluster. One hypothesis to explain this repression is that this nitrogen source may act as a signal perceived by *B. cinerea* leading to a saprophytic development in which the phytotoxin production is not required.

Despite the phytotoxic activity of BOT, we demonstrated that this sesquiterpene is not necessary for the virulence of the strain B05.10. Indeed, the dramatic decrease of *Bcbot* genes expression in the $\Delta Bcbot6$ and the subsequent absence of BOT production did not alter the development of symptoms on bean leaves. This result is in agreement with previous studies. To summarize, the deletion of either *Bcbot1*, 2, 3, 4 or 6 gene in the B05.10 strain and the subsequent suppression of BOT production do not affect the virulence whereas in the T4 strain, the $\Delta Bcbot1$ and $\Delta Bcbot2$ mutants led to smaller lesions than the WT strain (Siewers et al., 2005; Pinedo et al., 2008). The current hypothesis to explain this difference is that in the strain B05.10, the absence of BOT is supplied by the presence of BOA, whereas the T4 strain never produces this second phytotoxin. The functional redundancy of BOT and BOA toxins in B05.10 genetic background was confirmed by the inability for the $\Delta Bcbot2 \Delta Bcboa6$ double mutants to fully colonize plant tissues (Dalmais et al., 2011). As for the previously characterized $\Delta Bcbot2$ (Pinedo et al., 2008), we observed that the absence of BOT production led to a greater production of botcinins: after 12 days of axenic cultures, the $\Delta Bcbot6$ accumulates twice as much botcinins as does the WT strain. The lack of botryanes production coupled with the enhancement of botcinins production in the $\Delta Bcbot6$ mutant remains currently unexplained. This might contribute to the absence of virulence defect in the $\Delta Bcbot6$ mutant, and might also account for the other results of phenotypic tests designed to test the response to different stresses.

Additional clues regarding the role of SM could arise from the study of their distribution among the fungal populations and species. All *B. cinerea* strains tested to date, i.e. more than fourteen, produce BOT (Reino et al., 2004; Siewers et al., 2005), suggesting that this compound has an important role in the fitness of this polyphagous species. Our molecular screening confirmed that *Bcbot2*, the BOT key enzyme-encoding gene is present in all *B. cinerea* strains tested, and further revealed that the closest species of *B. cinerea*, i.e. *B. fabae* and *B. pseudocinerea* are unable to produce BOT and other botryanes. *B. cinerea* and *B. pseudocinerea* constitute a complex of two cryptic species living in sympatry on several hosts, including grapevine and blackberry. They cannot be discriminated by morphologic criteria or by their aggressiveness on leaves. Nevertheless, a population survey over time showed that *B. cinerea* was the predominant species on mature grape berries whereas *B. pseudocinerea* was more abundant in spring, on floral debris (Walker et al., 2011). Differences in the repertoires of phytotoxic secondary metabolites might contribute to the adaptation to these different ecological niches.

Even though *Botrytis* species closely related to *B. cinerea* do not possess the key enzyme of the BOT biosynthesis pathway, botryanes compounds have been isolated from more distant species i.e. *B. squamosa* and *B. allii* which are both pathogenic towards *Allium* species (Collado et al., 2000). In our study, the detection of the *Bcbot2* gene in *B. aclada* and *B. porri* suggested that these two additional pathogens of *Allium* may also produce BOT and/or other botryanes even if that remains to be confirmed by chemical analyses. Strikingly, botryanes are also produced *in vitro* by the non-pathogenic species *Hymenoscyphus epiphyllus* that belongs to the Leotiomyces class as *Botrytis* (Thines et al., 1997). Additionally, a SM gene cluster containing the orthologs of *Bcbot1* to *Bcbot6* was recently found in the genomes of two *Colletotrichum* species (Sordariomyces), *C. tofieldiae* and *C. incanum* which are

endophytic and pathogenic of *A. thaliana*, respectively (Hacquard et al., 2016; Hiruma et al., 2016). Remarkably, the orthologs of three genes (*Bcaba1* to *Bcaba3*) known to be involved in abscisic acid (ABA) production in *B. cinerea* are embedded in the orthologs of *Bcbot* genes in those two *Colletotrichum* species (Hacquard et al., 2016). All together, these data suggest that botryanes may be produced by phylogenetically distant fungi and that the BOT gene cluster was subjected to several genomic rearrangements. This cluster might originate from a common ancestor of Leotiomyces and Sordariomyces and might have been lost from the majority of species or, alternatively, the cluster may have been subjected to horizontal gene transfer between different species as demonstrated for several fungal SM gene clusters (Wisecaver and Rokas, 2015).

From a functional point of view, it now seems clear that compounds with botryane skeletons are not specifically produced by *B. cinerea* even if it remains possible that BOT itself is only produced by the gray mold agent. The ability of non-phytopathogenic fungi to produce botryanes suggests that some of these compounds may have other biological activities than phytotoxicity. Indeed, except BOT, characterized botryanes exhibit only a weak phytotoxic activity (Collado et al., 1996, 1999; Durán-Patrón et al., 1999; Colmenares et al., 2002). Nevertheless, several botryanes from *Botrytis* spp and *H. epiphyllus* exhibit antibacterial and antifungal activities (Thines et al., 1997; Durán-Patrón et al., 1999). BOT has been reported to have antimicrobial activity on *Bacillus subtilis* and *Pythium debaryanum* (Fehlhaber et al., 1974; Durán-Patrón et al., 1999). In addition, BOT seems to be toxic for *B. cinerea* itself as the application of exogenous metabolite (50–250 ppm) inhibits the growth of the fungus (Durán-Patrón et al., 2004). Finally, a recent study by Malmierca et al. (2016) proposes that BOT may be involved in the communication with other microorganisms. Indeed, confrontation assays with *Trichoderma arundinaceum* suggest that BOT has a role in limiting the production of the sesquiterpene harzianum A. It thus appears that botryanes including BOT are metabolites with activities against a broad range of organisms, suggesting that they may have a wider ecological role than phytotoxicity.

To conclude, we provide here a significant expansion of the BOT gene cluster. The functional characterization of *Bcbot6* confirmed our hypothesis regarding its regulation role of the *Bcbot* genes in a likely specific manner. Nonetheless, much remains to be discovered regarding this cluster, especially the regulation by broad domain TFs in response to environmental stimuli and by putative chromatin-based mechanisms remain to be explored. Deciphering the complex regulation of this metabolite synthesis would help to define its role in the interactions with plants and other organisms.

Acknowledgments

The authors would like to thank Samy Hamadache for the pathotests and evaluation of the growth under different stress conditions. We also warmly thank Julia Schumacher (University of Muenster, Germany) for sharing the pNDN-OGG vector and Ralph Dean (North Carolina State University) for critical reading of the manuscript. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. The authors declare no conflict of interest.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2016.10.003>.

References

- Amselem, J., Cuomo, C.A., van Kan, J.A.L., Viaud, M., Benito, E.P., Couloux, A., et al., 2011. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genet* 7, e1002230.
- Amselem, J., Lebrun, M.-H., Quesneville, H., 2015. Whole genome comparative analysis of transposable elements provides new insight into mechanisms of their inactivation in fungal genomes. *BMC Genomics* 16, 141.
- Ayarpadikannan, S., Kim, H.-S., 2014. The impact of transposable elements in genome evolution and genetic instability and their implications in various diseases. *Genomics Inform.* 12, 98.
- Bao, Z., Eddy, S.R., 2002. Automated *de novo* identification of repeat sequence families in sequenced genomes. *Genome Res.* 12, 1269–1276.
- Bayram, O., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J.W., Helmstaedt, K., Valerius, O., et al., 2008. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 320, 1504–1506.
- Brakhage, A.A., 2012. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 21–32.
- Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W., Keller, N.P., 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 447–459.
- Catlett, N.L., Lee, B.-N., Yoder, O.C., Turgeon, B.G., 2003. Split-marker recombination for efficient targeted deletion of fungal genes. *Fungal Genet News* 50, 9–11.
- Chang, P.-K., Yu, J., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., 2000. Characterization of the *Aspergillus parasiticus* major nitrogen regulatory gene, *areA*. *Biochim. Biophys. Acta BBA – Gene Struct. Expr.* 1491, 263–266.
- Collado, I.G., Aleu, J., Hernández-Galán, R., Durán-Patrón, R., 2000. Botrytis species an intriguing source of metabolites with a wide range of biological activities. Structure, chemistry and bioactivity of metabolites isolated from Botrytis species. *Curr. Org. Chem.* 4, 1261–1286.
- Collado, I.G., Durán-Patrón, R., Hernández-Galán, R., 1999. Some evidence on the role of exudated toxins in the pathogenesis of *Botrytis cinerea*. *Rec. Adv. Allelopathy* 1, 479–484.
- Collado, I.G., Hernández-Galán, R., Prieto, V., Hanson, J.R., Rebordinos, L.G., 1996. Biologically active sesquiterpenoid metabolites from the fungus *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 41, 513–517.
- Collado, I.G., Sánchez, A.J.M., Hanson, J.R., 2007. Fungal terpene metabolites: biosynthetic relationships and the control of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Nat. Prod. Rep.* 24, 674–686.
- Collado, I.G., Viaud, M., 2016. Secondary metabolism in botrytis cinerea: combining genomic and metabolomic approaches. In: Fillingner, S., Elad, Y. (Eds.), *Botrytis – The Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems*. Springer International Publishing, pp. 291–313.
- Colmenares, A.J., Aleu, J., Durán-Patrón, R., Collado, I.G., Hernández-Galán, R., 2002. The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*. *J. Chem. Ecol.* 28, 997–1005.
- Colot, H.V., Park, G., Turner, G.E., Ringelberg, C., Crew, C.M., Litvinkova, L., et al., 2006. A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 10352–10357.
- Cutler, H.G., Jacyno, M.J., Harwood, S.J., Dulik, D., Goodrich, D.P., Roberts, G.R., 1993. Botcinolide: a biologically active natural product from *Botrytis cinerea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57, 1980–1982.
- Cutler, H.G., Parker, S.R., Ross, S.A., Crumley, F.G., Schreiner, P.R., 1996. Homobotcinolide: a biologically active natural homolog of botcinolide from *Botrytis cinerea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60, 656–658.
- Dalmais, B., Schumacher, J., Moraga, J., Le Pêcheur, P., Tudzynski, B., Collado, I.G., Viaud, M., 2011. The *Botrytis cinerea* phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial: Botcinic acid biosynthesis gene clusters. *Mol. Plant Pathol.* 12, 564–579.
- Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., et al., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology: Top 10 fungal pathogens. *Mol. Plant Pathol.* 13, 414–430.
- Deighton, N., Muckenschnabel, I., Colmenares, A.J., Collado, I.G., Williamson, B., 2001. Botrydial is produced in plant tissues infected by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 57, 689–692.
- Durán-Patrón, R., Cantoral, J.M., Hernández-Galán, R., Hanson, J.R., Collado, I.G., 2004. The biodegradation of the phytotoxic metabolite botrydial by its parent organism, *Botrytis cinerea*. *J. Chem. Res.* 2004, 441–443.
- Durán-Patrón, R., Hernández-Galán, R., Rebordinos, L.G., Cantoral, J.M., Collado, I.G., 1999. Structure-activity relationships of new phytotoxic metabolites with the botryane skeleton from *Botrytis cinerea*. *Tetrahedron* 55, 2389–2400.
- Edgar, R.C., Myers, E.W., 2005. PILER: identification and classification of genomic repeats. *Bioinformatics* 21, i152–i158.
- Ehrlich, K.C., Montalbano, B.G., Cary, J.W., Cotty, P.J., 2002. Promoter elements in the aflatoxin pathway polyketide synthase gene. *Biochim. Biophys. Acta BBA – Gene Struct. Expr.* 1576, 171–175.
- Eisenman, H.C., Casadevall, A., 2012. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 931–940.
- Elad, Y., Pertot, I., Cotes Prado, A.M., Stewart, A., 2016. Plant hosts of botrytis spp. In: Fillingner, S., Elad, Y. (Eds.), *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems*. Springer International Publishing, Cham, pp. 413–486.
- Fairhead, C., Llorente, B., Denis, F., Soler, M., Dujon, B., 1996. New vectors for combinatorial deletions in yeast chromosomes and for gap-repair cloning using “split-marker” recombination. *Yeast* 12, 1439–1457.
- Fehlhaber, H.-W., Geipel, R., Mercker, H.-J., Tschesche, R., Welmar, K., Schönbeck, F., 1974. Botrydial, ein Sesquiterpen-Antibiotikum aus der Nährlösung des Pilzes *Botrytis cinerea*. *Chem. Ber.* 107, 1720–1730.
- Feng, G.H., Leonard, T.J., 1998. Culture conditions control expression of the genes for aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A. nidulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2275–2277.
- Flutre, T., Duprat, E., Feuillet, C., Quesneville, H., 2011. Considering transposable element diversification in *de novo* annotation approaches. *PLoS ONE* 6, e16526.
- Gao, F., Zhang, C.-T., 2006. GC-Profile: a web-based tool for visualizing and analyzing the variation of GC content in genomic sequences. *Nucleic Acids Res.* 34, W686–W691.
- Gioti, A., Simon, A., Le Pêcheur, P., Giraud, C., Pradier, J.M., Viaud, M., Levis, C., 2006. Expression profiling of *Botrytis cinerea* genes identifies three patterns of up-regulation in planta and an FKBP12 protein affecting pathogenicity. *J. Mol. Biol.* 358, 372–386.
- Hacquard, S., Kracher, B., Hiruma, K., Münch, P.C., Garrido-Oter, R., Thon, M.R., et al., 2016. Survival trade-offs in plant roots during colonization by closely related beneficial and pathogenic fungi. *Nat. Commun.* 7, 11362.
- Hane, J.K., Oliver, R.P., 2008. RIPCAL: a tool for alignment-based analysis of repeat-induced point mutations in fungal genomic sequences. *BMC Bioinformatics* 9, 478.
- Hane, J.K., Williams, A.H., Taranto, A.P., Solomon, P.S., Oliver, R.P., 2015. Repeat-induced point mutation: a fungal-specific, endogenous mutagenesis process. In: Berg, M.A. van den, Maruthachalam, K. (Eds.), *Genetic Transformation Systems in Fungi*, Fungal Biology, vol. 2. Springer International Publishing, pp. 55–68.
- Heller, J., Ruhnke, N., Espino, J.J., Massaroli, M., Collado, I.G., Tudzynski, P., 2012. The mitogen-activated protein kinase BcSak1 of *Botrytis cinerea* is required for pathogenic development and has broad regulatory functions beyond stress response. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 25, 802–816.
- Hiruma, K., Gerlach, N., Sacristán, S., Nakano, R.T., Hacquard, S., Kracher, B., et al., 2016. Root endophyte collettotrichum tofieldiae confers plant fitness benefits that are phosphate status dependent. *Cell*.
- Hoede, C., Arnoux, S., Moisset, M., Chaumier, T., Inizan, O., Jamilloux, V., Quesneville, H., 2014. PASTE: an automatic transposable element classification tool. *PLoS ONE* 9, e91929.
- Hoffmeister, D., Keller, N.P., 2007. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Nat. Prod. Rep.* 24, 393.
- Jurka, J., Kapitonov, V.V., Pavlicek, A., Klonowski, P., Kohany, O., Walichiewicz, J., 2005. Repbase update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenet. Genome Res.* 110, 462–467.
- van Kan, J.A.L., Stassen, J.H.M., Mosbach, A., Van Der Lee, T.A.J., Faino, L., Farmer, A. D., et al., 2016. A gapless genome sequence of the fungus *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* <http://dx.doi.org/10.1111/mpp.12384>.
- Kangatharalingam, N., Ferguson, M.W., 1984. A simple and rapid technique for fluorescence staining of fungal nuclei. *Curr. Microbiol.* 10, 99–103.
- Kazazian, H.H., 2004. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303, 1626–1632.
- Keller, N.P., Hohn, T.M., 1997. Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* 21, 17–29.
- Kelloniemi, J., Trouvelot, S., Héloir, M.-C., Simon, A., Dalmais, B., Frettinger, P., et al., 2015. Analysis of the molecular dialogue between gray mold (*Botrytis cinerea*) and grapevine (*Vitis vinifera*) reveals a clear shift in defense mechanisms during berry ripening. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 28, 1167–1180.
- Kim, H., Woloshuk, C.P., 2008. Role of AREA, a regulator of nitrogen metabolism, during colonization of maize kernels and fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet. Biol.* 45, 947–953.
- Kim, W., Park, J.-J., Gang, D.R., Peever, T.L., Chen, W., 2015. A novel type pathway-specific regulator and dynamic genome environments of a solanapyrone biosynthesis gene cluster in the Fungus *Ascochyta rabiei*. *Eukaryot. Cell* 14, 1102–1113.
- Knox, B.P., Keller, N.P., 2015. Key players in the regulation of fungal secondary metabolism. In: Zeilinger, S., Martín, J.-F., García-Estrada, C. (Eds.), *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites*, vol. 2. Springer, New York, New York, NY, pp. 13–28.
- Leroch, M., Mernke, D., Koppenhoefer, D., Schneider, P., Mosbach, A., Doehlemann, G., Hahn, M., 2011. Living colors in the gray mold pathogen *Botrytis cinerea*: codon-optimized genes encoding green fluorescent protein and mcherry, which exhibit bright fluorescence. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2887–2897.
- Levis, C., Fortini, D., Brygoo, Y., 1997. Transformation of *Botrytis cinerea* with the nitrate reductase gene (*niaD*) shows a high frequency of homologous recombination. *Curr. Genet.* 32, 157–162.
- Lewis, Z.A., Honda, S., Khalfallah, T.K., Jeffress, J.K., Freitag, M., Mohn, F., et al., 2009. Relics of repeat-induced point mutation direct heterochromatin formation in *Neurospora crassa*. *Genome Res.* 19, 427–437.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_t} Method. *Methods* 25, 402–408.
- Malmierca, M.G., Izquierdo-Bueno, I., McCormick, S.P., Cardoza, R.E., Alexander, N.J., Moraga, J., et al., 2016. Botrydial and botcinins produced by *Botrytis cinerea* regulate expression of *Trichoderma arundinaceum* genes involved in trichothecene biosynthesis: fungal metabolites cross-regulation. *Mol. Plant Pathol.* <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.13410>.

- Manzoni, M., Rollini, M., 2002. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 555–564.
- Medema, M.H., Kottmann, R., Yilmaz, P., Cummings, M., Biggins, J.B., Blin, K., et al., 2015. Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster. *Nat. Chem. Biol.* 11, 625–631.
- Michielse, C.B., Becker, M., Heller, J., Moraga, J., Collado, I.G., Tudzynski, P., 2011. The *Botrytis cinerea* Reg1 Protein, a putative transcriptional regulator, is required for pathogenicity, conidiogenesis, and the production of secondary metabolites. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 24, 1074–1085.
- Moraga, J., Dalmás, B., Izquierdo-Bueno, I., Aleu, J., Hanson, J.R., Hernández-Galán, R., et al., 2016. Genetic and molecular basis of botrydial biosynthesis. Connecting cytochrome P450-encoding genes to biosynthetic intermediates. *ACS Chem. Biol.*
- Mutterer, J., Zinck, E., 2013. Quick-and-clean article figures with FigureJ. *J. Microsc.* 252, 89–91.
- Ohm, R.A., Feau, N., Henrissat, B., Schoch, C.L., Horwitz, B.A., Barry, K.W., et al., 2012. Diverse lifestyles and strategies of plant pathogenesis encoded in the genomes of eighteen dothideomycetes fungi. *PLOS Pathog* 8, e1003037.
- Palmer, J.M., Keller, N.P., 2010. Secondary metabolism in fungi: does chromosomal location matter? *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 431–436.
- Pinedo, C., Wang, C.-M., Pradier, J.-M., Dalmás, B., Choquer, M., Le Pêcheur, P., et al., 2008. Sesquiterpene synthase from the botrydial biosynthetic gene cluster of the phytopathogen *Botrytis cinerea*. *ACS Chem. Biol.* 3, 791–801.
- Price, M.S., Yu, J., Nierman, W.C., Kim, H.S., Pritchard, B., Jacobus, C.A., et al., 2006. The aflatoxin pathway regulator AflR induces gene transcription inside and outside of the aflatoxin biosynthetic cluster. *FEMS Microbiol. Lett.* 255, 275–279.
- Quesneville, H., Bergman, C.M., Andrieu, O., Autard, D., Nouaud, D., Ashburner, M., Anxolabehere, D., 2005. Combined evidence annotation of transposable elements in genome sequences. *PLOS Comput. Biol.* 1, e22.
- Quide, T., Osbourn, A., Tudzynski, P., 1998. Detoxification of α -tomatine by *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 52, 151–165.
- Ravagnani, A., Gorfinkiel, L., Langdon, T., Diallinas, G., Adjadj, E., Demais, S., et al., 1997. Subtle hydrophobic interactions between the seventh residue of the zinc finger loop and the first base of an HGATAR sequence determine promoter-specific recognition by the *Aspergillus nidulans* GATA factor AreA. *EMBO J.* 16, 3974–3986.
- Rebordino, L., Cantoral, J.M., Prieto, M.V., Hanson, J.R., Collado, I.G., 1996. The phytoxic activity of some metabolites of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 42, 383–387.
- Reino, J.L., Durán-Patrón, R., Segura, I., Hernández-Galán, R., Riese, H.H., Collado, I.G., 2003. Chemical transformations on botryane skeleton. Effect on the cytotoxic activity. *J. Nat. Prod.* 66, 344–349.
- Reino, J.L., Hernández-Galán, R., Durán-Patrón, R., Collado, I.G., 2004. Virulence-toxin production relationship in isolates of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *J. Phytopathol.* 152, 563–566.
- Reyes-Dominguez, Y., Bok, J.W., Berger, H., Shwab, E.K., Basheer, A., Gallmetzer, A., et al., 2010. Heterochromatic marks are associated with the repression of secondary metabolism clusters in *Aspergillus nidulans*: heterochromatin regulation of secondary metabolism. *Mol. Microbiol.* 76, 1376–1386.
- Rohlf, M., Churchill, A.C.L., 2011. Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. *Fungal Genet. Biol.* 48, 23–34.
- Rossi, F.R., Gárriz, A., Marina, M., Romero, F.M., Gonzalez, M.E., Collado, I.G., Pieckenstein, F.L., 2011. The sesquiterpene botrydial produced by *Botrytis cinerea* induces the hypersensitive response on plant tissues and its action is modulated by salicylic acid and jasmonic acid signaling. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 24, 888–896.
- Schumacher, J., 2008a. Calcineurin-responsive zinc finger transcription factor CRZ1 of *Botrytis cinerea* is required for growth, development, and full virulence on bean plants. *Eukaryot. Cell* 7, 584–601.
- Schumacher, J., 2016. DHN melanin biosynthesis in the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea* is based on two developmentally regulated key enzyme (PKS)-encoding genes: DHN melanogenesis in *Botrytis cinerea*. *Mol. Microbiol.* 99, 729–748.
- Schumacher, J., 2008b. The G α subunit BCG1, the phospholipase C (BcPLC1) and the calcineurin phosphatase co-ordinately regulate gene expression in the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *Mol. Microbiol.* 67, 1027–1050.
- Schumacher, J., 2012. Tools for *Botrytis cinerea*: new expression vectors make the gray mold fungus more accessible to cell biology approaches. *Fungal Genet. Biol.* 49, 483–497.
- Schumacher, J., Pradier, J.-M., Simon, A., Traeger, S., Moraga, J., Collado, I.G., et al., 2012. Natural variation in the VELVET Gene *bcvel1* affects virulence and light-dependent differentiation in *Botrytis cinerea*. *PLoS ONE* 7, e47840.
- Schumacher, J., Simon, A., Cohrs, K.C., Traeger, S., Porquier, A., Dalmás, B., et al., 2015. The VELVET complex in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*: impact of BcLAE1 on differentiation, secondary metabolism and virulence. *Mol. Plant. Microbe Interact.*
- Siewers, V., Viaud, M., Jimenez-Teja, D., Collado, I.G., Gronover, C.S., Pradier, J.-M., et al., 2005. Functional analysis of the cytochrome P450 monooxygenase gene *bcbot1* of *Botrytis cinerea* indicates that botrydial is a strain-specific virulence factor. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 18, 602–612.
- Simon, A., Dalmás, B., Morgant, G., Viaud, M., 2013. Screening of a *Botrytis cinerea* one-hybrid library reveals a Cys₂His₂ transcription factor involved in the regulation of secondary metabolism gene clusters. *Fungal Genet. Biol.* 52, 9–19.
- Smith, D.J., Burnham, M.K., Bull, J.H., Hodgson, J.E., Ward, J.M., Browne, P., et al., 1990. Beta-lactam antibiotic biosynthetic genes have been conserved in clusters in prokaryotes and eukaryotes. *EMBO J.* 9, 741–747.
- Staats, M., van Kan, J.A.L., 2012. Genome update of botrytis cinerea strains B05.10 and T4. *Eukaryot. Cell* 11, 1413–1414.
- Tamaru, H., Selker, E.U., 2001. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 414, 277–283.
- Temme, N., Oeser, B., Massaroli, M., Heller, J., Simon, A., González Collado, I., et al., 2012. BcAtf1, a global regulator, controls various differentiation processes and phytotoxin production in *Botrytis cinerea*: BcAtf1-a global regulator in *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* 13, 704–718.
- Thines, E., Anke, H., Steglich, W., Sterner, O., 1997. New botrydial sesquiterpenoids from *Hymenoscyphus epiphyllus*. *Z. Für Naturforschung C* 52, 413–420.
- Tudzynski, B., 2014. Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. *Front. Microbiol.* 5, 656.
- Tudzynski, B., Homann, V., Feng, B., Marzluf, G.A., 1999. Isolation, characterization and disruption of the *areA* nitrogen regulatory gene of *Gibberella fujikuroi*. *Mol. Gen. Genet.* 261, 106–114.
- Viaud, M., Brunet-Simon, A., Brygoo, Y., Pradier, J.-M., Levis, C., 2003. Cyclophilin A and calcineurin functions investigated by gene inactivation, cyclosporin A inhibition and cDNA arrays approaches in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*: Botrytis calcineurin and cyclophilin-dependent genes. *Mol. Microbiol.* 50, 1451–1465.
- Viaud, M., Schumacher, J., Porquier, A., Simon, A., 2016. Regulation of secondary metabolism in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Host-Pathog. Interact. Microb. Metab. Pathog. Antiinfectives*, 201–216.
- Walker, A.-S., Gautier, A., Confais, J., Martinho, D., Viaud, M., Le Pêcheur, P., et al., 2011. *Botrytis pseudocinerea*, a new cryptic species causing gray mold in French vineyards in sympatry with *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 101, 1433–1445.
- Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J.L., Capy, P., Chalhoub, B., et al., 2007. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat. Rev. Genet.* 8, 973–982.
- Wiemann, P., Willmann, A., Straeten, M., Kleigrewe, K., Beyer, M., Humpf, H.-U., Tudzynski, B., 2009. Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation. *Mol. Microbiol.* 72, 931–946.
- Wisecaver, J.H., Rokas, A., 2015. Fungal metabolic gene clusters-caravans traveling across genomes and environments. *Front. Microbiol.* 6, 161.
- Yang, Q., Chen, Y., Ma, Z., 2013. Involvement of BcVeA and BcVelB in regulating conidiation, pigmentation and virulence in *Botrytis cinerea*. *Fungal Genet. Biol.* 50, 63–71.
- Yin, W., Keller, N.P., 2011. Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism. *J. Microbiol.* 49, 329–339.
- Yu, J.-H., Keller, N., 2005. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 437–458.

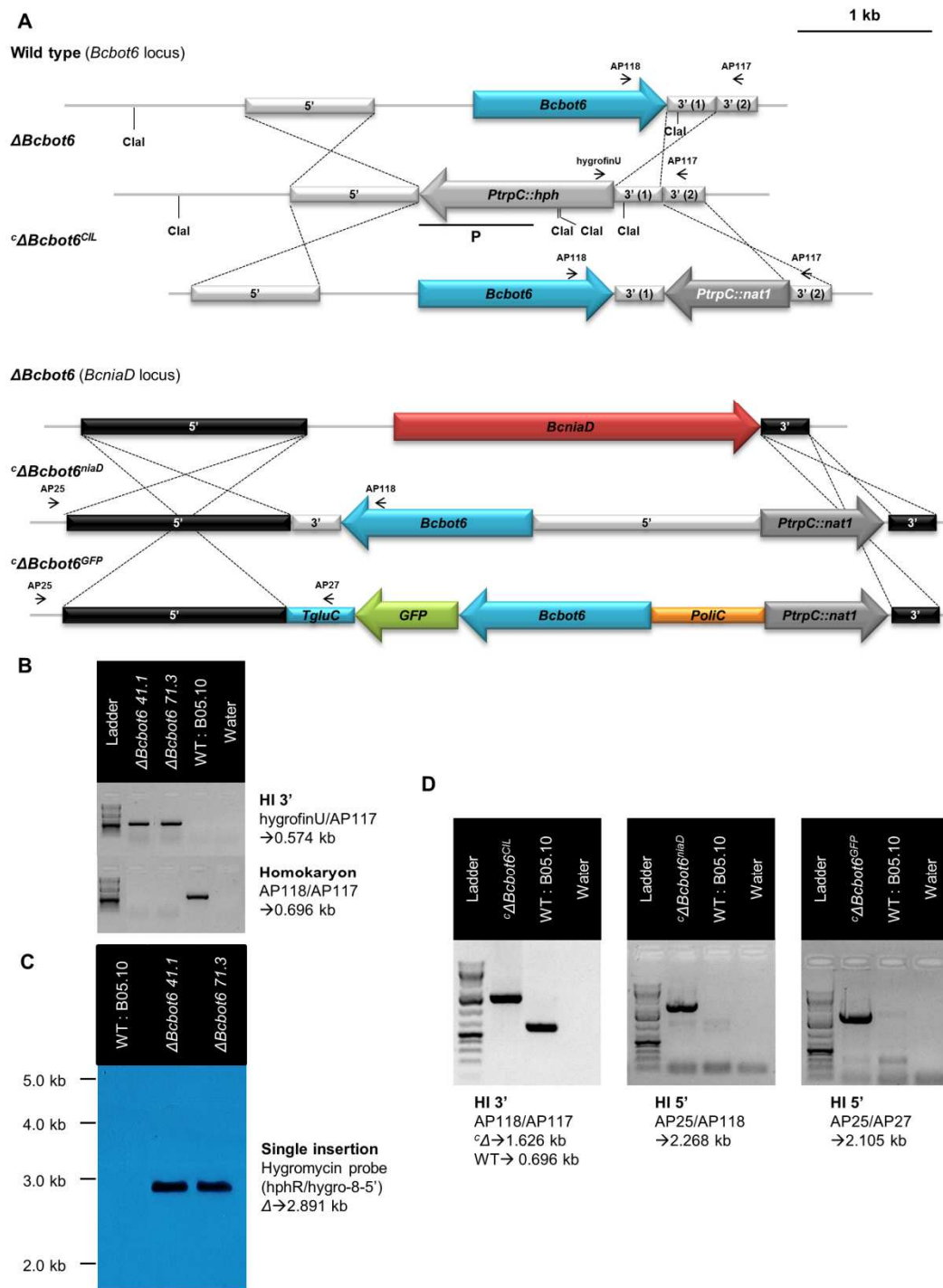


Fig. S1. Construction of $\Delta Bcbot6$ mutants and $^c\Delta Bcbot6$ complemented mutants.

A. For the generation of KO mutants, the *Bcbot6* ORF was replaced by a hygromycin resistance cassette. The gene was reintroduced in this mutant background for generating complemented mutants (i) replacing the hygromycin resistance cassette by the *Bcbot6* ORF and a nourseothrycin resistance cassette or (ii) re-introducing the *Bcbot6* ORF and the nourseothrycin resistance cassette in the nitrate reductase-encoding gene *Bcniad*. Moreover, a complemented mutant was generated by re-introducing the *Bcbot6* ORF under the control of the constitutive *PoliC* promoter and fused to *GFP* ORF. **B.** Diagnostic PCR for homokaryotic $\Delta Bcbot6$ mutants were carried out with the indicated primers. **C.** Southern blot for $\Delta Bcbot6$ mutants confirmed the single integration of the hygromycin resistance cassette. The used probe (P) is indicated in **A**. **D.** Diagnostic PCR were carried out to verify the correct integration of their respective cassette for complemented $^c\Delta Bcbot6$ mutants. (HI : Homologous Integration; P: probe).

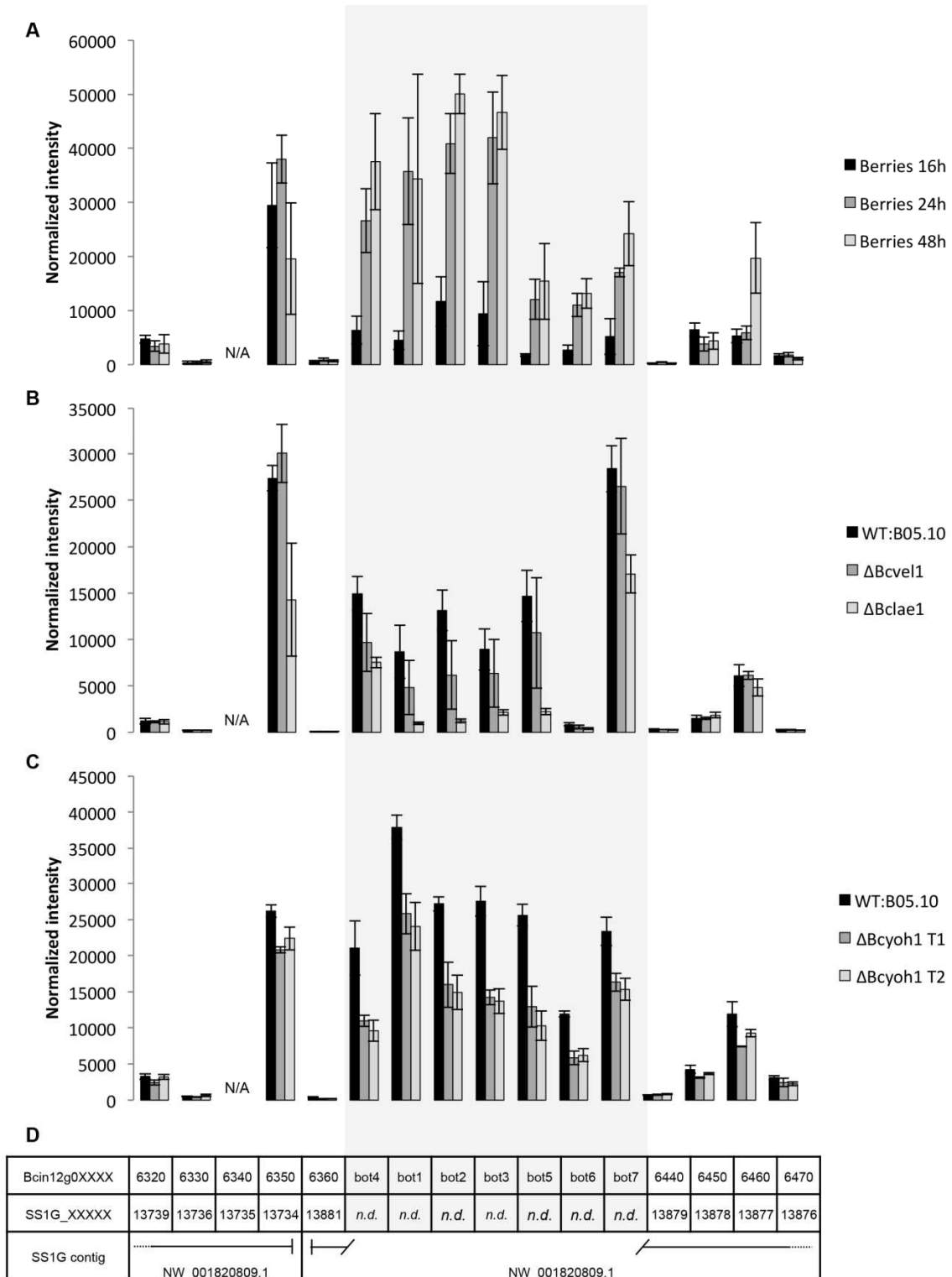


Fig. S2. *Bcbot1* to *Bcbot7* are co-regulated in *B. cinerea* and are absent in *S. sclerotiorum*.

Expression of the genes in the BOT cluster region according to previous microarrays analysis.

A. Expression after inoculation of grape berries (Kelloniemi et al 2015). **B.** Expression in the $\Delta Bcvel1$ and $\Delta Bclae1$ mutants (Schumacher et al. 2015). **C.** Expression in the $\Delta Bcyoh1$ mutant (Simon et al. 2013). **D.** The homologues of the *B. cinerea* genes were identified in *S. sclerotiorum* by bi-directional best hit using BLAST P (the contigs containing the genes are represented). *n.d.*: not detected.

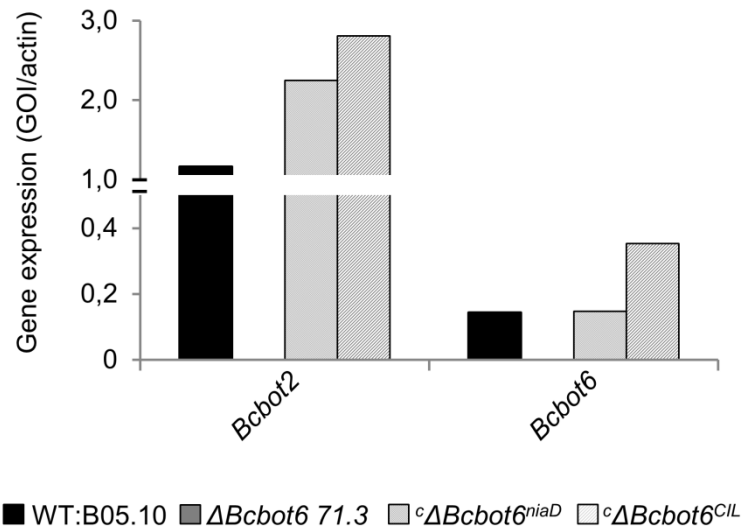


Fig. S3. The complemented strains recovered a full *Bcbot2* expression

The expression of *Bcbot6* and *Bcbot2* genes was monitored by RT-qPCR in the WT B05.10, the $\Delta Bcbot6$ 71.3 and the $^c\Delta Bcbot6^{CIL}$ and $^c\Delta Bcbot6^{niaD}$ complemented strains.

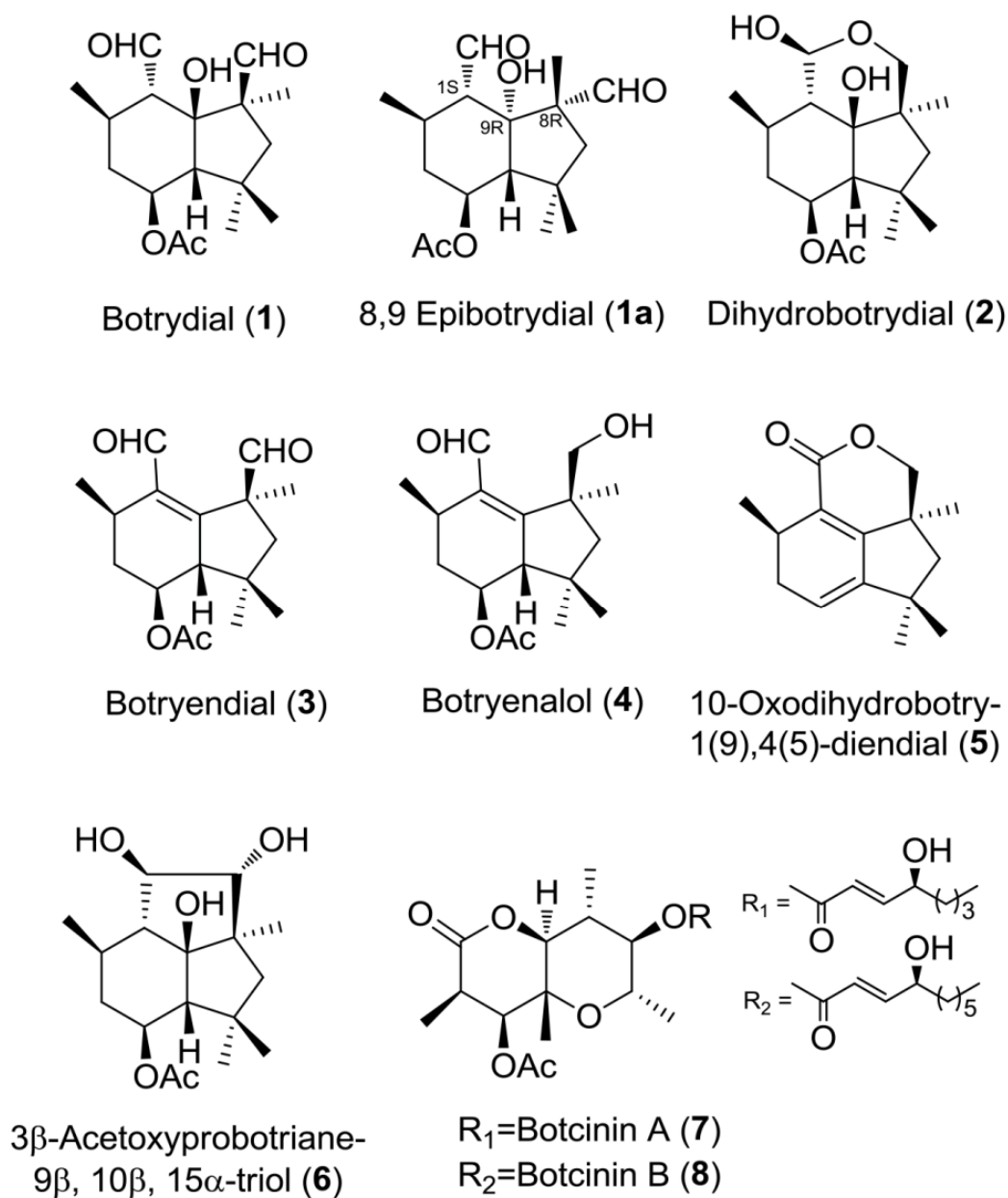


Fig. S4. Metabolites isolated from the cultures of the WT strain B05.10 and mutants. Chemical structures of identified botryanes (metabolites 1 to 6) and botcinins (metabolites 7 and 8) are represented. The quantities of each compound are indicated in Tables 3 and S2.

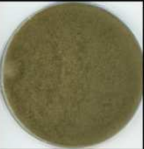
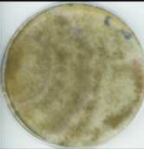


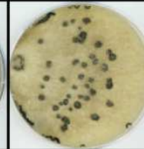
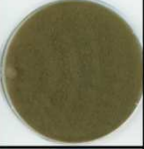

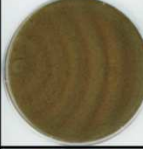
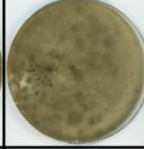
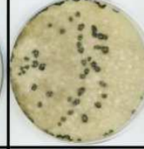
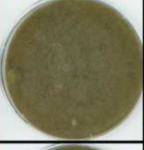




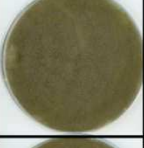
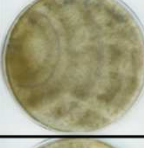
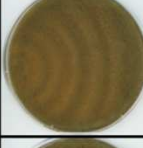
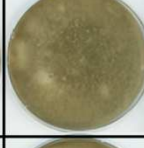

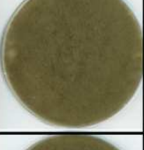
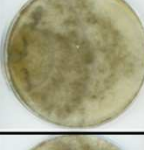
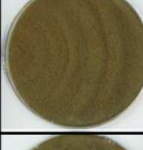
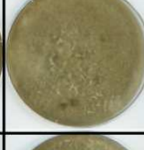


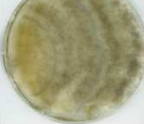



	RM	MM	Grapejuice	RM	RM
	LD	LD	LD	LL	DD
B05.10					
<i>ΔBcbot6 41.1</i>					
<i>ΔBcbot6 71.3</i>					
<i>Δbot6^{niaD}</i>					
<i>Δbot6^{CIL}</i>					
<i>Δbot6^{GFP}</i>					

Fig. S5. Phenotype of the recipient strain B05.10 and mutants grown on different media and under different illumination conditions.

The WT B05.10, the *ΔBcbot6* and the different complemented *ΔBcbot6* mutants were grown at 21°C on RM, MM or grapejuice media with either an alternation of twelve hours of darkness and twelve hours of white light or in constant white light or darkness. The pictures were taken fourteen days after inoculation.

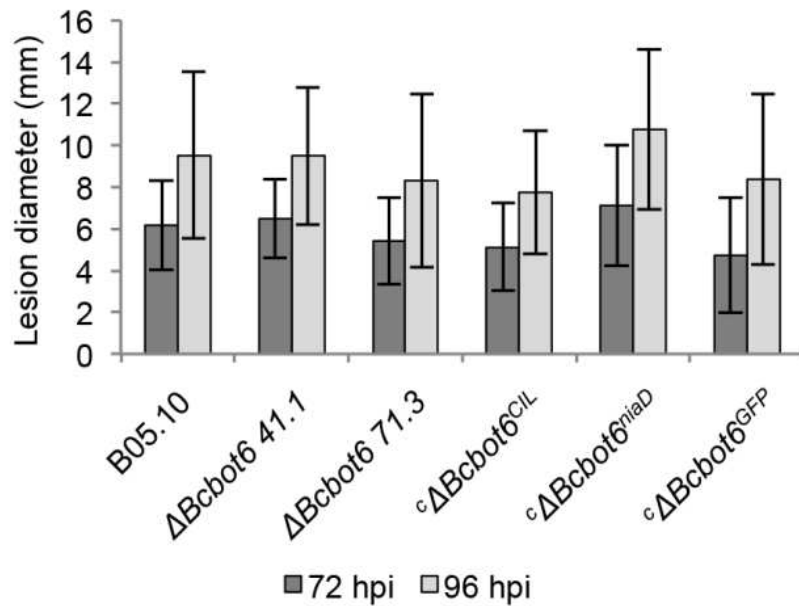


Fig. S6. Pathogenicity assays of the recipient strain B05.10 and mutants on bean leaves using conidia as inoculum.

The aggressivity of the $\Delta Bcbot6$ as well as the complemented $^c\Delta Bcbot6$ strains was evaluated on French bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Caruso; grown under glasshouse conditions) leaves inoculated with conidia. Conidia were collected from sporulated cultures and suspended in sucrose phosphate buffer (10 mM sucrose, 10 mM KH_2PO_4) to a final concentration of 10^5 conidia/mL. Droplets of 10 μ l were used to inoculate detached plant leaves. Inoculated leaves were placed into transparent plastic boxes lined with tissue moistened with sterile water. The boxes were incubated in an environmental chamber at 75 % relative humidity with an alternation of 16 h of white light at 22°C and 8 h of darkness at 18°C. The represented means and standard deviation were obtained for at least six symptoms by strains observed in two independent assays. Statistical (t-test) analysis did not reveal significant differences between the lesions caused by the transformants and the WT B05.10 strain.

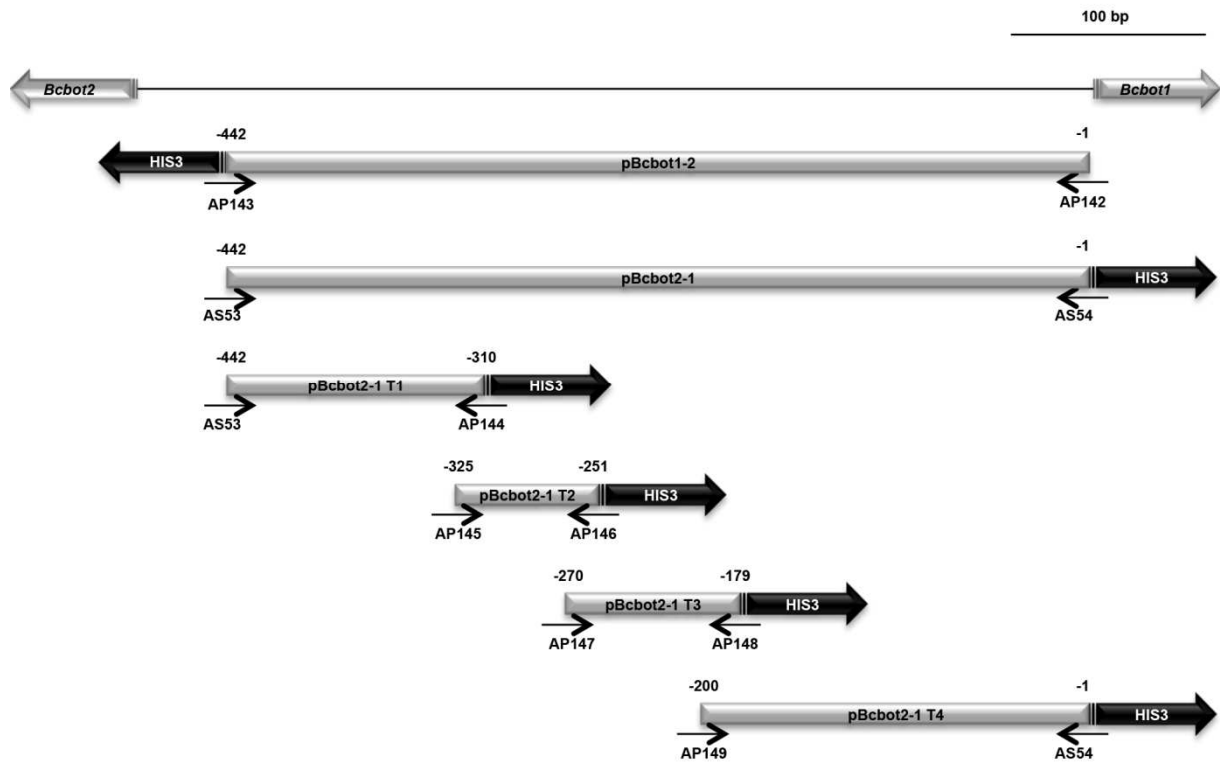


Fig. S7. Yeast-One-Hybrid (Y1H) failed to highlight a physical interaction between Bot6 and the promoters of the BOT gene cluster.

The Y1H interaction assays were performed as in Simon *et al.* (2013). The promoter region shared by *Bcbot1* and *Bcbot2* was amplified by PCR and cloned in both directions (*pBcbot2-1* and *pBcbot1-2*) upstream from the reporter gene *HIS3* in the vector pINT-HIS3NB. Truncated versions of *pBcbot2-1* (T1 to T4) were similarly cloned. Plasmid constructions were checked by sequencing and used to transform the *Saccharomyces cerevisiae* strain Y187 (Clontech). Regarding the TF, either the whole ORF or the Zn(II)₂Cys₆ domain-containing region of *BcBot6* was cloned into the plasmid pACTIIst in frame with the yeast GAL4 activation domain. All primers used for the constructs are available in Table S1. The interaction between BcBot6 and promoters was assayed by transformation of the Y187 cells containing the different promoter constructs with the TF-containing pACTIIst. Co-transformants were selected but subcultures on selective media, i.e. without histidine, did not reveal any activation of the *HIS3* gene.

Table S1. List of PCR primers used in this study.

Name	Sequence (5' -> 3')	Features or Location	Use
AP112	gtaacccagggttttcccagtcacgacg-TCCTAACATTATAATATCAAAAAG	pRS426 5F-Bcbot6 5'	Cloning_amplification of Bcbot6 5' flank / creation of a complementation cassette
AP113	atccactaacgttactgaaatctccaac-CTCTCAAAGTGACATAGACTAAA	hph end-Bcbot6 5'	Cloning_amplification of Bcbot6 5' flank
AP114	gtcggagacagaagatgatattgaaggag-CATCCTGTTCCGGCGTTTTG	PtpC-Bcbot6 3'	Cloning_amplification of Bcbot6 3' flank
AP115	gCGgataacaatttcacacaggaacagc-CCCGATGGCAGAGTGGTAAG	pRS426 3R-Bcbot6 3'	Cloning_amplification of Bcbot6 3' flank
AP116	GGGAGCGATTACCTGATTGA	Bcbot6 5'	Diagnostic PCR_5' homologous integration
AP117	CTCAACTCGATACTTACTGTC	Bcbot6 3'	Diagnostic PCR_3' homologous integration and detection of Bcbot6 gene
AP118	TGTGGAGAATGAGGCAGAT	Bcbot6 ORF	Diagnostic PCR_detection of Bcbot6 gene
hphF	GTCGGAGACAGAAGATGATATTGAAGGAGC	PtpC	Amplification of PtpC::hph
hphR	GTTGGAGATTTAGTAACGTTAAGTGGAT	Hph	Amplification of PtpC::hph
BD5	CAGGTATCCCTTTGCATGAGTAGT	Bcbot2	qPCR_amplification of Bcbot2
BD17	TTACTACTGGTGAATGATGTTTTGTCTT	Bcbot2	qPCR_amplification of Bcbot2
BD1	GGGAACCGAGGTCAATGTCA	Bcbot4	qPCR_amplification of Bcbot4
BD13	GCTTGAATCCCAGGGATCTG	Bcbot4	qPCR_amplification of Bcbot4
BD28	CACGAACTGGACAAAGGCTAAA	Bcbot5	qPCR_amplification of Bcbot5
BD29	ACCACCCGCAATCAAAGC	Bcbot5	qPCR_amplification of Bcbot5
BD12	CTAAGGGCTCGCGGAGTTG	Bcbot3	qPCR_amplification of Bcbot3
BD24	GCATTGCGCTGGCAAGA	Bcbot3	qPCR_amplification of Bcbot3
BD8	GGCTCCCGTGCTTGCA	Bcbot1	qPCR_amplification of Bcbot1
BD20	GCGAGGTGAAGAAGTTAGAGAAGGT	Bcbot1	qPCR_amplification of Bcbot1
Bc-Act1_Fwd	CCGTGCTCCAGAAGCTTTGT	Bcact1	qPCR_amplification of Bcact1
Bc-Act1_Rev	GTGGATACCACCGCTCTCAAG	Bcact1	qPCR_amplification of Bcact1
AP156	CTTAACAACATACCGCTACCAATA	Bcin12g06360	qPCR_amplification of Bcin12g06360
AP157	AGAGGGAGTTCGGAGCTGTGATAA	Bcin12g06360	qPCR_amplification of Bcin12g06360
AP158	AAGGCGGCCAGAAAAGC	Bcbot6	qPCR_amplification of Bcbot6 / Sequencing_verification of a complementation cassette
AP159	ACATGGCCTGCGTGAAGAG	Bcbot6	qPCR_amplification of Bcbot6
AP160	GGAGATGCGGCTGAATGG	Bcbot7	qPCR_amplification of Bcbot7

AP161	CGCCTGCGAAGTTGGTCT	Bcbot7	qPCR_amplification of Bcbot7
AP162	TTGGAATGGGAAATTGGATATG	Bcin12g06440	qPCR_amplification of Bcin12g06440
AP163	CGAGTGCGAGTGTGATTGA	Bcin12g06440	qPCR_amplification of Bcin12g06440
AP164	TGGTTTCGTTCTGCGGTGCAT	Bcin04g02930	qPCR_amplification of Bcin04g02930
AP165	ATAATTGTAAGGGTCGAGGTAGTA	Bcin04g02930	qPCR_amplification of Bcin04g02930
BcABA1-F	TCTTTGAGATACTGCGAGCCTTT	Bcaba1	qPCR_amplification of Bcaba1
BcABA1-R	TCCATAGCTGAGGACATCACATG	Bcaba1	qPCR_amplification of Bcaba1
AP166	TAGGGGATGCATAGGAAAGAAT	Bcaba2	qPCR_amplification of Bcaba2
AP167	TAAACGGGAAGTAATAAGCCTCAT	Bcaba2	qPCR_amplification of Bcaba2
AP168	GGGCTTGCTGAGTTCCTTGA	Bcaba3	qPCR_amplification of Bcaba3
AP169	TCGCGATATTTGCATTGTCA	Bcaba3	qPCR_amplification of Bcaba3
APq1	CTTGATGCTGTTGGTATGATGACA	Bcpks7	qPCR_amplification of Bcpks-nrps7
APq2	CCTCGATAGCCTTCTCTAATACGT	Bcpks7	qPCR_amplification of Bcpks-nrps7
Ac-PKS6qF	CAGCAATCGTTGCTGAAATC	Bcboa6	qPCR_amplification of Bcboa6
Ac-PKS6qR	GTTTATCGCGTCTTCACCTGTTA	Bcboa6	qPCR_amplification of Bcboa6
AP173	GATCTCGGCACTTTCATGTGATC	Bcbot6 5'flank	Cloning_creation of a complementation cassette
AP177	gttcccgtagctattagtaactgga-AGCCCGGATGGCAGAGTGTAAG	BcniD 5'flank-Bcbot6 3'flank	Cloning_creation of a complementation cassette
AP178	ccccaaaaatgctcctcaatatca-TCCTAACATTATAATATCAAAAAG	PtpC-Bcbot6 5'flank	Cloning_creation of a complementation cassette
AP172	GATCACATGAAAGTGCCGAGATC	Bcbot6 5'flank	Cloning_creation of a complementation cassette
bcniD5'sF1	CAACAAAGGCATTACCAACCG	BcniD 5'flank	Diagnostic PCR_creation of a complementation cassette
AP118	TGTGGAGAATGAGGCAGAT	Bcbot6	Diagnostic PCR_creation of a complementation cassette
AP137	tagaactagt-GTCAGCAACAGTGCTGGT	(SpeI)-Bcbot6 5'flank	Diagnostic PCR_creation of a complementation cassette
AP138	taccgcccgc-TTTTCTAATTATTCATCT	(NotI)-Bcbot6 5'flank	Diagnostic PCR_creation of a complementation cassette
hygrofinU	TCCACTAGCTCCAGCCAAGC	PtpC	Sequencing_verification of a complementation cassette
AP120	ttcagatct-TTATGAGGTAACCGCTCT	(BglII)-Bcbot6	Sequencing_verification of a complementation cassette
AP132	taccgcccgc-TTCAGCCCCACTACAGAG	(NotI)-Bcbot6 5'flank	Sequencing_verification of a complementation cassette
AP174	gctctacatgagcatgccctgccctgag-CCCGGATGGCAGAGTGTAAG	Nat1-Bcbot6 3'flank	Cloning_creation of a complementation cassette
AP Nat1 pNDN F	CTCAGGGGCAGGGCATG	Nat1	Amplification of PtpC::nat1 ofr creation of a complementation cassette

AP Nat1 pNDN R	AGTGATATTGAAGGAGCATTTTTTG	PtrpC	Amplification of PtrpC::nat1 ofr creation of a complementation cassette
AP175	agcccaaaaaatgctccttcaatcact-CTCGTAACCTTTAGCAATAGA	PtrpC-Bcbot6 3' flank (2)	Amplification of 3' flank (2) for complementation in loco
AP176	gcgataacaatttcacacaggaacag-CCCGATTCCGGAAGCCAGGC	pRS426 3R-Bcbot6 3' flank (2)	Amplification of 3' flank (2) for complementation in loco
Nat1 hiF	CGGCGAGCAGGCGCTCTACATGAGC	Nat1	Diagnostic PCR_verification of the targeted integration
AP118	TGTGGAGAATGAGGCAGAT	Bcbot6	Diagnostic PCR_verification of the targeted integration
pRS426 short 3R	CGGATAACAATTTACACAGGA	pRS426	Amplification of the complementation cassette / diagnostic PCR and sequencing
pRS426 short 5F	CCAGGGTTTTCCAGTCAC	pRS426	Amplification of the complementation cassette / diagnostic PCR and sequencing
AP137	tagaactagt-GTCAGCAACAGTGCTGGT	(SpeI)-Bcbot6 5' flank	Diagnostic PCR / sequencing
AP142	taccgcgccgc-CGTCAGAAGCGTGCCTAG	(NotI)-pBcbot1-2	Cloning of pBcbot1-2 (Y1H)
AP143	tagaactagt-AGATGACTGTGCTAGATC	(SpeI)-pBcbot1-2	Cloning of pBcbot1-2 (Y1H)
AP144	tagaactagt-ATACATATAAAGAACGGT	(SpeI)-pBcbot1-2	Cloning of pBcbot2-1 T1 (Y1H)
AP145	taccgcgccgc-CGTTCTTTATATGTATTT	(NotI)-pBcbot1-2	Cloning of pBcbot2-1 T2 (Y1H)
AP146	tagaactagt-GTATTTGTTACGGTTAAG	(SpeI)-pBcbot1-2	Cloning of pBcbot2-1 T2 (Y1H)
AP147	taccgcgccgc-GCCTTAACCGTAACAAAT	(NotI)-pBcbot1-2	Cloning of pBcbot2-1 T3 (Y1H)
AP148	tagaactagt-CCGTTGTGGTGACATGCG	(SpeI)-pBcbot1-2	Cloning of pBcbot2-1 T3 (Y1H)
AP149	taccgcgccgc-AATCCGCATGCACCACA	(NotI)-pBcbot1-2	Cloning of pBcbot2-1 T4 (Y1H)
AS53	taccgcgccgc-AGATGACTGTGCTAGATC	(NotI)-pBcbot1-2	Cloning of pBcbot2-1 and pBcbot2-1 T1 (Y1H)
AS54	tagaactagt-CGTCAGAAGCGTGCCTAG	(SpeI)-pBcbot1-2	Cloning of pBcbot2-1 and pBcbot2-1 T4 (Y1H)
cnd15f	GCCGGAGCCAATCATCTA	Bcbot2	Diagnostic PCR for the presence of Bcbot2 / Genreation of the probe for the presence of Bcbot2
cnd15r	TCTTGTGCCCAACATAAA	Bcbot2	Diagnostic PCR for the presence of Bcbot2 / Genreation of the probe for the presence of Bcbot2

Table S2. Quantification of the different botryanes and botcinins compounds isolated from the recipient strain B05.10 and mutants after 5 and 12 days of culture.

Strain	Metabolite production (mg.L ⁻¹)			
	5 days		12 days	
	Botryanes	Botcinins	Botryanes	Botcinins
WT:B05.10	1 (2.8)			
	2 (2.26)			
	3 (1.8)	7+8 (0.9)	Derivative mixture (0.6)	7+8 (6.4)
	4 (0.48)			
<i>ΔBcbot6</i> ^{71.3} ^c <i>ΔBcbot6</i> ^{niaD}	-	7+8 (2.3)	-	7+8 (17.34)
	1 (3.9)			
	2 (4.73)		1 (5.5)	
	3 (2.03)	7+8 (1.05)	1a (2.6)	7+8 (5.2)
	5 (0.54)		4 (6.7)	
	6 (1.65)			
^c <i>ΔBcbot6</i> ^{CIL}	1 (0.75)			
	2 (2.6)			
	3 (0.93)	7+8 (1.1)	1 (4.65)	7+8 (5.91)
	5 (0.48)			
	6 (1.08)			
^c <i>ΔBcbot6</i> ^{GFP}	1 (3.2)			
	2 (4.8)		1 (4.65)	
	3 (1.75)	7+8 (0.95)	1a (7.85)	7+8 (4.7)
	4 (2.9)		4 (2.73)	
	6 (1.57)			

Table S3. Response to abiotic stresses in the recipient strain B05.10 and mutants.

Medium	Days post inoculation							
		WT : B05.10	<i>ΔBcbot6 41.1</i>	<i>ΔBcbot6 71.3</i>	<i>cΔBcbot6^{niaD}</i>	<i>cΔBcbot6^{CIL}</i>	<i>cΔBcbot6^{GFP}</i>	
MM (NO ₃ ⁻)	2	22.3 ± 0.5 (100 %)	21.7 ± 1.3 (97 %)	23.7 ± 0.5 (105 %)	27.3 ± 2.4 (122 %)	24.0 ± 1.6 (107 %)	26.0 ± 0.0 (116 %)**	
	4	48.7 ± 1.3 (100 %)	45.3 ± 3.1 (93 %)	49.0 ± 0.8 (100 %)	53.0 ± 2.9 (109 %)	49.3 ± 1.9 (101 %)	52.3 ± 2.1 (107 %)	
	7	-	-	-	-	-	-	
MM (NH ₄ ⁺)	2	18.7 ± 2.5 (100 %)	17.0 ± 2.9 (91 %)	21.0 ± 0.8 (113 %)	21.7 ± 0.5 (116 %)	19.3 ± 3.1 (104 %)	21.3 ± 3.4 (114 %)	
	4	42.7 ± 1.7 (100 %)	45.0 ± 1.6 (105 %)	44.0 ± 1.4 (103 %)	46.7 ± 0.5 (109 %)	27.2 ± 16.0 (64 %)	46.7 ± 7.3 (109 %)	
	7	65.0 ± 5.1 (100 %)	70.0 ± 0.0 (108 %)	72.0 ± 2.2 (111 %)	74.3 ± 0.5 (114 %)	79.0 ± 5.7 (122 %)	68.0 ± 4.3 (105 %)	
NaCl	2	15.0 ± 2.2 (100 %)	12.0 ± 0.8 (80 %)	13.0 ± 0.8 (87 %)	17.0 ± 2.9 (113 %)	13.0 ± 0.0 (87 %)	13.7 ± 0.9 (91 %)	
	4	34.3 ± 0.5 (100 %)	29.7 ± 0.5 (86 %)**	34.0 ± 1.6 (99 %)	36.0 ± 5.7 (105 %)	33.3 ± 1.3 (97 %)	26.0 ± 0.8 (76 %)**	
	7	70.0 ± 9.2 (100 %)	49.7 ± 1.3 (71 %)	61.3 ± 3.7 (88 %)	67.0 ± 11.4 (96 %)	61.3 ± 1.3 (88 %)	37.0 ± 2.2 (53 %)*	
Sorbitol	2	19.0 ± 1.4 (100 %)	16.3 ± 4.2 (86 %)	22.0 ± 4.3 (116 %)	20.7 ± 1.7 (109 %)	20.3 ± 1.3 (107 %)	18.0 ± 1.6 (95 %)	
	4	49.0 ± 1.6 (100 %)	45.0 ± 4.3 (92 %)	50.3 ± 4.5 (103 %)	44.7 ± 1.3 (91 %)	47.7 ± 1.7 (97 %)	47.7 ± 2.1 (97 %)	
	7	-	80.7 ± 3.3 (97 %)	-	82.3 ± 0.9 (99 %)	-	81.3 ± 2.4 (98 %)	
H ₂ O ₂	2	11.0 ± 0.8 (100 %)	13.3 ± 1.9 (121 %)	13.7 ± 1.3 (124 %)	14.7 ± 2.4 (133 %)	13.7 ± 3.9 (124 %)	13.7 ± 1.3 (124 %)	
	4	34.0 ± 0.8 (100 %)	33.3 ± 2.6 (98 %)	37.3 ± 4.0 (110 %)	38.3 ± 2.6 (113 %)	38.0 ± 4.2 (112 %)	38.3 ± 0.9 (112 %)*	
	7	65.0 ± 2.9 (100 %)	60.7 ± 2.6 (93 %)	69.0 ± 4.9 (106 %)	66.3 ± 4.2 (102 %)	66.3 ± 5.3 (102 %)	66.0 ± 5.4 (102 %)	
Menadione	2	8.3 ± 2.9 (100 %)	10.3 ± 1.9 (124 %)	10.7 ± 0.5 (128 %)	8.0 ± 2.2 (96 %)	12.3 ± 0.9 (148 %)	11.7 ± 0.9 (140 %)	
	4	12.7 ± 4.0 (100 %)	12.7 ± 2.4 (100 %)	20.0 ± 4.6 (158 %)	9.3 ± 1.7 (74 %)	16.0 ± 0.8 (126 %)	17.3 ± 2.6 (137 %)	
	7	23.0 ± 9.2 (100 %)	15.0 ± 2.2 (65 %)	30.7 ± 0.5 (133 %)	12.7 ± 0.5 (55 %)	30.7 ± 10.5 (133 %)	20.0 ± 3.6 (87 %)	
CFW	2	23.3 ± 1.3 (100 %)	20.3 ± 1.9 (87 %)	23.0 ± 2.5 (99 %)	24.3 ± 0.5 (104 %)	22.3 ± 1.9 (96 %)	25.3 ± 1.7 (109 %)	
	4	50.0 ± 0.0 (100 %)	44.3 ± 1.3 (89 %)	54.0 ± 1.4 (108 %)	52.3 ± 0.5 (105 %)*	49.7 ± 2.6 (99 %)	49.0 ± 2.9 (98 %)	
	7	-	69.7 ± 3.4 (84 %)*	-	-	79.3 ± 5.2 (96 %)	-	
RM	2	23.3 ± 0.5 (100 %)	23.3 ± 0.9 (100 %)	24.7 ± 0.5 (105 %)	25.0 ± 0.8 (107 %)	24.3 ± 0.5 (104 %)	25.0 ± 0.8 (107 %)	
	4	50.3 ± 0.5 (100 %)	49.3 ± 0.9 (98 %)	50.7 ± 0.5 (100 %)	50.7 ± 0.5 (100 %)	50.7 ± 0.5 (100 %)	52.3 ± 1.3 (103 %)	
	7	-	-	-	-	-	-	

Three-day old mycelium plugs were inoculated onto plates containing the indicated media. Cultures were incubated at 21°C with an alternation of 12 h of darkness and 12 h of white light. Mean values (colony diameter in mm) and standard deviation were calculated from three colonies per strain and condition. Relative growth (% of the WT B05.10 strain) is indicated in brackets. Statistical (t-test) analysis were performed by comparing the colony diameters of the mutants to the WT B05.10 strain in each condition (*p≤0.01, **p≤0.001). The symbol “ - “ indicates that the mycelium reached the edge of the plate.

Table S4. Screening for the presence of *BcBot2* gene in different *Botrytis* species.

Species	Strain	Location and year of isolation	Host plant	PCR	Southern
<i>B. cinerea</i>	INRA 32	Chateau La Rivière, France (1992)	<i>Vitis vinifera</i>	+	+
<i>B. cinerea</i>	INRA 651	Bar sur Seine, France (1994)	<i>Vitis vinifera</i>	+	+
<i>B. cinerea</i>	INRA 704	Plumecoq, France (1994)	<i>Vitis vinifera</i>	+	+
<i>B. cinerea</i>	INRA 1476	Tour Blanche, France (1998)	<i>Vitis vinifera</i>	+	+
<i>B. cinerea</i>	INRA 1656	Turckein, France (1998)	<i>Vitis vinifera</i>	+	+
<i>B. cinerea</i>	INRA, UWS111	Sydney, Australia (2001)	<i>Vitis vinifera</i>	+	+
<i>B. cinerea</i>	INRA T4	Eyragues, France (1991)	<i>Lycopersicon esculentum</i>	+	+
<i>B. cinerea</i>	INRA 2056	Gent, Belgium (2004)	<i>Lycopersicon esculentum</i>	+	+
<i>B. cinerea</i>	INRA P462	France	<i>Lycopersicon esculentum</i>	+	+
<i>B. cinerea</i>	INRA 2060	Takelsa, Tunisia (2004)	<i>Lycopersicon esculentum</i>	+	+
<i>B. cinerea</i>	INRA K1	Saint Nicolas, France (1991)	<i>Actinidia deliciosa</i>	+	nd
<i>B. cinerea</i>	Uni. Münster, B05.10	Germany (1994)	Unknown	+	+
<i>B. fabae</i>	CBS109.57	Beesd, The Netherlands (1957)	<i>Vicia fabae</i>	-	nd
<i>B. fabae</i>	MUCL98	Spain (1929)	<i>Vicia fabae</i>	-	-
<i>B. fabae</i>	INRA 2220	Tunis, Tunisia (2004)	<i>Vicia fabae</i>	-	-
<i>B. fabae</i>	INRA 2232	Korba, Tunisia (2004)	<i>Vicia fabae</i>	-	nd
<i>B. fabae</i>	INRA 2237	Mateur, Tunisia (2004)	<i>Vicia fabae</i>	-	nd
<i>B. pseudocinerea</i>	INRA 774	Trepail, France (1995)	<i>Vitis vinifera</i>	-	nd
<i>B. pseudocinerea</i>	INRA 780	Plumecoq, France (1995)	<i>Vitis vinifera</i>	-	-
<i>B. pseudocinerea</i>	INRA 987	Plumecoq, France (1995)	<i>Vitis vinifera</i>	-	nd
<i>B. pseudocinerea</i>	INRA 1779	Aloheim, Germany (1995)	<i>Vitis vinifera</i>	-	-
<i>B. pseudocinerea</i>	INRA 1814	Suffolk, UK (1997)	<i>Fragaria ananassa</i>	-	-
<i>B. calthae</i>	MUCL 1089	Lovenjoel, Belgium (1960)	<i>Caltha palustris</i>	-	-
<i>B. aclada</i>	MUCL 8415	Kitzeberg, Germany (1965)	<i>Allium cepa</i>	+	+
<i>B. squamosa</i>	MUCL1107	California, USA (1923)	<i>Allium cepa</i>	+	+
<i>B. porri</i>	MUCL 3234	Unknown place (1926)	<i>Allium porrum</i>	+	+
<i>B. convoluta</i>	MUCL 11595	Salem, Oregon, USA (1968)	Rhizome	-	-
<i>S. sclerotiorum</i>	Uni. Florida, 1980	Nebraska, USA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-	-

The PCR primers cnd15f and cnd15r were used to amplify the *Bcbot2* gene and to generate a probe for the Southern hybridization. *Sclerotinia* is the closest genus to *Botrytis*, and the genome of *S. sclerotiorum* lacks the botrydial gene cluster (Amselem *et al.*, 2011). nd: not determined.

Chapitre II

Régulation spécifique du cluster de l'acide botcinique chez *B. cinerea*

Introduction

Le pouvoir pathogène de *Botrytis cinerea*, repose en partie, comme il l'a été abordé précédemment dans ce manuscrit, sur la production de toxines non-hôte spécifiques. Il s'agit de l'acide botcinique (BOA) ainsi que de ses dérivés (les botcinines) et du botrydial (et ses dérivés appelés botryanes). Il a été démontré que ces métabolites ont un rôle redondant dans l'infection. Cependant, leur(s) cible(s) moléculaire(s) demeure(nt) inconnue(s) (Dalmais *et al.*, 2011; Rossi *et al.*, 2011).

Le cluster de gènes impliqués dans la biosynthèse du polycétide BOA a été caractérisé par Dalmais *et al.* (2011). L'observation de la surexpression *in planta* de *Bcboa6* et *Bcboa9* tous deux codant des polyketide synthases (PKS) a conduit les auteurs à générer des mutants déficients dans ces gènes. *BcBoa6* et *BcBoa9* se sont avérés impliqués dans la production de BOA et leur rôle a depuis été caractérisé *via* l'utilisation de marqueurs isotopiques (Massaroli *et al.*, 2013). *BcBoa6* est ainsi responsable de la formation de la structure cyclique partagée par les botcinines et les botrylactones (une autre famille de métabolites) alors que *BcBoa9* est impliqué dans la formation de la chaîne latérale retrouvée chez BOA et ses dérivés. De plus, ces résultats ont prouvé que les botcinines et les botrylactones possèdent un squelette construit à partir d'unité d'acétate et que les quatre groupements méthyles proviennent de la méthionine. A l'époque de l'étude de Dalmais *et al.* (2011), l'assemblage complet des séquences génomiques de *B. cinerea* n'était pas achevé. Seuls 118 contigs (séquences continues obtenues à partir de l'assemblage de séquences qui présentent un chevauchement) étaient disponibles (Amselem *et al.*, 2011). Les auteurs ont ainsi identifié les gènes adjacents d'une part au gène clé *Bcboa6* et d'autre part au gène clé *Bcboa9*. Sur la base de données d'expression chez un mutant affecté dans la sous-unité α de la protéine G (*ΔBcbcg1*), le cluster BOA a été défini et a été prédit comme composé de 17 gènes présents sur deux contigs différents. La première partie du cluster comprenait les gènes de *Bcboa1* à *Bcboa6* et la seconde de *Bcboa7* à *Bcboa17*. La présence de séquences A+T-riches de part et d'autres de ces deux sets de gènes interférait avec les tentatives d'identification des gènes voisins par PCR et ne permettait donc pas de définir si le cluster était présent en un unique locus au sein du génome ou s'il était séparé en deux parties. En plus de ces deux gènes codant les enzymes clés, le cluster BOA est, d'après Dalmais *et al.*, composé de dix gènes

codant des protéines putativement impliquées dans les modifications apportées au squelette du BOA pour synthétiser les MS finaux. Deux gènes (*Bcboa12* et *Bcboa14*) codent des protéines à la fonction inconnue. De façon intéressante, le cluster BOA comporte trois gènes putativement impliqués dans sa régulation. En effet, ceux-ci codent pour des protéines ayant des domaines caractéristiques de facteurs de transcription (*Bcboa13* et *Bcboa15*) ou de régulateur putatif (*Bcboa1*). Le cluster BOA est également présent chez *Sclerotinia sclerotiorum* qui est une espèce proche de *B. cinerea* (Amselem *et al.*, 2011; Dalmais *et al.*, 2011). Chez cet organisme les gènes *Ssboa1* et *Ssboa2* sont présents en un locus au sein du génome tandis que les gènes *Ssboa3* à *Ssboa13* sont localisés au niveau d'un autre locus. Les homologues des gènes *Bcboa14* à *Bcboa17* ne sont pas prédits chez cette espèce.

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés à la caractérisation plus précise du cluster BOA. Dans un premier temps, nous avons cherché à caractériser la région génomique contenant le cluster. L'obtention récente de l'assemblage complet du génome de B05.10 (van Kan *et al.*, 2016) a permis d'apporter de nouvelles informations importantes quant à la structure des gènes *Bcboa* et à leur localisation. Nous avons cherché à identifier des copies d'éléments transposables (ETs) et à définir si les séquences A+T-riches pouvaient provenir de l'action du RIP comme c'est le cas pour le cluster BOT (Porquier *et al.*, 2016a). Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la régulation spécifique du cluster BOA. Nous avons ainsi caractérisé les trois gènes candidats *Bcboa1*, *Bcboa13* et *Bcboa15*. Finalement, les clusters BOT et BOA sont co-régulés lors de l'infection mais aussi dans les différents milieux de culture testés (Viaud *et al.*, 2016). Ainsi, nous avons mis en place des expérimentations visant à identifier de possibles régulateurs communs agissant en amont des clusters BOT et BOA.

Résultats

1. La région génomique du cluster BOA comporte une structure bipartite avec des portions A+T-riches et des éléments transposables (ETs) RIPés

1.1. Le cluster BOA est présent en un unique locus au sein du génome de B05.10

Les informations génomiques disponibles suite aux premiers séquençages du génome de B05.10 laissaient planer le doute sur le lien physique entre les deux parties du cluster au sein de cette souche. Des informations obtenues chez une autre souche, *i. e.* T4, indiquaient que les deux parties du cluster étaient liées par une région de 8 kb (Staats et van Kan, 2012). Ce n'est qu'avec l'assemblage complet du génome de la souche B05.10 (van Kan *et al.*, 2016) que le mystère a pu être levé. Il apparaît ainsi que le cluster défini par Dalmais *et al.* (2011) (*Bcboa1-Bcboa17*) est présent en un unique locus à l'extrémité du chromosome 1 (BCIN01)(**Fig. II.1A**). *Bcboa1* est même le premier gène de ce chromosome et se situe à environ 5 kb du télomère. Une région de 16 kb sépare *Bcboa6* et *Bcboa7*.

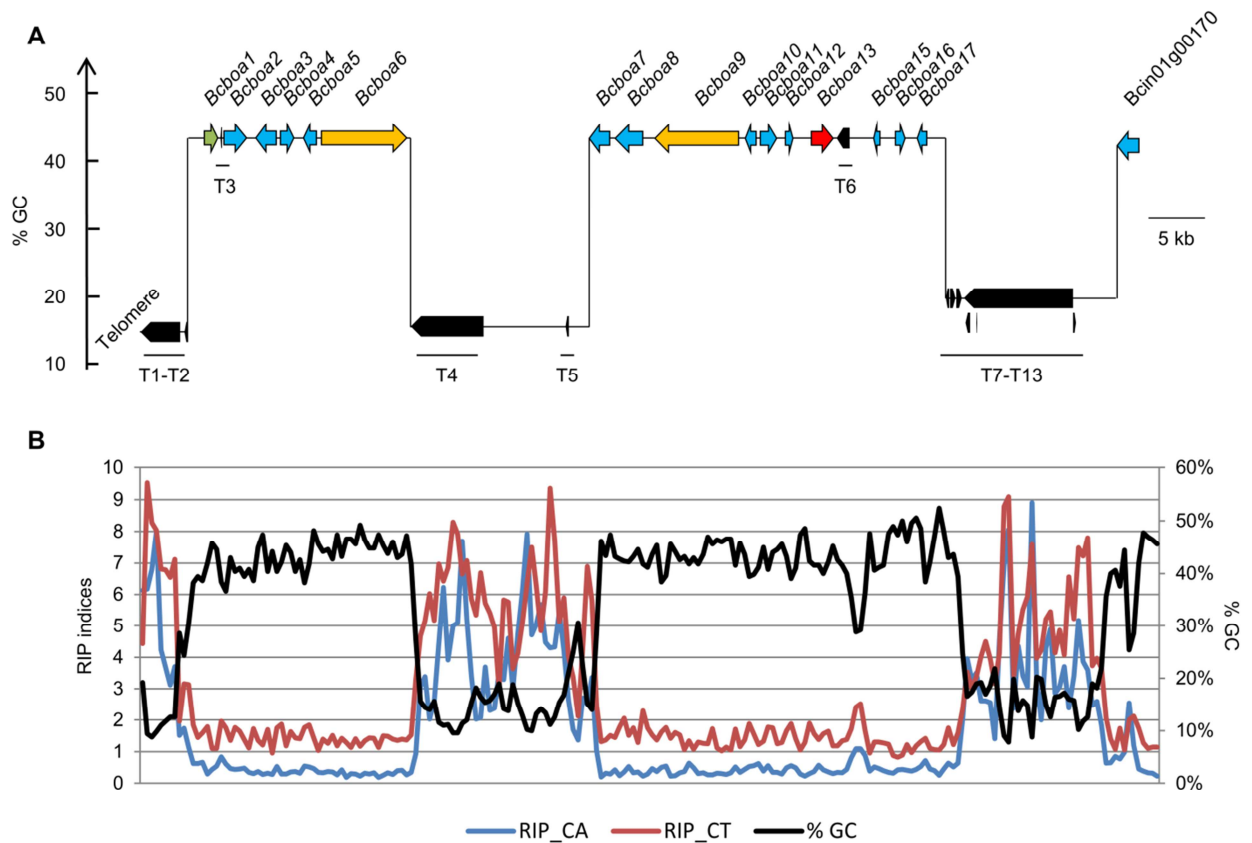


Fig. II.1. Le cluster BOA est positionné dans une région génomique comprenant des portions A+T-riches où des ETs mutés par le RIP sont localisés.

A. Le cluster BOA est positionné à l'extrémité du chromosome 1 (BCIN01). Les gènes prédits par van Kan *et al.*, 2016 et les ETs identifiés dans Porquier *et al.* (2016) sont représentés (Cf. **Tableau II.1** pour plus de détails). Les variations du taux de G+C ont été analysées par le calcul de points de segmentation avec GC-profile (Gao et Zhang, 2006). Les régions A+T-riches contiennent exclusivement des ETs tandis que les régions équilibrées en G+C/A+T contiennent les gènes. **B.** Le pourcentage en G+C ainsi que les indices de RIP ont été calculés par fenêtres de 500 pb avec un recouvrement de 400 pb tout au long de la région représentée. Les indices RIP_CA et RIP_CT représentent le ratio de conversion des dinucléotides pré-RIP CA et CT en dinucléotides post-RIP CT et TT respectivement (ainsi que leur reverse complément TG->TA et AG->AA).

Tableau II.1. Eléments génomiques présents dans la région comprenant le cluster BOA.

Gene / TE copy	Gene / TE consensus name	Length (bp)	Gene function
T1	RLX_P21.1 (<i>Boty</i>)	3, 487	
T2	DXX-MITE_P15.8	311	
<i>Bcboa1</i>	Bcin01g00010	1, 179	Putative NmrA-like regulator
T3	DXX-MITE_P15.8	122	
<i>Bcboa2</i>	Bcin01g00020	1, 970	Putative flavin-binding MO-like
<i>Bcboa3</i>	Bcin01g00030	1, 809	Putative monooxygenase
<i>Bcboa4</i>	Bcin01g00040	1, 171	Putative monooxygenase
<i>Bcboa5</i>	Bcin01g00050	1, 128	Putative alcohol dehydrogenase
<i>Bcboa6</i>	Bcin01g00060	7, 563	Polyketide synthase (Dalmais <i>et al.</i> , 2011)
T4	RLX_P6.1 (<i>Boty</i>)	6, 428	
T5	RLX_G57	279	
<i>Bcboa7</i>	Bcin01g00070	1, 780	Putative monooxygenase
<i>Bcboa8</i>	Bcin01g00080	2, 468	Putative FAD-binding
<i>Bcboa9</i>	Bcin01g00090	7, 400	Polyketide synthase (Dalmais <i>et al.</i> , 2011)
<i>Bcboa10</i>	Bcin01g00100	984	Putative thioesterase
<i>Bcboa11</i>	Bcin01g00110	1, 413	Putative transferase
<i>Bcboa12</i>	Bcin01g00120	663	Unknown
<i>Bcboa13</i>	Bcin01g00130	1, 901	Zn(II) ₂ Cys ₆ transcription factor
T6	DTX_G36	1, 113	
<i>Bcboa15</i>	Bcin01g00140	540	Pseudogene
<i>Bcboa16</i>	Bcin01g00150	831	Putative dehydratase / Pseudogene
<i>Bcboa17</i>	Bcin01g00160	825	Putative dehydrogenase
T7	DXX-MITE_P15.8	311	
T8	noCat_G9	495	
T9	DXX-MITE_P15.8	315	
T10	RLX_P6.1 (<i>Boty</i>)	9, 667	
T11	DXX-MITE_P15.8	447	
T12	RLX_P26.1 (<i>Boty</i>)	76	
T13	DXX-MITE_G19	233	
	Bcin01g00170	1, 942	Putative permease

Les gènes et les ETs apparaissent dans l'ordre dans lequel ils apparaissent sur le BCIN01 (Fig. II.1). Le nom des consensus des ETs se réfère à l'annotation effectuée dans Porquier *et al.* (2016).

1.2. *Bcboa1-Bcboa13* sont co-régulés

Le cluster BOA avait été défini sur la base du profil d'expression (obtenu à partir de filtres haute-densité à ESTs pour Expressed Sequences Tags) chez le mutant $\Delta Bcbcg1$ et des fonctions putatives de ses gènes prédits (Dalmais *et al.*, 2011). La nouvelle annotation du génome de B05.10 basée sur des données importantes de RNAseq a permis de faire évoluer les connaissances sur le cluster (**Tableau II.1**). Ainsi, *Bcboa14* n'est plus prédit comme un gène à part entière, mais ferait partie de la région 3'UTR de *BcBoa15* (van Kan *et al.*, 2016 ; **Fig.II.S1 à la fin du Chapitre**). Depuis l'étude de Dalmais *et al.* (2011), de nombreuses données transcriptomiques ont aussi été acquises. Dans le but d'avoir une vue d'ensemble de l'expression des gènes présents dans la région génomique étudiée, nous avons représenté en **Fig. II.2** le profil d'expression des gènes prédits *Bcboa* ainsi que du gène voisin Bcin01g00170 (qui n'est pas prédit comme faisant partie du cluster) dans différentes conditions de croissance et différents fonds génétiques. On remarque que parmi les trois jeux de données, le niveau d'expression est faible pour *Bcboa15* et nul pour *Bcboa16*. Ces données peuvent indiquer que *Bcboa16*, et dans une moindre mesure *Bcboa15*, sont des pseudogènes. Ici, les pseudogènes sont définis comme des séquences d'ADN pouvant montrer une homologie avec des gènes fonctionnels mais qui contiennent des mutations n'aboutissant pas à la production d'une protéine ou menant à la production de protéines dont la fonction est compromise (Yang *et al.*, 2011). Une pseudogénéisation peut résulter de l'insertion d'une mutation entraînant un codon stop prématuré, un décalage du cadre de lecture, d'une jonction d'épissage défectueuse ou encore d'une mutation au sein des séquences régulatrices nécessaires à la transcription (Zhang *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011). Généralement, les pseudogènes présentent une expression plus faible que celle des gènes dont ils proviennent.

En ce qui concerne les gènes *Bcboa1-Bcboa13*, les profils d'expression semblent similaires dans toutes les conditions, ce qui suggère une co-régulation. Finalement, le profil d'expression de *Bcboa17* semble légèrement différent de celui du reste des gènes prédits *Bcboa*. Notamment, l'expression du gène ne semble pas aussi affectée chez le $\Delta Bcvel1$ que le reste des gènes du cluster (**Fig. II.2B**).

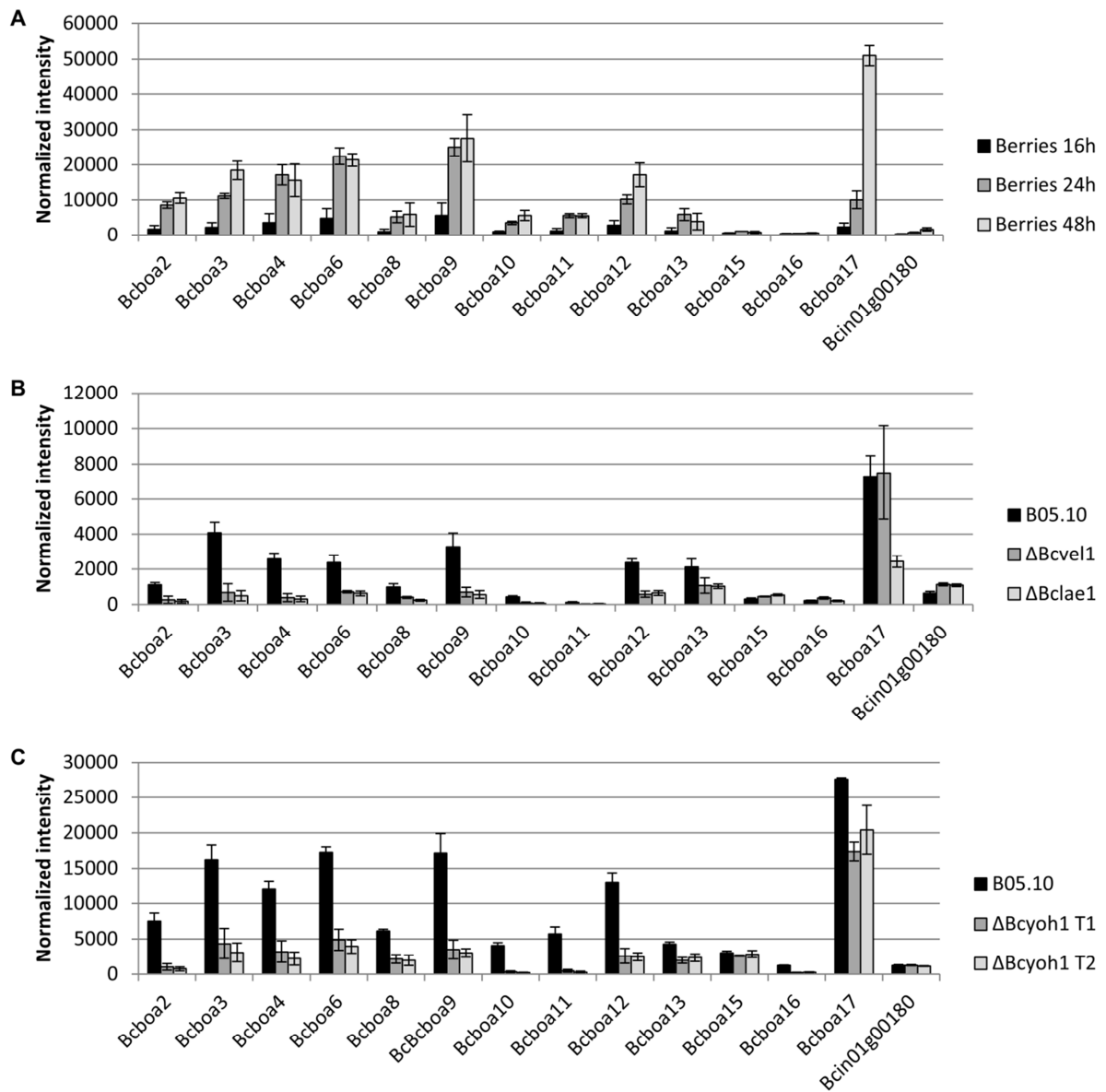


Fig. II.2. Profils d'expression des gènes du cluster BOA putatif.

Les profils d'expression des gènes présents au niveau de la région génomique du cluster BOA et acquis dans diverses conditions sont représentés. Les données ont été extraites des résultats obtenus par puce à ADN dans les études de **A.** Kelloniemi *et al.* (2015), **B.** Schumacher *et al.* (2015) et **C.** Simon *et al.* (2013).

1.3. Le cluster BOA est situé dans une région bipartite qui comporte des portions riches en A+T

La caractérisation précise de l'environnement génomique du cluster BOA chez B05.10 s'était préalablement avérée impossible en raison de la présence de séquences A+T-riches de part et d'autres des parties identifiées du cluster. L'acquisition de la séquence du génome de B05.10 (grâce à l'utilisation de la technologie PacBio) a permis de confirmer ces observations. Pour avoir une idée plus précise de l'évolution de la composition de l'ADN tout au long des chromosomes, nous avons utilisé l'outil GC-profile (<http://tubic.tju.edu.cn/GC-Profile/>; Gao et Zhang, 2006). Cet outil permet de calculer des points de segmentation qui représentent des changements importants du ratio G+C/A+T. Cinq de ces points de segmentation ont pu être déterminés au niveau de la région génomique étudiée. Ainsi, la **Fig. II.1** montre une alternance entre des portions d'ADN A+T-riches (environ 80% en A+T) et des portions dont le pourcentage en G+C est comparable à la moyenne du génome (*i.e.* 42.75% ; Staats et van Kan, 2012). On remarque que de façon évidente, les portions d'ADN dont le ratio G+C/A+T est équilibré comportent les gènes (et les possibles pseudogènes) *Bcboa*. A l'inverse, les portions A+T-riches ne contiennent pas de séquence codante.

1.4. Les régions A+T-riches contiennent des ETs

Précédemment, dans le cadre de la caractérisation du cluster BOT, nous avons entrepris l'annotation des ETs sur le génome de B05.10 (Porquier *et al.*, 2016a). Ici, dans le but de définir si pour le cluster BOA également, les régions A+T-riches comportent des ETs, nous avons localisé les transposons prédits au niveau de la région génomique étudiée (**Tableau II.1**, **Fig. II.1A**). Les trois classes d'ETs (LTR, TIRE et MITE; Wicker *et al.*, 2007) identifiés chez *B. cinerea* (Porquier *et al.*, 2016a) sont représentées parmi eux. De plus, un ET (T8) n'appartient à aucune classe et est par conséquent attribué à la catégorie « nocat ». A l'inverse du cluster BOT au sein duquel seuls des reliques d'ETs avaient pu être identifiées (longueur souvent inférieure à 400 pb et faible alignement par rapport à leur ET consensus), le cluster BOA est à proximité d'ETs présentant une forte hétérogénéité de taille. Trois d'entre eux, appartenant à la classe des LTR, sont particulièrement longs (T1, T4 et T10 dont la longueur est respectivement de 3 487, 6 428 et 9 667 pb). On peut observer que

d'une manière générale, les ETs sont principalement localisés au niveau des séquences A+T-riches (les exceptions étant T3 et T6).

1.5. Les ETs présents au niveau de la région génomique du cluster BOA sont RIPés

Il est maintenant bien connu que le mécanisme du RIP est impliqué dans le silencing de certaines séquences chez les champignons dont *B. cinerea* (Hane et Oliver, 2008; Amselem *et al.*, 2015). Son action (se caractérisant par la mutation de bases C en T) a pour conséquence l'augmentation du pourcentage en A+T de l'ADN. Ainsi, pour aller plus loin dans la caractérisation de la région génomique comprenant le cluster BOA et pour déterminer si l'action du RIP pourrait être à l'origine de l'enrichissement en A+T observé au niveau des ETs, nous avons utilisé deux approches alternatives. La première consiste à calculer des indices de RIP sur une région génomique d'intérêt. Chez *B. cinerea*, il a été démontré que les mutations résultant du RIP (C vers T) intervenaient principalement au sein des dinucléotides CA et CT (Amselem *et al.*, 2015). Ainsi, nous avons calculé les indices de RIP pour ces deux mutations majoritaires (CA->TA et CT->TT et les complémentaires inverses) pour l'ensemble de la région génomique comprenant le cluster BOA (**Fig. II.1A**). Les résultats montrent clairement que ces indices de RIP augmentent au niveau des régions riches en A+T comprenant les ETs. A l'inverse, ils restent faibles au niveau des portions d'ADN au sein desquelles le ratio G+C/A+T est équilibré. Le locus comprenant le T6 est le seul situé dans une région au ratio C+G/A+T équilibré pour lequel les indices de RIP augmentent parallèlement à une diminution ponctuelle du ratio C+G/A+T. Ces résultats semblent donc indiquer que les ETs qui se trouvent dans la région génomique étudiée ont été mutés par le RIP. Pour les confirmer, nous avons utilisé une seconde approche. A l'inverse de la première qui visait à faire une étude globale de la région, cette nouvelle stratégie nécessite l'étude de chaque ET de façon isolée. Pour cela, la copie d'ET étudiée est alignée avec son ET consensus. Néanmoins, cette approche n'est envisageable que si l'ET étudié est suffisamment long (>400 pb) et si l'alignement avec son consensus est suffisamment important (>80 %). Ainsi, nous avons décidé d'utiliser cette méthode basée sur l'alignement uniquement avec les trois ETs les plus longs (peu dégénérés vis-à-vis de leur consensus), c'est-à-dire T1, T4 et T10. Après alignement des copies de ces ETs avec leur consensus, nous avons calculé le taux de transitions /

transversions qui donne des indications sur l'occurrence du RIP (**Tableau II.2**). Un ratio Ti/Tv supérieur à 2 indique une probable occurrence du RIP. De plus, toutes les mutations possiblement induites par le RIP (c'est-à-dire CA->TA, CT->TT, CC->TC, CG->TG et leur complémentaire inverse) ont été calculées. Chez *B. cinerea*, le RIP agit préférentiellement au niveau des dinucléotides CA et CT (Amselem *et al.*, 2015). Pour les T1 et T4, les résultats suggèrent clairement des mutations par le RIP en raison de leur ratio Ti/Tv ainsi que par la prééminence des mutations CA->TA et CT->TT (ainsi que leur inverse complémentaire). En ce qui concerne T10, malgré un ratio Ti/Tv inférieur à 2, les résultats du RIP_CA et RIP_CT sont majoritaires.

L'ensemble de ces résultats suggère donc fortement que les ETs qui sont présents au niveau des portions A+T-riches de la région étudiée ont subi des mutations induites par le RIP.

Tableau II.2. Résultats de l'analyse de l'occurrence du RIP sur des copies d'ETs.

ET	Ti/Tv	%RIP_CA2	%RIP_CT2	%RIP_CG2	%RIP_CC2
T1	3.0	23.0	45.9	9.5	21.6
T4	55.1	45.1	38.6	7.0	9.3
T10	1.4	45.0	40.6	5.5	8.9

Ti : transition ; Tv : transversion. Les formules pour le calcul des indices de RIP (%RIP_CX2) sont présentées dans la partie **Matériels et méthodes**.

2. Mise en évidence d'un régulateur spécifique du cluster BOA

2.1. Rôle putatif de BcBoa13, BcBoa1 et BcBoa15 dans l'expression des gènes *Bcboa*

La plupart des clusters du métabolisme secondaire fongique possède un FT Zn(II)₂Cys₆ qui contrôle spécifiquement l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du métabolite (Brakhage, 2012; Knox et Keller, 2015). C'est notamment le cas de GliZ qui est un régulateur transcriptionnel spécifique du cluster de la gliotoxine chez *Aspergillus fumigatus* (Bok, Chung, *et al.*, 2006). Etant donné que BcBoa13 est prédit comme possédant ce domaine particulier (PF00172), nous avons émis l'hypothèse que cette protéine devrait jouer le rôle de régulateur spécifique du cluster BOA.

Par ailleurs, le gène *Bcboa1* code pour une protéine qui possède un domaine NmrA (PF05368) (**Fig. II.3**) comme la protéines Bik4 de *Fusarium fujikuroi* (et BcBik4 de certaines souches de *B. cinerea*) qui régule positivement la synthèse du pigment rose appelé bikaverine (Wiemann *et al.*, 2009). Si la fonction des protéines NmrA-like demeure inconnue, celle de la protéine NmrA (Nitrogen metabolite regulator) d'*A. nidulans* est d'interagir avec le FT AreA pour réprimer l'activité de ce dernier (Tudzynski, 2014).

Enfin, le gène *Bcboa15* code pour une protéine avec un domaine Fungal Trans (PF04082) spécifique des FTs fongiques. La protéine prédite ne semble pas contenir de domaine de fixation à l'ADN mais l'étude évolutive de van der Burgt *et al.* (2014) révèle qu'un domaine de liaison à l'ADN aurait été présent en partie Nter de la protéine ancestrale (**Fig. II.4**). Il est probable que des mutations (illustrées sur la **Fig. II.4B**) soient apparues au sein de la séquence donnant naissance à la protéine tronquée BcBoa15 actuelle. Une telle protéine ne possédant que le domaine Fungal Trans est néanmoins fonctionnelle chez le champignon *Ascochyta rabiei* (Kim *et al.*, 2015).

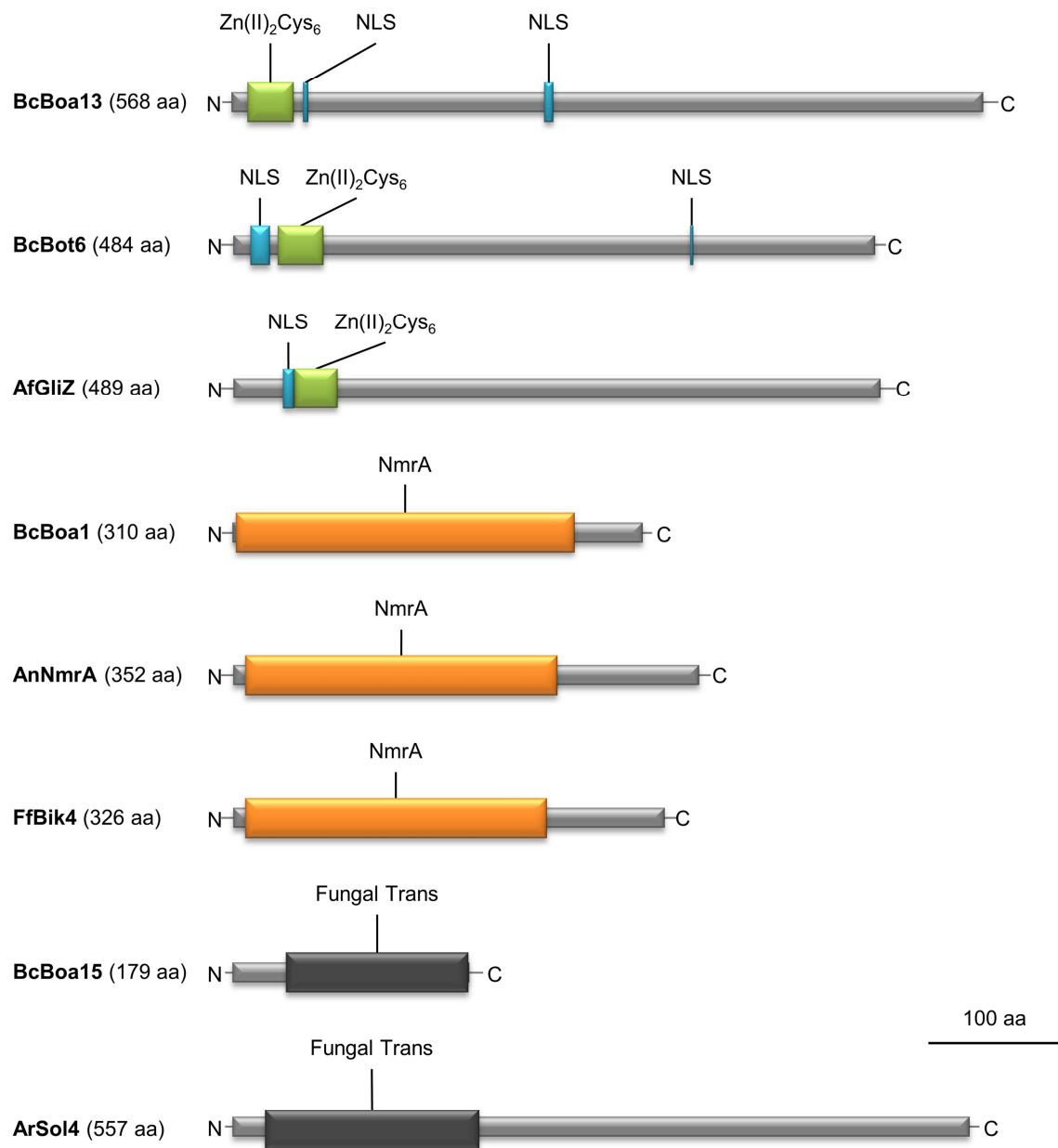


Fig. II.3. Représentation des domaines prédits de BcBoa13, BcBoa1 et BcBoa15.

Les protéines BcBoa13, BcBoa1 et BcBoa15 ainsi que des protéines caractérisées possédant des domaines similaires sont schématisées. Les domaines ont été prédits avec PFAM (<http://pfam.xfam.org/>). Les signaux de localisation nucléaires (NLS) ont été prédits avec WOLF pSORT (<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>). Les domaines représentés sont Zn(II)₂Cys₆ (PF00172), NmrA (PFAM05368) et Fungal Trans (PF04082). Af : *Aspergillus fumigatus* ; Ar : *Ascochyta rabiei* ; Bc : *Botrytis cinerea* ; Ff : *Fusarium fujikoroï*.

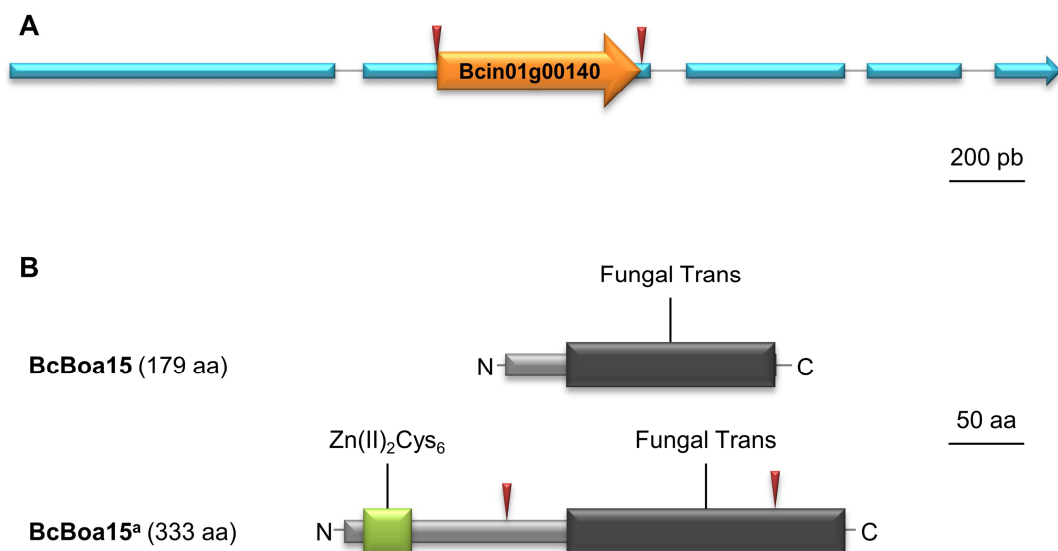


Fig. II.4. Comparaison de BcBoa15 avec la protéine ancestrale d'après van der Burgt *et al.* (2014).

A. La CDS prédite actuelle (Bcin01g00140 ; représentée par la flèche orange) est entourée de longues séquences non-codantes 5' et 3' comprenant des exons (en bleu) et des introns (ligne grise). **B.** Comparaison de la protéine prédite actuelle (BcBoa15) avec la protéine ancestrale (BcBoa15^a) prédite par van der Burgt *et al.* (2014). Les domaines ont été prédits avec PFAM (<http://pfam.xfam.org/>). Les domaines représentés sont Zn(II)₂Cys₆ (PF00172) et Fungal Trans (PF04082). Les mutations délétères prédites par van der Burgt et ses collaborateurs sont représentées par les triangles inversés rouges.

2.2. Délétion de *Bcboa13*, *Bcboa1* et *Bcboa15*

Pour tester le rôle de régulateur putatif des protéines BcBoa13, BcBoa1 et BcBoa15, nous avons dans un premier temps généré des mutants KO. L'ORF de *Bcboa13* a été remplacée par le gène de résistance à l'hygromycine tandis que celles de *Bcboa1* et *Bcboa15* ont été remplacées par le gène de résistance à la nouséotricine (**Fig. II.S2 et II.S3 à la fin du Chapitre**). En ce qui concerne la délétion de *Bcboa13*, sept homocaryons (absence totale du gène sauvage) ayant intégré la cassette de résistance au locus ciblé ont été obtenus suite à deux clonages monospores. Une analyse par *Southern blot* n'a permis de confirmer l'insertion de la cassette de résistance en une unique copie que pour un des trois mutants analysés (*ΔBcboa13* 4.6.2). Ce mutant a donc été utilisé pour les différents tests effectués. Pour confirmer l'observation d'un phénotype chez ce dernier, une souche complémentée (*ΔBcboa13*) a été générée en ré-introduisant le gène *Bcboa13* sous le contrôle de son promoteur natif au locus du gène codant la nitrate réductase (*Bcniad*). Pour l'inactivation de *Bcboa15*, nous avons

procédé à un évènement de transformation qui a permis l'obtention de trois homocaryons indépendants suite à trois clonages monospore. En revanche, l'analyse par Southern blot n'a pas fonctionné pour la vérification des homocaryons *ΔBcboa15* testés, probablement en raison d'un fragment marqué de trop grande taille. Une nouvelle expérimentation avec une sonde différente ou avec une autre enzyme s'avère donc nécessaire afin de confirmer une unique insertion. A l'inverse de *Bcboa13* et *Bcboa15*, la délétion de *Bcboa1* s'est avérée infructueuse dans la souche sauvage B05.10. Nous avons donc décidé de déléter le gène dans le mutant *ΔBcku70* qui est déficient dans le système de recombinaison non-homologue et présente un taux de recombinaison homologue accru (Choquer *et al.*, 2008). De plus, il a été démontré que KU70 intervenait dans l'intégrité des télomères et dans le mécanisme de TPE (Telomere Position Effect) qui inhibe l'expression des gènes proches des télomères (Boulton et Jackson, 1998). Etant donné que *Bcboa1* est le premier gène prédit du chromosome BCIN01, nous avons émis l'hypothèse que la transformation serait plus efficace chez le *ΔBcku70*, dont l'ADN au niveau des télomères est probablement plus relâché donc plus accessible. Cette stratégie s'est avérée fructueuse même si seulement trois homocaryons de *ΔBcboa1* ont pu être obtenus à l'issue de trois évènements de transformation. Ces derniers présentent bien une unique copie insérée au locus d'intérêt (vérification par *Southern blot* ; **Fig. II.S2**). La complémentation des *ΔBcboa1* et *ΔBcboa15* n'a pas été entreprise.

2.3. BcBoa13 est le régulateur majeur du cluster BOA

Pour étudier l'influence de la délétion de *Bcboa13*, *Bcboa1* et *Bcboa15* au niveau transcriptionnel, nous avons effectué une analyse de l'expression de certains gènes *Bcboa* par RT-qPCR chez les mutants ainsi que chez les souches réceptrices (B05.10 ou *ΔBcku70*). Les résultats (**Fig. II.5**) démontrent que chez la souche sauvage, *Bcboa6*, *Bcboa9* et *Bcboa13* ont une expression qui varie entre 15 et 20 % par rapport à celle du gène de l'actine *BcactA*. *Bcboa1*, *Bcboa12*, *Bcboa17* et Bcin01g00170 présentent une expression correspondant respectivement à 60, 27, 74 et 83 % par rapport à celle de *BcactA*. A l'inverse, *Bcboa15*, *Bcboa16* et Bcin01g00180 ne sont pas ou peu exprimés avec une expression de 0,1 à 1 % de celle de *BcactA*. Chez le *ΔBcku70*, l'expression des différents gènes étudiés est similaire à B05.10 (**Fig. II.5B**). En revanche, il apparait de façon flagrante

que la délétion de *Bcboa13* entraîne une diminution importante de l'expression des gènes *Bcboa1*, *Bcboa6*, *Bcboa9* et *Bcboa12* qui sont respectivement sous-exprimés par un facteur d'environ 670, 18, 34 et 10 par rapport à la souche sauvage. En ce qui concerne *Bcboa15*, même si aucune différence n'a pu être observée entre le $\Delta Bcboa13$ et la souche sauvage, il n'est pas possible de conclure en raison de la faible expression initiale de ce gène. A l'inverse de la délétion de *Bcboa13*, les délétions de *Bcboa1* et *Bcboa15* ne semblent pas affecter de façon significative l'expression des gènes *Bcboa* étudiés (**Fig. II.5B et C**). D'après ces résultats, il semblerait que seul BcBoa13 ait un rôle de régulateur sur le cluster BOA. Afin de valider ce résultat, la complémentation du mutant $\Delta Bcboa13$ a été réalisée en intégrant le gène sauvage sous le contrôle de son promoteur natif au locus *Bcniad* (**Fig. II.S2**). Chez le transformant $\Delta Bcboa13$ obtenu, l'expression des gènes *Bcboa* étudiés n'est pas restaurée par rapport au mutant (données non présentées). Des cassettes de complémentation alternatives contenant *Bcboa13* fusionné à l'ORF de la GFP sous le contrôle de du promoteur natif de *BcBoa13* ou du promoteur constitutif *PoliC* sont actuellement utilisées pour compléter $\Delta Bcboa13$ (**Fig. II.S2**).

Une façon commune de déterminer les limites d'un cluster du métabolisme secondaire consiste à étudier la co-régulation des gènes chez les mutants délétés dans le/les gènes de ce cluster putativement impliqués dans sa régulation spécifique. Ainsi, l'analyse de l'expression des gènes présents vers la fin du cluster prédit BOA, c'est-à-dire *Bcboa16*, *Bcboa17*, Bcin01g00170 et Bcin01g00180 est particulièrement intéressante pour déterminer ses limites. Aucune différence significative de l'expression de ces gènes n'a pu être observée chez le $\Delta Bcboa13$. L'ensemble des résultats semble donc indiquer que le cluster BOA serait composé des gènes *Bcboa1-Bcboa13* comme suggéré précédemment par l'étude des profils d'expression des gènes du cluster dans différentes conditions (**Fig. II.2**).

Pour définir si BcBoa13 pourrait avoir un rôle dans la régulation d'autres clusters, nous avons analysé l'expression de deux autres gènes impliqués dans le métabolisme secondaire chez *B. cinerea*. Le premier est *Bcbot2* qui code la sesquiterpène synthase impliquée dans la production de la toxine BOT. Le second gène dont l'expression a été étudiée est *Bcpcs7* (**Cf. Chapitre III**). Les résultats de l'analyse de l'expression de ces gènes (**Fig. II.5D**) montrent que chez la souche sauvage, *Bcbot2* et

Bcpks7 atteignent des niveaux d'expression d'environ 150 et 10 % respectivement par rapport à l'actine. Chez $\Delta Bcboa13$, ces niveaux d'expression sont comparables à ceux de la souche sauvage, ce qui sous-entend que leur activation n'est pas dépendante de BcBoa13.

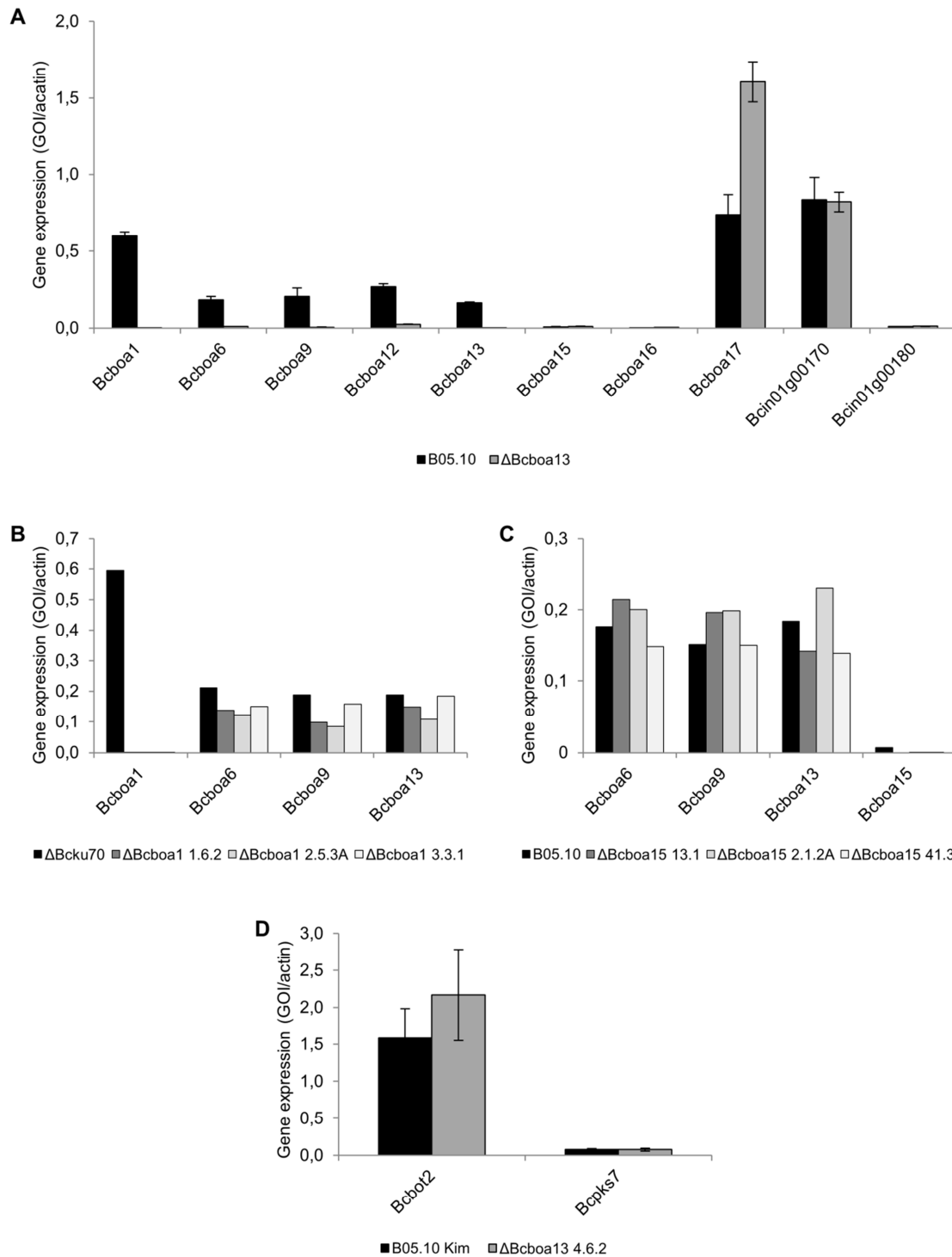


Fig. II.5. BcBoa13 régule les gènes *Bcboa*.

Des suspensions de conidies ont été préparées pour les différentes souches et 300 μ l de ces suspensions ont été étalés sur une boîte contenant du milieu solide jus de raisin (pH ajusté à 4) recouvert de cellophane. La culture des échantillons a duré 48 h à 23°C avec une alternance de 14 h d'obscurité et 10 h de lumière. L'expression des gènes indiqués a été analysée par RT-qPCR. Tous les résultats ont été obtenus selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak et Schmittgen, 2001). Pour A et D, les résultats ont été obtenus à partir de trois réplicats biologiques et d'au moins deux réplicats techniques. La moyenne et les écarts types sont représentés. Pour B et C, les résultats présentés sont issus d'un réplicat biologique.

2.4. Les délétions de *Bcboa13*, *Bcboa1* et *Bcboa15* n'affectent pas l'agressivité de B05.10

Nous avons voulu tester l'effet de la délétion de *Bcboa13*, *Bcboa1* ou de *Bcboa15* sur le pouvoir pathogène de B05.10. Pour cela, nous avons procédé à des tests d'infection sur plants de haricots. Les résultats de la **Fig. II.6** montrent que l'absence de chacun de ces gènes n'entraîne aucune différence d'agressivité entre le mutant et la souche réceptrice (B05.10 ou $\Delta Bcku70$). De plus, l'inactivation de *Bcboa13* n'a mené à l'observation d'aucune différence morphologique en comparaison avec la souche sauvage sur divers milieux (pauvre, riche et jus de raisin) (**Fig. II.7**). Le $\Delta Bcboa13$ ne présente pas de défaut de conidiation et produit de la même façon que le WT des sclérotes à l'obscurité. Des tests de croissance devront être réalisés pour compléter ces résultats.

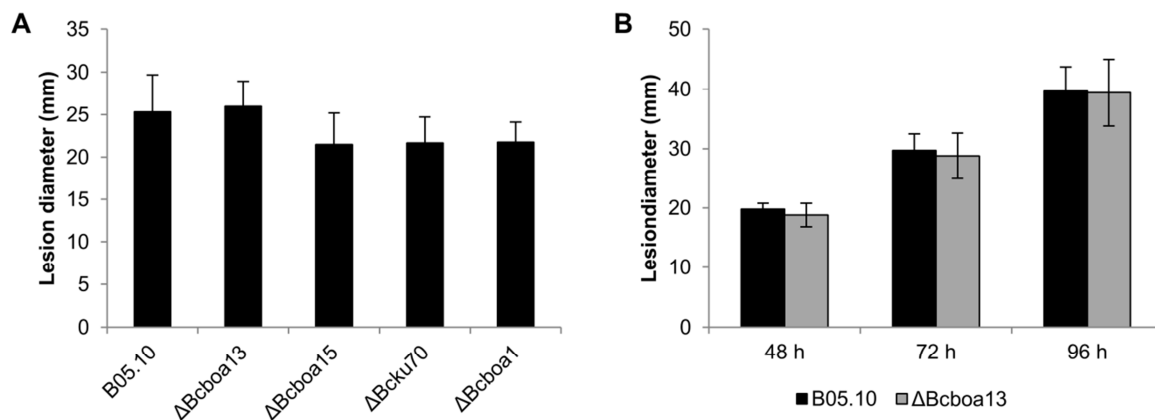


Fig. II.6. La délétion de *Bcboa13*, *Bcboa1* et *Bcboa15* n'affecte pas l'agressivité de B05.10.

Des feuilles détachées de haricot (*Phaseolus vulgaris*) ont été inoculées avec des plugs de jeune mycélium (3 j sur ML). La moyenne du diamètre des lésions a été calculé 72 hpi (A) ou 48, 72 et 96 hpi (B). Les résultats en A ont été déterminés à partir de quatre lésions issues d'un nombre variable de mutants indépendants (mutants 2.5.3A et 3.3.1 pour $\Delta Bcboa1$, 13.1 et 41.3 pour $\Delta Bcboa15$, du $\Delta Bcboa13$ 4.6.2 et du $\Delta Bcku70$ a2). Les résultats pour $\Delta Bcboa1$ ont été complétés par la mise en place d'un test dans lequel 8 infections ont été réalisées pour chacun des 3 mutants (1.1.2, 2.5.3 et 3.3.1). Ces résultats ne sont pas présentés ici car la souche B05.10 (et non pas la souche réceptrice $\Delta Bcku70$) a été utilisée comme témoin. Les résultats obtenus sont similaires à ceux présentés ici. Les résultats présentés en B ont été calculés à partir de dix infections provoquées par la souche sauvage ou le $\Delta Bcboa13$ 4.6.2. Les barres d'erreur représentent les écarts types.

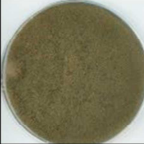
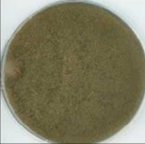
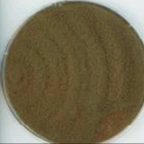


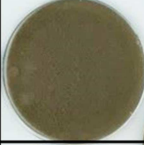

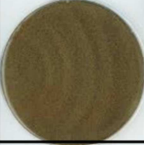

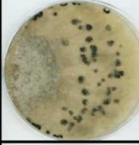


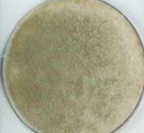


Strain \ Medium	ML	MM II	Grapejuice	ML	ML
Light condition	LD	LD	LD	LL	DD
B05.10					
$\Delta Bcboa13$ 4.6.2					
<i>OE:Bcboa13:gfp</i> T2.4					

Fig. II.7. La délétion de *Bcboa13* n'entraîne pas de modification du phénotype sauvage tandis que sa surexpression affecte la croissance et l'aspect du mycélium.

Des plugs de jeune mycélium (3 jours) ont été ensemencés sur les milieux indiqués. Les souches ont ensuite été cultivées à 21°C avec les conditions lumineuses suivantes : LD (14 h d'obscurité/10 h de lumière), LL (lumière continue) ou DD (obscurité continue). Les photos présentées ont été prises 14 jours après inoculation. L : light ; D : darkness.

3. Caractérisation de BcBoa13

3.1. BcBoa13 est localisée dans le noyau

Afin de vérifier que le FT putatif BcBoa13 est une protéine nucléaire, nous avons généré une cassette codant une protéine de fusion BcBoa13:GFP sous le contrôle du promoteur constitutif *pOliC*. Dans une première série d'expérimentations, nous avons intégré cette cassette dans la souche sauvage B05.10 afin de localiser la protéine de fusion. Les transformants résultants sont nommés *OE:Bcboa13:gfp*. Comme le montre la **Fig. II.8**, la protéine semble bien localisée au niveau du noyau dans les conditions testées. Néanmoins, l'utilisation de la microscopie confocale nous a permis de remarquer que le signal de fluorescence n'est pas homogène au sein du noyau. Effectivement, des points plus intenses que nous appellerons par la suite « foci » sont observables et alternent avec des zones qui ne fluorescent pas ou peu. Nous avons observé le même phénomène lors de la fusion de la GFP au FT BcBot6 et ce indépendamment de la position de la GFP (N terminale ou C terminale). En plus de cette localisation particulière, nous avons noté que le transformant *OE:Bcboa13:gfp* présentait un phénotype différent de celui de la souche sauvage et du $\Delta Bcboa13$. La croissance de ce mutant est

en effet retardée, il présente une coloration plus foncée que B05.10 et ne produit que très peu de conidies (**Fig. II.7**). Ce phénomène pourrait être lié à une sur-production de BOA et de botcinines qui pourraient s'avérer toxiques pour le champignon quand elles sont présentes en trop grande concentration. Les gènes *Bcboa6* et *Bcboa9* semblent sur-exprimés dans cette souche (**Fig. II.9**). Pour confirmer que le phénotype est lié à la surproduction de BOA, nous avons intégré la cassette de sur-expression de *Bcboa13* (*pOliC:Bcboa13:gfp*) chez le $\Delta Bcboa6$ qui ne produit pas de BOA ni de botcinines (Dalmais *et al.*, 2011). Le transformant correspondant ($\Delta Bcboa6$ *OE:Bcboa13:gfp*) présente un phénotype identique à celui de la souche sauvage et donc différent du *OE:Bcboa13:gfp*. La surexpression de *Bcboa13* chez ce transformant $\Delta Bcboa6$ *OE:Bcboa13:gfp* entraîne une surexpression de *Bcboa9* encore plus importante que celle observée chez le *OE:Bcboa13:gfp* (**Fig. II.9**). Il peut paraître surprenant que nous observions une faible expression pour *Bcboa6* chez $\Delta Bcboa6$ *OE:Bcboa13:gfp*. Ceci s'explique par le fait que seule la première partie du gène *Bcboa6* a été remplacée par la cassette de résistance (Dalmais *et al.*, 2011) et qu'il subsiste la partie 3' sur laquelle ont été conçues les amorces. L'ensemble de ces résultats étaye notre hypothèse de toxicité puisque la surexpression du FT putatif chez une souche ne produisant pas de BOA n'entraîne pas de modification du phénotype.

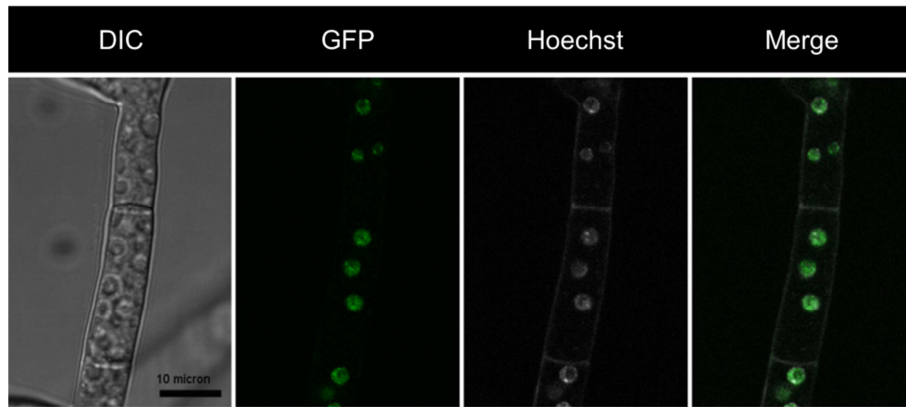


Fig. II.8. BcBoa13 est localisé au niveau du noyau.

La localisation de BcBoa13 a été déterminée en fusionnant l'ORF de *Bcboa13* avec l'ORF de la GFP. Le transformant (*OE:Bcboa13:gfp*) a été cultivé directement sur lamelle dans des conditions humides dans une boîte en plastique pendant une nuit à l'obscurité puis 4 h à la lumière blanche. Le marquage des noyaux a été réalisé au Hoechst.

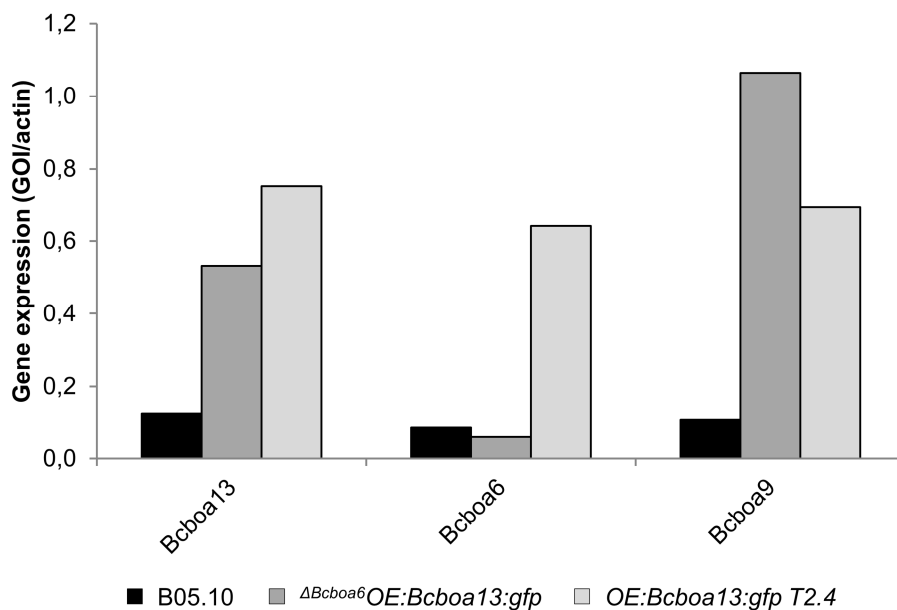


Fig. II.9. La surexpression de *Bcboa13* entraîne une surexpression des gènes codant les enzymes clés BcBoa6 et BcBoa9.

Des plugs de jeune mycélium ont été utilisés pour ensemercer des boîtes de Pétri contenant du milieu jus de raisin solide. Après 96 h de culture en enceinte climatique à 23°C avec une alternance de 14 h d'obscurité et 10 h de lumière blanche, le mycélium a été récolté et utilisé pour la préparation des échantillons. L'expression des gènes indiqués a été analysé par RT-qPCR à partir d'un unique réplicat biologique selon la méthode du $2^{-\Delta Ct}$ (Livak et Schmittgen, 2001) en prenant le gène *BcactA* comme référence.

3.2. Analyse de l'interaction *in vivo* entre BcBoa13 et les promoteurs des gènes *Bcboa*

Pour aller plus loin dans la caractérisation de BcBoa13, nous avons cherché à (i) identifier un motif de fixation candidat et (ii) à démontrer que la région des promoteurs *pBcboa* contenant ce motif est impliquée dans l'activation des gènes.

3.2.1. Recherche du motif de fixation de BcBoa13

Dans le but d'identifier un motif de fixation candidat pour BcBoa13, nous avons procédé à une analyse *in silico*. Pour cela, nous avons utilisé l'outil en ligne MEME (Bailey *et al.*, 1994). Ce dernier permet d'identifier des motifs conservés parmi un set de séquences. Les résultats présentés dans cette étude suggèrent que le cluster BOA serait finalement restreint aux gènes *Bcboa1-Bcboa13*. Afin de déterminer un motif de fixation pour le FT BcBoa13, nous avons utilisé trois sets de données. Il s'agit du promoteur des gènes (1) *Bcboa1* à *Bcboa13*, (2) *Bcboa1* à *Bcboa12* et (3) *Bcboa1* à *Bcboa12* ainsi que *Ssboa1* à *Ssboa12* (gènes *boa1* à *boa12* chez *Sclerotinia sclerotiorum*). L'utilisation du deuxième set (similaire au premier mais sans le *pBcboa13*) s'explique par le fait qu'il est possible que le FT putatif ne s'autorégule pas. Ainsi, avec l'utilisation des sets 1 et 2, nous étudions les deux possibilités. De plus, nous avons utilisé dans le set 3, les promoteurs des gènes *boa1-boa12* à la fois chez *B. cinerea* et *S. sclerotiorum*. Effectivement, si ces gènes sont toujours fonctionnels chez *S. sclerotiorum*, il est très probable que la séquence de fixation du FT spécifique au cluster soit hautement conservée. Pour notre analyse avec MEME, nous avons fait varier les paramètres en demandant au programme pour chaque set de séquences d'identifier un motif qui soit présent (i) 0 ou 1 fois par promoteur, (ii) forcément 1 fois dans chaque promoteur ou (iii) un nombre non défini de fois dans chaque promoteur. A partir des résultats obtenus (**Fig. II.10A**), nous avons pu déterminer plusieurs motifs qui présentent une structure commune. On y discerne un triplet inversé CGG/CCG espacé par trois nucléotides. De façon intéressante, les différents motifs identifiés correspondent à une position conservée sur les promoteurs de *Bcboa6* et *Bcboa9* (nommés respectivement *pBcboa6* et *pBcboa9*). Ces positions sont représentées sur la **Fig. II.10B**. Un second motif est détecté dans le *pBcboa9* lorsque le set 3 est utilisé avec le paramètre de recherche ANY X. Pour la suite de notre étude, nous avons nommé le motif candidat des *pBcboa6* et *pBcboa9* : motif A*. Ce dernier est particulièrement intéressant puisqu'il est

généralement admis qu'un triplet répété composé de G/C est caractéristique des FTs de type $Zn(II)_2Cys_6$ (MacPherson *et al.*, 2006). Or, d'après les prédictions, BcBoa13 fait partie de cette famille de FTs.

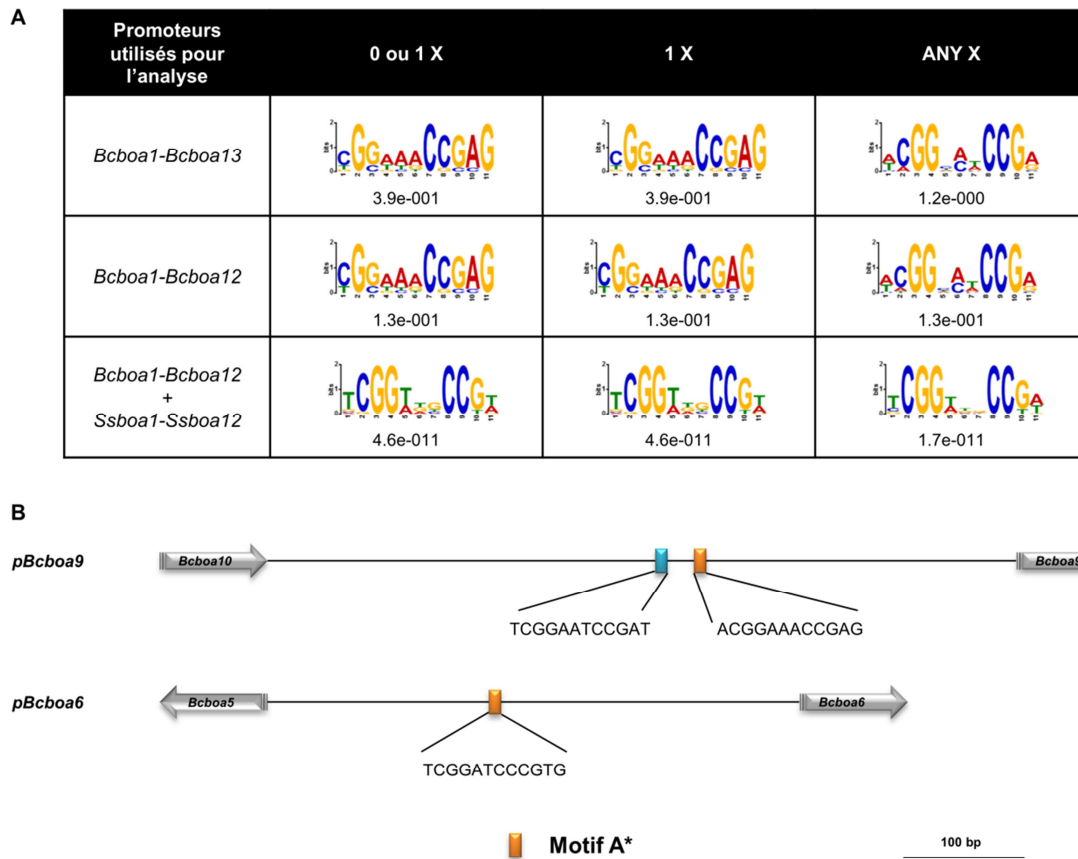


Fig. II.10. Définition de motifs candidats pour la fixation de BcBoa13.

A. Pour identifier un motif de fixation de BcBoa13, différents sets de promoteurs ont été utilisés avec l'outil MEME (<http://alternate.meme-suite.org/tools/meme>; Bailey et Elkan, 1994). Les E-values sont indiquées sous les motifs prédits. **B.** Les différents motifs cartographiés au niveau des *pBcboa6* et *pBcboa9* ont permis de mettre en évidence une position majoritaire nommé motif A* (rectangle orange) au sein de chacun de ces promoteurs. Le second motif identifié au sein du *pBcboa9* est représenté par le rectangle bleu.

3.2.2. Validation de l'importance de la région du *pBchoa9* contenant le motif A* pour l'activation du gène

Pour démontrer que le motif candidat identifié est effectivement impliqué dans l'activation des gènes *Bchoa*, nous avons mis en place un système rapporteur dans lequel les *pBchoa6* et *pBchoa9* ont été fusionnés en amont de l'ORF de la GFP. Ainsi, la fixation d'un FT activateur *in vivo* au niveau des *pBchoa6* et *pBchoa9* devrait mener à l'observation de fluorescence au microscope.

Pour le clonage des promoteurs utilisés pour notre système rapporteur, nous avons décidé de générer différentes constructions du *pBchoa9* en prenant le promoteur entier ou des versions tronquées comprenant ou pas le motif candidat. Cette stratégie permet ainsi d'identifier les parties du promoteur qui sont importantes pour l'activation du gène. Les différentes constructions sont présentées dans la **Fig. II.11A**. Après avoir transformée la souche sauvage B05.10 avec ces différentes constructions, nous avons observé les transformants au microscope à fluorescence. De plus, des transformants témoins ont été générés en utilisant la construction comprenant le promoteur constitutif *PoliC* positionné en amont de l'ORF de la GFP. Pour les mutants correspondants, une fluorescence relativement importante a pu être observée au microscope (**Fig. II.11B**). La construction générée à partir du *pBchoa9* entier (*pBchoa9 A*) entraîne un signal de fluorescence encore plus intense que celui observé avec le *PoliC*. De façon intéressante, les transformants issus de la construction du *pBchoa9 B* (qui a été tronqué en 5' mais qui comporte toujours la répétition du motif candidat A*) présente toujours une fluorescence, même si cette dernière semble moins importante que *pBchoa9 A*. Finalement, lorsque le promoteur est tronqué encore un peu plus et que le motif A* est cette fois absent de la construction, aucune fluorescence ne peut être détectée parmi les transformants. Ces résultats semblent ainsi indiquer que la région du *pBchoa9* au sein de laquelle nous avons identifié la répétition du motif candidat A* semble nécessaire pour l'activation du gène en aval, *i.e.* celui de la *gfp* dans le cadre de notre système rapporteur.

Ces résultats sont intéressants mais sont tout de même à nuancer. Effectivement, nous avons rencontré des problèmes lors de la vérification des transformants par des techniques moléculaires. Il nous a dans certains cas été impossible de vérifier l'insertion au locus ciblé. De plus, nous nous

sommes rendus compte que la partie en principe non-intégrée du vecteur qui a servi au clonage était finalement elle aussi présente au sein du génome des transformants. Nous ne sommes donc pas certains des différents évènements de recombinaisons qui ont pu avoir lieu. Enfin, nous suspectons que la construction d'intérêt ait pu être intégrée en plusieurs copies. Il est par conséquent délicat de comparer les transformants issus des différentes constructions d'autant plus que le système rapporteur utilisé présente un intérêt quantitatif.

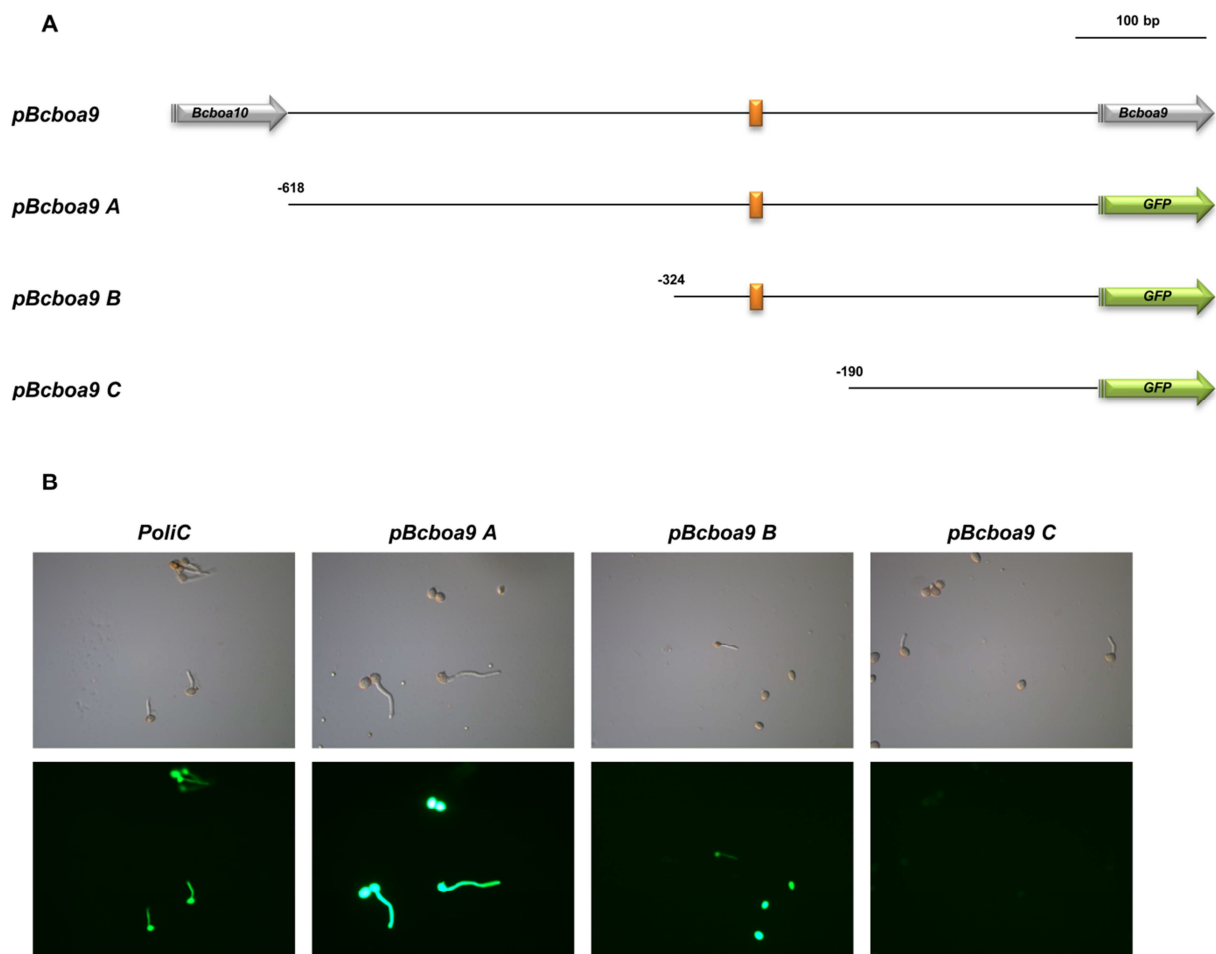


Fig. II.11. La partie du *pBcboa9* contenant le motif A* semble nécessaire pour l'activation du gène.

A. Le promoteur *pBcboa9* a été cloné soit dans sa totalité (*pBcboa9 A*) ou dans des versions tronquées comprenant (*pBcboa9 B*) ou non (*pBcboa9 C*) le motif candidat A* (rectangle orange) pour la fixation de BcBoa13. **B.** Les différents transformants ont été observés au microscope à fluorescence après 6 h de culture dans du jus de raisin liquide.

3.2.3. Analyse de l'interaction entre BcBoa13 et certains promoteurs putatifs cibles par simple hybride

Nous avons démontré ci-dessus que BcBoa13 est impliqué dans la régulation des gènes *Bcboa*. De plus, le système rapporteur utilisé suggère que le motif de fixation candidat A* de BcBoa13 (identifié *in silico*) au niveau du *pBcboa9* était dans une région qui semble importante pour l'activation du gène sous son contrôle. Pour déterminer si BcBoa13 interagit de façon directe avec ses promoteurs cibles (et particulièrement celui de *Bcboa9* au niveau du motif A*), nous avons utilisé la technique du simple hybride. Dans le cadre de cette approche, nous avons procédé en plusieurs étapes.

3.2.3.1. Clonage des promoteurs d'intérêt

Sur la base des résultats présentés ci-dessus, nous avons décidé de générer plusieurs constructions. Nous avons ainsi cloné le promoteur *pBcboa6* dans son intégralité. Nous avons en plus choisi de décortiquer de façon approfondie le *pBcboa9*. Nous l'avons donc cloné dans son intégralité ainsi qu'en diverses troncations comprenant ou le motif A*. De plus, nous avons décidé de construire des promoteurs comprenant uniquement des versions du motif A* (soit la séquence du motif sur *pBcboa6* soit l'une ou l'autre du *pBcboa9*) ainsi que du second motif du *pBcboa9* et de les répéter trois fois. Ce type de construction a déjà permis dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Jan van Kan (Wageningen, Pays-Bas) d'identifier un FT par criblage de notre banque simple hybride (Zhang *et al.*, 2015). La **Fig. II.12** montre les différentes constructions générées. Finalement, pour vérifier si BcBoa13 est capable de se fixer sur son propre promoteur, nous avons généré des constructions composées de régions chevauchantes du *pBcboa13* (**Fig. II.13**). Les constructions ont été fusionnées en amont du gène rapporteur HIS3, et intégrées dans le génome de la souche Y187 de *S. cerevisiae*.

3.2.3.2. Clonage de BcBoa13

Pour le clonage d'un FT dans le cadre de l'utilisation en simple hybride, deux grandes possibilités existent. Il est ainsi possible de cloner (i) l'intégralité de l'ORF du FT ou (ii) uniquement la région comprenant le domaine de fixation à l'ADN. N'ayant que peu de recul par rapport aux différences qui existent entre ces deux options notamment en termes de sensibilité, nous avons décidé de générer les deux constructions pour le clonage de *Bcboa13* (Cf. **Matériels et méthodes**).

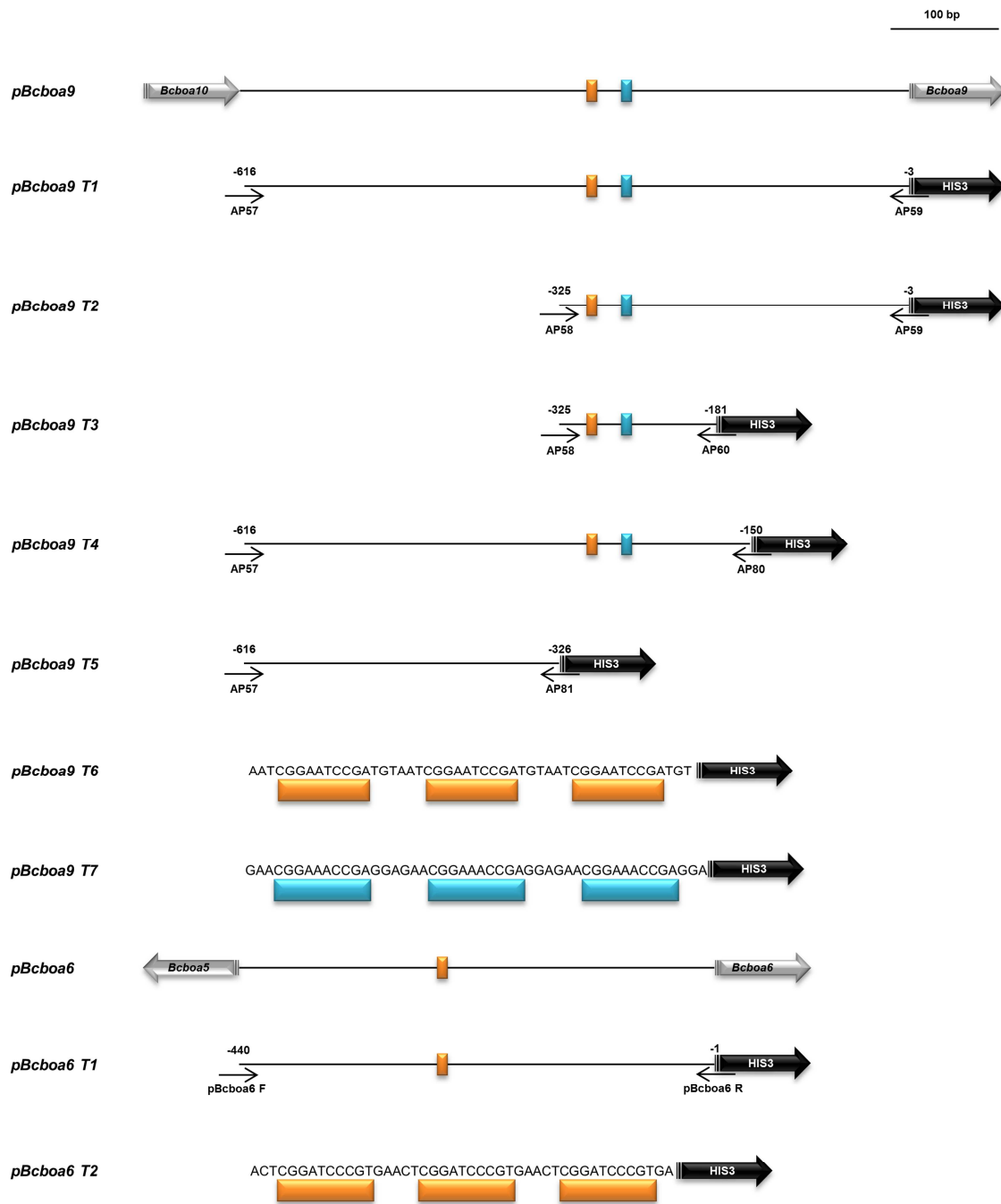


Fig. II.12. Constructions générées pour les *pBcboa6* et *pBcboa9* pour l'approche par simple hybride.

Le *pBcboa9* a été utilisé pour générer plusieurs constructions comprenant ou pas le motif candidat A* (rectangle orange) ainsi que le second motif identifié au niveau du *pBcboa9*. Les constructions amplifiées ont par la suite été fusionnées en amont du gène rapporteur *HIS3* utilisé pour l'approche simple hybride. Les amorces utilisées sont représentées.

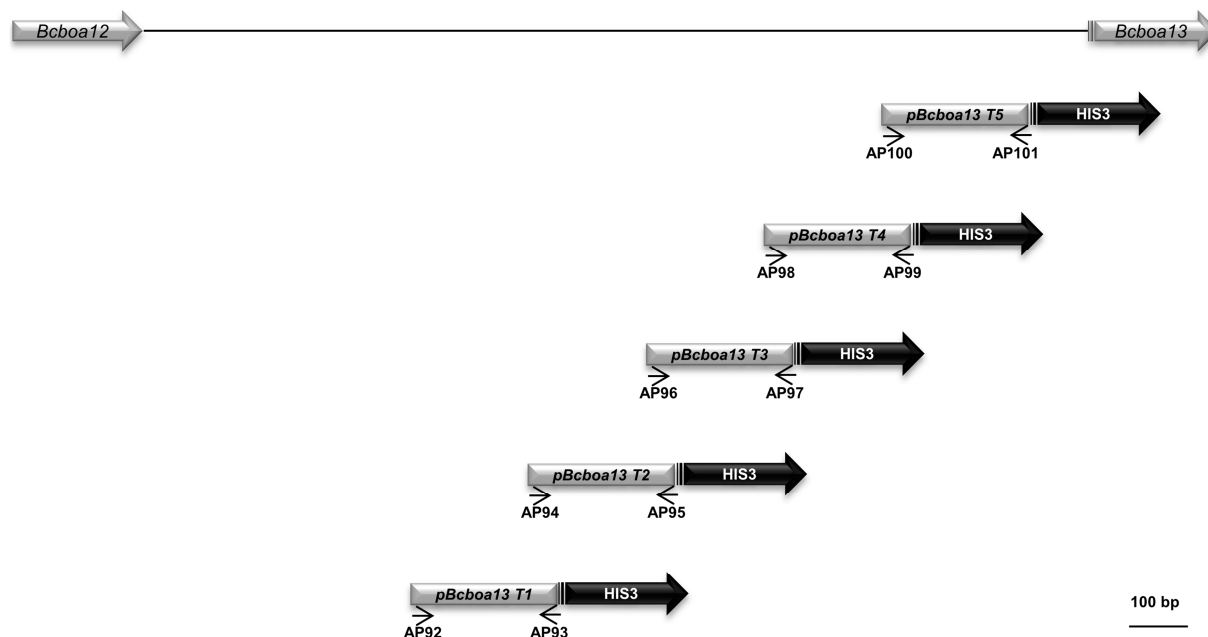


Fig. II.13. Constructions générées pour le *pBcboa13* pour l'approche par simple hybride. Des troncations du *pBcboa13* ont été amplifiées et été fusionnées en amont du gène rapporteur *HIS3* pour l'approche simple hybride. Les amorces utilisées sont représentées.

3.2.4. Test d'interaction directe entre *BcBoa13* avec les différentes constructions d'ADN

Pour tester l'interaction suspectée entre les protéines et les promoteurs étudiés, nous avons procédé à des tests d'interaction directe par simple hybride, c'est à dire en transformant les levures Y187 contenant les régions promotrices d'intérêt (Cf. **partie 3.2.3.1**) avec les constructions contenant les FTs (Cf. **partie 3.2.3.2**). Malheureusement, aucune des combinaisons testées ne nous a permis de prouver une régulation directe (Cf. **résumé en Tableau II.3**).

Tableau II.3. Résumé des interactions directes testées en simple hybride.

		BcBoa13 (BD)	BcBoa13 (Full)
<i>pBcboa9</i>	T1	n. i. d.	n. i. d.
	T2	n. i. d.	n. i. d.
	T3	n. i. d.	n. i. d.
	T4	n. i. d.	n. i. d.
	T5	n. i. d.	n. i. d.
	T6	n. i. d.	n. i. d.
	T7	n. i. d.	n. i. d.
<i>pBcboa6</i>	T1	n. i. d.	n. i. d.
	T2	n. i. d.	n. i. d.
<i>pBcboa13</i>	T1	n. i. d.	n. i. d.
	T2	n. i. d.	n. i. d.
	T3	n. i. d.	n. i. d.
	T4	n. i. d.	n. i. d.
	T5	n. i. d.	n. i. d.

n. i. d. : no interaction detected

4. Etude de l'interaction putative entre BcBoa13 et BcBoa1

L'analyse par simple hybride mise en place lors de cette étude n'a pas permis de montrer d'interaction directe entre BcBoa13 et les *pBcboa6* et *pBcboa9* même si l'expression de ces gènes est dépendante du FT putatif. Une de nos hypothèses est que pour jouer son rôle de régulateur, BcBoa13 nécessiterait un cofacteur qui interviendrait dans une interaction protéine-protéine et que BcBoa1 pourrait être ce cofacteur. Pour tester cette hypothèse, nous avons mis en place deux stratégies. La première fait intervenir le double hybride. Nous avons décidé de tenter cette approche car les vecteurs déjà clonés dans le cadre de l'approche par simple hybride étaient compatibles avec cette nouvelle technique. Il s'agissait ensuite de cloner les gènes étudiés (*Bcboa1* et *Bcboa13*) fusionnés avec le domaine de liaison de GAL4 pour pouvoir mettre en place le test d'interaction direct. La souche de levure utilisée pour cette expérimentation est ensuite directement transformée avec les deux vecteurs complémentaires (technique de co-transformation). Des résultats préliminaires ont pu être obtenus. Néanmoins, ces derniers étaient trop hétérogènes pour être validés et ne sont pas avérés répétables. En effet, certains clones se comportaient différemment pour une même transformation. De nouveaux essais sont actuellement en cours, notamment en utilisant la technique du mating (croisement de deux souches complémentaires contenant chacune un des vecteurs) en complément de celle de la co-

transformation. Alternativement, une approche par BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) est actuellement mise en place pour étudier l'interaction putative entre BcBoa13 et BcBoa1. Cette technique permet l'étude *in vivo* de l'interaction et présente donc une alternative intéressante au système hétérologue mis en place dans le cadre du double hybride.

5. Identification des régulateurs transcriptionnels agissant en amont de BcBot6 et BcBoa13

L'acide botcinique et le botrydial sont les deux toxines non-hôte spécifiques majoritairement produites par *B. cinerea* (Collado et Viaud, 2016). Dans le cadre de ma thèse, les deux FTs putatifs BcBot6 et BcBoa13 ont été caractérisés (Porquier *et al.*, 2016; ce chapitre) levant ainsi les verrous de la régulation spécifique des deux clusters. Des données quant à une régulation par des acteurs globaux sont déjà disponibles (Viaud *et al.*, 2016) mais aucune régulation directe n'a pour le moment été établie entre ces protéines et les gènes qu'elles régulent. Il s'agit donc maintenant de déterminer quels régulateurs transcriptionnels sont directement responsables de l'activation des gènes menant à la production des deux toxines. Ainsi, dans le cadre de cette étude, nous avons cherché à identifier des régulateurs ayant putativement un contrôle sur l'expression de BcBot6 ou BcBoa13.

5.1. Mise en place d'une approche par simple hybride

Pour identifier des FTs putatifs impliqués dans la régulation de *Bcbot6* ou *Bcboa13*, nous avons mis en place une approche par simple hybride. Nous avons choisi d'adopter une approche sans *a priori*. Nous avons pour cela cloné le promoteur de chacun de ces deux gènes en excluant les 100 pb en amont du codon d'initiation et en générant 5 constructions de 250 pb avec 50 pb de recouvrement pour *pBcboa13* (Fig. II.13) et seulement 4 de ces constructions pour *pBcbot6* (Fig. II.14) en raison d'un problème de clonage pour la construction la plus en 5' à cause du fort pourcentage en A+T. Les constructions ont été fusionnées en amont du gène rapporteur HIS3, et intégrées dans le génome de la souche Y187 de *S. cerevisiae*.

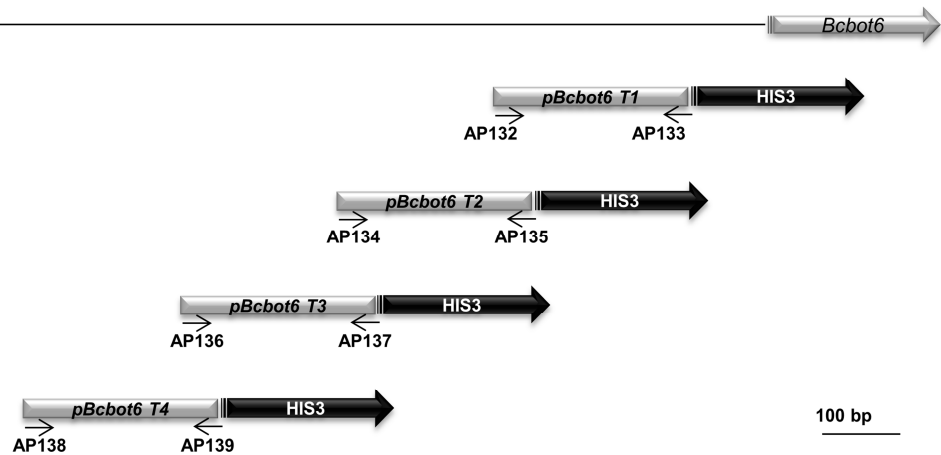


Fig. II.14. Constructions générées pour le *pBcbot6* pour l'approche par simple hybride. Des troncations du *pBcbot6* ont été amplifiées et été fusionnées en amont du gène rapporteur *HIS3* pour l'approche simple hybride. Les amorces utilisées sont représentées.

5.2. Identification d'un régulateur candidat des clusters BOT et BOA

Par la suite, les différentes constructions générées ont été utilisées pour cribler la banque de FTs de *B. cinerea* dont nous disposons au sein de l'équipe (Simon *et al.*, 2013). Après plusieurs repiquages sur milieu sélectif, trois constructions ont permis d'isoler des clones. Il s'agit des *pBcbot6* *T2* et *T3* et de la *pBchoa13* *T3*. Le séquençage de ces différents clones a permis de révéler l'identité des FTs clonés. Les résultats sont présentés dans le **Tableau II.4**. Afin de confirmer les interactions mises en évidence, nous avons extrait les plasmides contenant les FTs clonés pour la création de la banque et nous avons reconduit une analyse par simple hybride mais cette fois dans le cadre d'une interaction directe (FT d'intérêt avec promoteur étudié). Ces expérimentations ont uniquement permis de confirmer l'interaction entre le FT putatif de type bZIP codé par Bcin08g02710 et la version *T2* du *pBcbot6*. De façon intéressante, ce FT putatif avait déjà été identifié lors du crible de la banque de FTs de *B. cinerea* avec la construction *pBchoa9* *T4*. Néanmoins, l'interaction n'avait pas pu être confirmée dans le cadre d'un test d'interaction directe. D'après l'ensemble de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que Bcin08g02710 pourrait être un régulateur direct à la fois du cluster BOT *via* son interaction avec le *pBcbot6* et du cluster BOA *via* une interaction possible notamment avec le *pBchoa9*.

Tableau II.4. Résultats du crible simple hybride avec les *pBcbot6* et *pBcboa13*.

Promoteur	Identité	BofuT4	Nom	Domaine	Oligos	Taille	Interactions précédemment identifiées ?
<i>pBcbot6</i> T3	Bcin08g04290	BofuT4_P084850.1	AmdA?	C ₂ H ₂	AS741/742	342	non
	Bcin01g06200	BofuT4_P046240.1	BcHox7	Homeobox	AS823/824	369	non
	Bcin05g02960	BofuT4_P042280.1		Zn ₂ (II)Cys ₆	AS379/380	414	oui, faux positif
	Bcin02g07400	BofuT4_P091830.1	BcWcl1	GATA	AS854/AS861	399	non
		BofuT4_P091840.1					
<i>pBcbot6</i> T2	Bcin08g02710	BofuT4_P131140.1		bZIP	AS801/802	368	<i>pBcboa9</i> T4
<i>pBcboa13</i> T3	Bcin05g02960	BofuT4_P042280.1		Zn ₂ (II)Cys ₆	AS379/380	414	oui, faux positif

5.3. Inactivation de Bcin08g02710

Pour déterminer si Bcin08g02710 est une protéine qui est effectivement impliquée dans la régulation des clusters BOT et/ou BOA, nous avons entrepris l'inactivation du gène. Pour cela, l'ORF a été remplacée par le gène de résistance à l'hygromycine. Trois homocaryons indépendants ont pour le moment été obtenus. Dans la suite de cette étude, il conviendra de vérifier les mutants par Southern blot et de caractériser l'effet de la délétion du gène. Pour cela, nous envisageons à court terme d'évaluer l'expression des gènes *Bcbot/Bcboa* chez les transformants et de coupler ces résultats avec une évaluation de leur agressivité.

Discussion

Précédemment, le cluster BOA avait été partiellement caractérisé par Dalmais *et al.* (2011). Néanmoins, de nombreuses informations manquaient pour déterminer sa localisation au sein du génome mais aussi pour définir ses limites (et donc les gènes effectivement impliqués dans la production du métabolite). De plus, la régulation spécifique du cluster demeurait jusqu'ici inexplorée. Dans le cadre de cette étude, nous visions à caractériser plus en détails ce cluster. Grâce au nouvel assemblage et à la nouvelle annotation du génome de la souche B05.10, nous avons pu caractériser la région génomique du cluster BOA. De plus, l'inactivation de certains gènes putativement impliqués dans sa régulation spécifique a permis de mettre en évidence le rôle clé de BcBoa13 dans l'activation des gènes *Bcboa* mais aussi de redéfinir les limites du cluster. Ces nouvelles connaissances, en supplément de celles acquises lors de la caractérisation BcBot6, ouvre la voie vers de nouvelles études notamment en rapport avec la régulation des clusters BOT et BOA par des acteurs agissant en amont des FTs spécifiques.

1. Le cluster BOA est présent en un unique locus en position subtélomérique

Il est couramment observé que les clusters du métabolisme secondaire fongiques, notamment chez les *Aspergilli*, sont positionnés en position subtélomérique (Keller *et al.*, 2005). Grâce à la nouvelle annotation du génome de B05.10, nous avons pu localiser les clusters prédits chez cette souche. Parmi eux, seulement un quart est localisé au niveau des subtélomères (**Cf. partie 5 de l'Introduction générale**). Le cluster BOA fait partie de ces clusters et se situe à l'extrémité du chromosome 1 (BCIN01). De plus, nous savons maintenant que les gènes *Bcboa* sont présents en un unique locus mais qu'une région A+T-riche d'environ 16 kb sépare *Bcboa6* et *Bcboa7*. La longueur de cette région explique les échecs de sa caractérisation par le biais de méthodes moléculaires classiques (*e. g.* Tail-PCR). Le cluster BOA s'étend ainsi sur environ 55 kb.

2. Le cluster BOA est localisé au niveau d'une région génomique composée de régions A+T-riches résultant de copies d'ETs mutées par le RIP

La région génomique contenant le cluster BOA présente une alternance entre des portions d'ADN au ratio G+C/A+T équilibré comprenant les gènes, et des portions A+T-riches ne contenant pas de séquences codantes. Ce type de structure a déjà été observé au niveau de clusters du métabolisme secondaire fongique. C'est le cas notamment du cluster de biosynthèse des solanapyrones chez *Ascochyta rabiei* (Kim *et al.*, 2015) mais aussi du cluster BOT chez *B. cinerea* (Porquier *et al.*, 2016a). Dans ces deux études, il apparaît que les séquences A+T-riches proviennent de copies d'ETs mutées par le RIP. Dans le cadre de la présente étude, nous avons démontré qu'il en était de même pour le cluster BOA. Effectivement, des copies d'ETs sont présentes et sont très majoritairement localisées au niveau des séquences riches en A+T. Le calcul des indices de RIP a confirmé l'occurrence de ce mécanisme au niveau de ces régions. A l'inverse, les portions équilibrées en G+C/A+T n'ont pas subi de mutations entraînées par le RIP.

Nous pensons que les ETs présents au niveau du cluster peuvent avoir joué un rôle dans la structure du cluster ainsi que dans sa régulation. Malgré le fait que la plupart des ETs sont inactivés par différents mécanismes dont le RIP au sein des génomes fongiques (Amselem *et al.*, 2015), il est généralement admis qu'ils peuvent avoir un rôle clé dans la structure des génomes durant l'évolution (Kazazian, 2004; Ayarpadikannan et Kim, 2014). Notamment, les ETs sont des séquences répétées qui favorisent les réarrangements par recombinaison homologue. De plus, les ETs peuvent entraîner une régulation négative des gènes adjacents (Feschotte, 2008; Castanera *et al.*, 2016). A l'inverse, un cas a été mis en évidence chez *A. nidulans*, chez qui l'inactivation d'une région présente au niveau du cluster de la pénicilline et contenant des ETs entraîne une diminution de l'expression des gènes du cluster ainsi que de la production du métabolite (M. Shaaban *et al.*, 2010). Bien que les mécanismes n'aient pas été caractérisés, il est probable qu'ils impliquent une régulation chromatinienne. Il serait donc particulièrement intéressant de procéder à une étude similaire chez B05.10 et d'inactiver les portions d'ADN génomique contenant des ETs au sein des clusters BOT et BOA pour analyser l'effet sur les gènes des clusters.

La structure génomique bipartite observée au niveau des clusters BOT et BOA est assez peu fréquemment observée parmi les autres clusters du métabolisme chez B05.10 (sept sur une quarantaine). Ceci nous mène à nous interroger sur son implication dans la régulation des gènes concernés. Il a été démontré chez *N. crassa* que les séquences ayant subi des mutations par le RIP étaient spécifiquement reconnues par DIM-5 (KMT1 ; Lewis *et al.*, 2009). Le recrutement de cette histone méthyltransférase entraîne par la suite l'ajout des marques H3K9me3 puis le recrutement successif de HP1 et DIM-2 pour aboutir à la formation d'hétérochromatine. De plus, il a déjà été démontré que les modifications au niveau des H3K9 jouaient un rôle dans la régulation des gènes du métabolisme secondaire et que LaeA pourrait être impliquée dans un mécanisme ayant le rôle opposé à DIM-5 (Reyes-Dominguez *et al.*, 2010; Gacek-Matthews *et al.*, 2015). Ainsi, étant donné que les clusters BOT et BOA contiennent des copies d'ETs RIPées et qu'ils sont tous deux régulés par BcLae1 (Schumacher, Simon, Kim Christopher Cohrs, *et al.*, 2015), il est possible que ces deux clusters sont sous le contrôle chromatinien mis en place par BcDim-5.

3. *Bcboa15* et *Bcboa16* sont probablement des pseudogènes

La pseudogénéisation est un phénomène qui affecte les génomes fongiques dont celui de *B. cinerea* (van der Burgt *et al.*, 2014). L'insertion de mutations délétères peut alors mener à l'absence de production de la protéine ou alors à la production d'une version dont la fonction est altérée, ainsi qu'à une très faible expression (Lynch et Conery, 2000).

D'après nos résultats, *Bcboa15* et *Bcboa16* présentent une expression très faible voire nulle dans toutes les conditions testées. En ce qui concerne BcBoa15, les prédictions de van der Burgt et ses collaborateurs (2014) suggèrent que la protéine ancestrale possédait un domaine de liaison à l'ADN de type Zn(II)₂Cys₆ qui a disparu dans la protéine BcBoa15 actuelle. Cette dernière possède néanmoins toujours un domaine Fungal Trans dont on ne pouvait exclure qu'il soit fonctionnel. En effet, chez *A. rabiei*, le gène *sol4* code une protéine ne contenant qu'un domaine Fungal Trans mais qui est néanmoins impliquée dans la régulation du cluster de gènes de synthèse des solanapyrones, (Kim *et al.*, 2015). Nous avons par conséquent généré un $\Delta Bcboa15$ en déléant la région comprenant la CDS prédite actuelle ainsi que la partie 5' codant le domaine de liaison à l'ADN dans la probable protéine

ancestrale. Nous n'avons pu observer aucune différence phénotypique entre les mutants et B05.10. De plus, l'expression des gènes *Bcboa* étudiés n'a pas été affectée par la délétion de *Bcboa15*. Ces résultats suggèrent que BcBoa15 n'est pas impliqué dans la régulation du cluster BOA. D'après ces différentes observations, nous pensons que l'hypothèse la plus probable est que *Bcboa15* et *Bcboa16* soient effectivement des pseudogènes, comme suggéré par van der Burgt *et al.* (2014) et van Kan *et al.* (2016). Pour *Bcboa15*, la pseudogénisation serait due à une mutation délétère juste en amont de la CDS prédite actuelle (Bcin01g00140) entraînant la mutation d'un codon responsable de l'insertion d'un amino-acide en codon STOP (**Tableau II.5**). De plus, une mutation délétère intervenant à la fin de la séquence prédite Bcin01g00140 serait également responsable de l'insertion d'un codon STOP à la place d'un amino-acide. Nous pensons qu'il est possible que ces mutations soient dues à l'action du RIP. Par exemple, si au sein des codons STOP actuels TAA et TGA, on suppose que les T sont issus de transitions (C→T), on reconstitue une protéine ancestrale hypothétique avec des codons responsables respectivement de l'insertion d'une glutamine et d'une arginine, ce qui permet d'obtenir une ORF compatible avec la protéine ancestrale prédite par van der Burgt *et al.* (2014). Le RIP agit au niveau de séquences cibles dans le génome. Néanmoins, il arrive que des séquences voisines se trouvent mutées (Ohm *et al.*, 2012). Ceci peut entraîner une évolution rapide conférant un avantage au champignon et il est parfois proposé que ce mécanisme entraîne la formation de nouveaux allèles de virulence. Cependant, on peut aussi imaginer qu'un gène affecté de façon non spécifique par le RIP puisse se trouver inactivé. Ceci mènerait ainsi à une pseudogénisation. De façon intéressante, on peut remarquer que sur la **Fig. II.1**, les indices de RIP augmentent au niveau du T6 et aussi légèrement sur la région en aval. Etant donné que *Bcboa15* se trouve dans cette région, il est probable que l'action du RIP ait joué un rôle dans la pseudogénisation putative. La séquence a alors pu évoluer sans pression de sélection et dégénérer.

Tableau II.5. Hypothèses des mutations résultant en la pseudogénéisation de *Bcboa15*

Protéine BcBoa15	1 ^{er} codon portant une mutation délétère		2 nd codon portant une mutation délétère	
	Bcin01g00140	TAA ATT	Stop	TGA ACT
Protéines ancestrales hypothétiques ayant pu subir une mutation C→T	CAA GTT	Q	CGA	R
			GCT	
			TGG ACC	W

4. BcBoa13 régule *Bcboa1-Bcboa12*

La prédiction d'un domaine Zn(II)₂Cys₆ au sein de BcBoa13 a permis l'émission de l'hypothèse de son rôle de régulateur spécifique du cluster BOA (Dalmais *et al.*, 2011). D'après les résultats présentés ci-dessus, il apparaît clairement que BcBoa13 est le régulateur majeur du cluster BOA. Effectivement, nous avons démontré que le mutant présentait une expression réduite des gènes *Bcboa1-Bcboa12*. Dans l'étude menée par Dalmais et ses collaborateurs (2011), le cluster BOA a été défini par les gènes *Bcboa1-Bcboa17*. Néanmoins, les données transcriptomiques acquises depuis remettent en question la co-régulation des gènes *Bcboa15-Bcboa17* avec le reste des gènes prédits et donc les limites du cluster BOA (van Kan *et al.*, 2016). Les résultats de RT-qPCR présentés dans le cadre de notre étude pour le $\Delta Bcboa13$ permettent de conforter ces interrogations et montrent que le cluster serait finalement composé des gènes *Bcboa1-Bcboa13*. Nous avons abordé précédemment le fait que *Bcboa15* et *Bcboa16* sont probablement des pseudogènes. De plus, leur faible expression n'est pas affectée chez le $\Delta Bcboa13$, ce qui suggère qu'ils ne font pas partie du cluster. Vu que l'expression de *Bcboa17* n'est pas affectée négativement comme le reste des gènes *Bcboa* chez le $\Delta Bcboa13$, il est probable qu'il ne soit pas non plus impliqué dans la production de BOA ou des botcinines. Néanmoins ce gène pourrait intervenir dans le pouvoir pathogène de *B. cinerea* étant donné que son expression est stimulée *in planta* ou sur milieu jus de raisin. L'analyse de l'expression des gènes qui se trouvent en aval de *Bcboa17* après une région A+T-riche de 16 kb a démontré que Bcin01g00170 était exprimé dans les conditions testées et que son expression n'était pas affectée par la délétion de *Bcboa13*. Pour Bcin01g00180, le niveau d'expression observé initial était faible et aucune différence n'a été observée

chez le *ΔBcboa13*. Finalement, dans le but de compléter ces données transcriptomiques, les *ΔBcboa13* et *ΔBcboa15* sont actuellement utilisés dans le cadre d'une analyse métaboliques afin d'évaluer leur capacité à produire des botcinines.

5. BcBoa13 est une protéine nucléaire

Nous avons démontré lors de notre étude que BcBoa13 pouvait être localisée au niveau nucléaire et avons donc émis l'hypothèse que la protéine était directement impliquée dans la régulation des gènes *Bcboa*. Nous avons identifié un motif candidat (A*) pour la fixation de BcBoa13 en utilisant le promoteur des gènes *Bcboa1-Bcboa12* et *Bcboa1-Bcboa13*. Le système rapporteur (GFP) utilisé semble indiquer que pour le *pBcboa9*, la région contenant le motif est requise pour l'expression du gène. L'utilisation de l'outil simple hybride visait à confirmer l'interaction directe entre BcBoa13 et les *pBcboa6/pBcboa9* au niveau de A*. Malgré de nombreuses tentatives, l'utilisation de cet outil ne nous a pas permis de confirmer cette interaction physique. Nous pensons néanmoins que BcBoa13 est effectivement capable de se fixer directement au niveau du promoteur de chacun des gènes *Bcboa* qu'il régule. Même si l'utilisation de notre outil simple hybride s'est déjà avérée fructueuse pour identifier des FTs et confirmer leur interaction avec des promoteurs (Simon *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015), il est possible que pour certains gènes ou certaines protéines, des problèmes techniques subsistent. Un problème de repliement ou de sensibilité pourrait alors expliquer l'absence de signal. Il est également envisageable que dans ce système hétérologue, une modification post-traductionnelle requise pour l'activation de BcBoa13 ne soit pas possible chez la levure. Finalement, nous pensons que pour agir au niveau des promoteurs, BcBoa13 pourrait nécessiter l'intervention d'un cofacteur protéique.

Lors de nos expérimentations visant à localiser BcBoa13 *in vivo*, nous avons remarqué une localisation particulière de la fluorescence. Bien que nous ayons pu confirmer que BcBoa13:GFP était située au niveau des noyaux (eux même marqués au Hoescht), nous avons noté la présence de la protéine chimère au niveau de points de concentration (foci) dans le noyau. Des résultats similaires avaient pu être observés lors de la localisation de BcBot6:GFP (Cf. **Chapitre I**). A notre connaissance, aucune donnée relative à ce genre d'observation sur des FTs n'a été publiée chez

d'autres champignons. En revanche, il a été démontré chez les eucaryotes supérieurs que certains FTs s'accumulaient de façon hétérogène au sein des noyaux (Jolly *et al.*, 1997; Gillet *et al.*, 2002). La fonction de ces regroupements n'a néanmoins pas été caractérisée à notre connaissance. Les noyaux sont des organites qui contiennent des sous-compartiments qui semblent avoir des rôles distincts. Chez la levure, un de ces compartiments est notamment impliqué dans la gestion des protéines mal repliées (Miller *et al.*, 2015). Une hypothèse qui pourrait expliquer la localisation des FTs BcBot6 et BcBoa13 repose donc sur leur quantité excessive (en raison de l'expression constitutive des gènes chez les transformants) et/ou sur un mauvais repliement. Il serait ainsi possible qu'une partie de ces protéines soit déplacée vers ces compartiments spéciaux. Une hypothèse alternative pour expliquer ces foci est basée sur le fait que les sous-compartiments nucléaires diffèrent également de par l'état chromatinién des régions chromosomiques présentes. Ainsi chez les levures, les régions hétérochromatiniennes sont localisées dans des compartiments à la périphérie des noyaux (Cockell et Gasser, 1999), notamment grâce à des mécanismes d'ancrage des télomères dans la membrane nucléaire (Taddei et Gasser, 2012). La présence possible des régions télomériques du génome de *B. cinerea* dans de tels compartiments pourrait expliquer la présence accrue de BcBot6 et BcBoa13, soit du fait de l'affinité des FTs pour les promoteurs des gènes cibles soit d'une possible affinité avec ces sous-compartiments nucléaires périphériques (*via* d'autres protéines par exemple). Dans le but d'étudier ces phénomènes, nous avons entrepris la construction de transformants marqués au niveau de BcHp1 (présence probable au niveau de l'hétérochromatine) et de BcTay1 (protéine télomérique putative, Casas-Vila *et al.*, 2015) avec une protéine fluorescente (*i. e.* mCherry). Ces souches seront transformées avec les plasmides contenant *Bcbot6* et *Bcboa13* fusionnées à l'ORF de la GFP pour des études de co-localisation.

6. Recherche du rôle de BcBoa1

Nous avons déjà abordé précédemment le fait que dans certains clusters du métabolisme secondaire fongique, des régulateurs ne contenant pas de domaine Zn(II)₂Cys₆ pouvaient contrôler l'expression des gènes. C'est notamment le cas de Bik4 qui possède un domaine NmrA (Wiemann *et al.*, 2009). Etant donné que BcBoa1 est prédite comme possédant un tel domaine NmrA, nous avons voulu déterminer si cette protéine pouvait jouer un rôle dans la régulation des gènes *Bcboa*. La

première étape de cette analyse a donc été de générer un $\Delta Bcboa1$. Néanmoins, la délétion de *Bcboa1* s'est avérée difficile. Aucun transformant n'a pu être isolé après trois évènements de transformation dans la souche sauvage B05.10. Les trois évènements de transformation réalisés dans la souche réceptrice $\Delta Bcku70$ ont mené à l'obtention d'uniquement trois transformants. Nous supposons que la difficulté de cette inactivation vient de la localisation de *Bcboa1* près du télomère de BCIN01. Il est probable que la chromatine ne soit pas accessible dans les conditions utilisées lors de la transformation et que la recombinaison homologe ne fonctionne pas bien à cet endroit particulier du génome.

L'étude de l'expression de certains gènes *Bcboa* chez le $\Delta Bcboa1$ n'a mené à l'observation d'aucune différence en comparaison de la souche réceptrice ($\Delta Bcku70$). Ces résultats suggèrent ainsi que BcBoa1 n'est pas impliqué dans la régulation du cluster au moins dans les conditions testées. Cependant, la co-régulation de *Bcboa1* avec les gènes *Bcboa2-Bcboa13* nous laisse penser que ce gène devrait avoir un rôle dans le cluster BOA. Nous pensons qu'il est possible que BcBoa1 intervienne dans une interaction directe avec BcBoa13. Cette hypothèse est fondée sur le domaine NmrA de BcBoa1. Ce domaine est prédit sur la base de la protéine NmrA chez *A. nidulans* (NMR1 chez *N. crassa*) qui un régulateur négatif du FT AreA (NIT2) impliqué dans la régulation de l'utilisation de l'azote (Andrianopoulos *et al.*, 1998; Tudzynski, 2014). Il a été démontré que NMR1 interagit de manière directe avec NIT2 (Xiao *et al.*, 1995; Pan *et al.*, 1997). Bien que BcBoa13 soit un FT putatif de type Zn(II)₂Cys₆ (tandis que AreA est un FT de type GATA), nous pensons que BcBoa1 pourrait interagir avec BcBoa13. De plus, nous émettons l'hypothèse que BcBoa1 pourrait être un senseur du statut redox de la cellule (*via* la liaison de NAD probable au niveau du domaine NmrA; Stammers *et al.*, 2001) et que l'interaction putative avec BcBoa13 pourrait avoir lieu uniquement en fonction des conditions environnementales. Pour tester l'hypothèse d'une interaction entre BcBoa1 et BcBoa13, des approches de double hybride et de BiFC sont actuellement mises en place. Une souche au sein de laquelle *Bcboa1* est fusionné à l'ORF de la GFP nous permettra également de déterminer la localisation nucléaire de cette protéine, ce qui devrait nous apporter des informations complémentaires quant à son rôle. De plus, nous envisageons de cultiver $\Delta Bcboa1$ sur différents milieux en appliquant différents stress pour déterminer dans quelles conditions le gène aurait un rôle prépondérant. Finalement, le

ΔBcboa1 est actuellement utilisé pour des analyses métaboliques afin d'évaluer sa capacité à produire des botcinines.

7. Intégration des résultats sur les régulateurs spécifiques et recherche de régulateurs transcriptionnels agissant en amont

Les résultats que nous avons apportés dans le cadre de cette étude sur la caractérisation de BcBoa13 ainsi que ceux sur BcBot6 (Porquier *et al.*, 2016a) nous permettent maintenant d'avoir une vue plus précise sur la régulation de leurs clusters respectifs. Ainsi, il est maintenant possible d'envisager d'étudier les acteurs qui agissent en amont. Dans cette optique, le crible simple hybride que nous avons réalisé en utilisant les promoteurs *pBcbot6* et *pBcboa13* nous ont permis d'identifier un candidat (Bcin08g02710) putativement impliqué dans la régulation du cluster BOT. De plus, ce FT putatif avait déjà été identifié dans le cadre du crible de notre banque simple hybride mais l'interaction directe n'avait pas pu être confirmée. L'inactivation du gène correspondant (que nous avons déjà réalisée) nous aidera à définir sous peu si ce FT putatif de type bZIP est effectivement impliqué dans le contrôle des clusters BOT et BOA. De façon intéressante, le gène codant ce FT n'est pas conservé chez les champignons et ne semble présent que chez les genres *Botrytis* et *Sclerotinia* (*S. sclerotiorum* : SS1G_03321). Des régulateurs de la famille des bZIP sont impliqués dans la régulation du métabolisme secondaire fongique. Notamment, MeaB joue un rôle répresseur sur les clusters de la bikavérine et des gibbérellines chez *F. fujikoroii* (Wagner *et al.*, 2010). RsmA est un autre FT bZIP qui est impliqué dans la régulation globale du métabolisme secondaire chez *A. nidulans* (M. I. Shaaban *et al.*, 2010). La surexpression du gène mène à une restauration partielle du métabolisme secondaire chez les *ΔlaeA* et *ΔveA*. Il sera intéressant de confronter les résultats obtenus grâce à la délétion de Bcin08g02710 afin de définir si la protéine correspondante a un rôle global sur le métabolisme secondaire chez *B. cinerea* et si ce rôle est positif ou négatif.

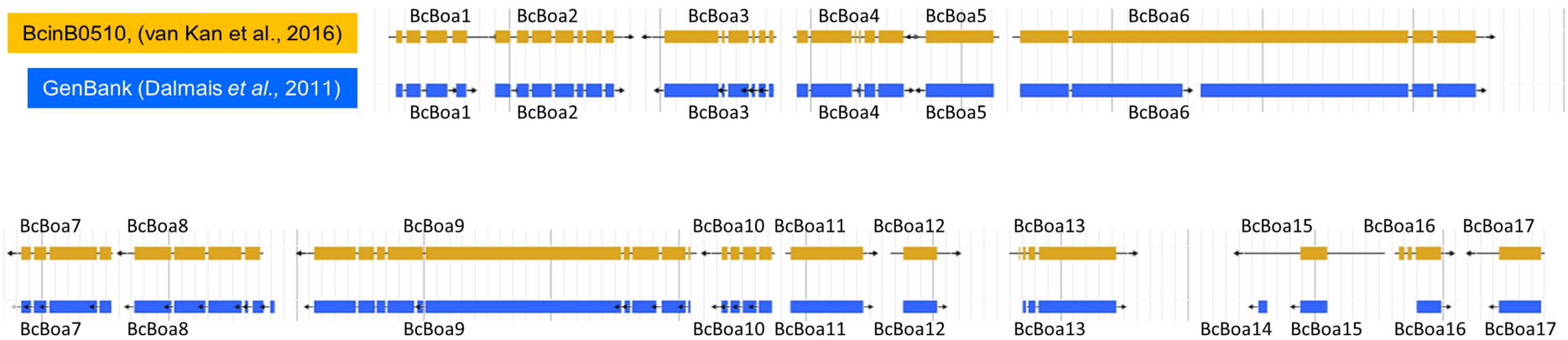


Fig. II.S1. Prédiction des gènes du cluster BOA.

Les séquences prédites d'après Dalmais *et al.* (2011) ont été extraites de GenBank et alignées contre le génome BcinB05.10 afin d'être comparées avec les gènes prédits d'après van Kan *et al.* (2016).

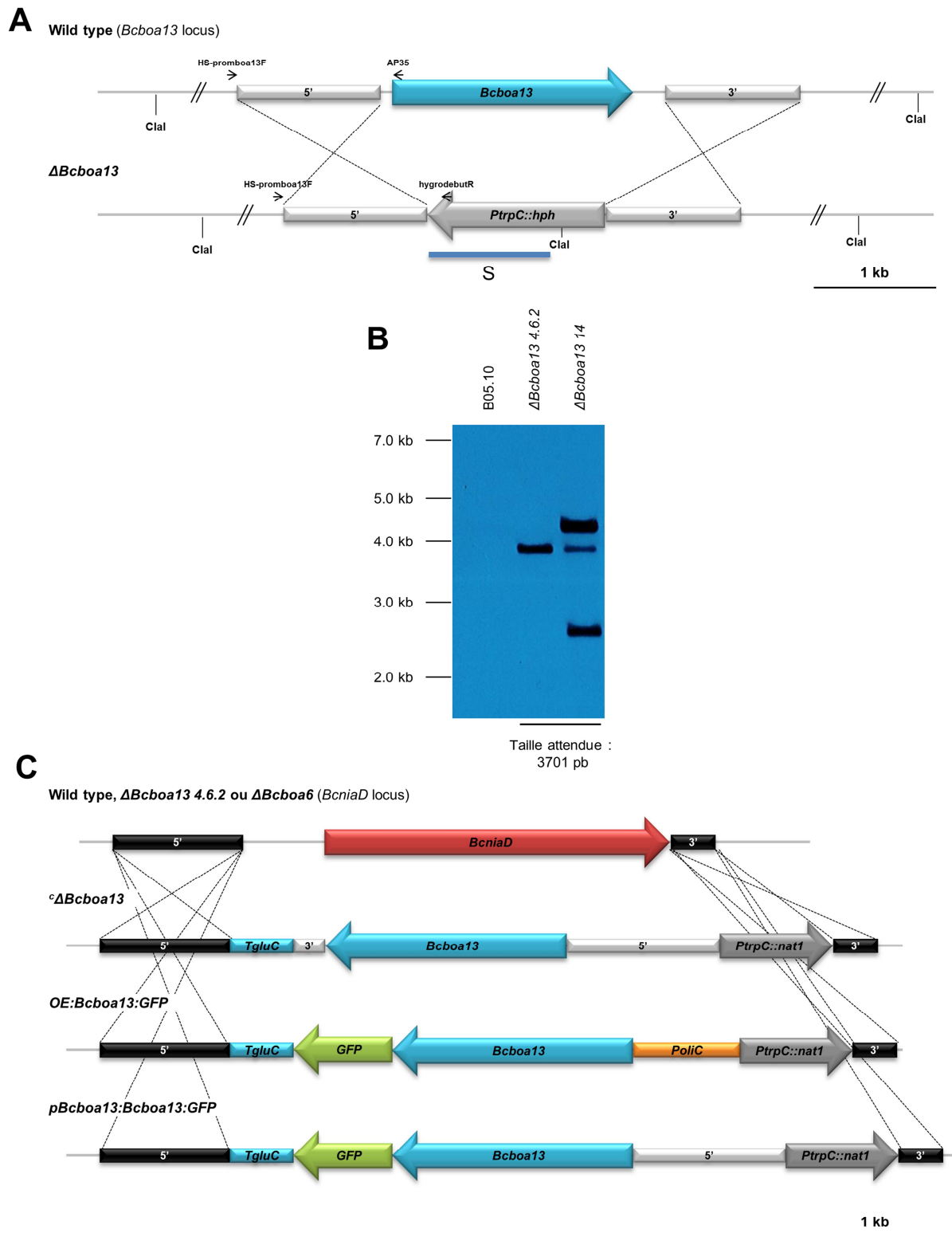
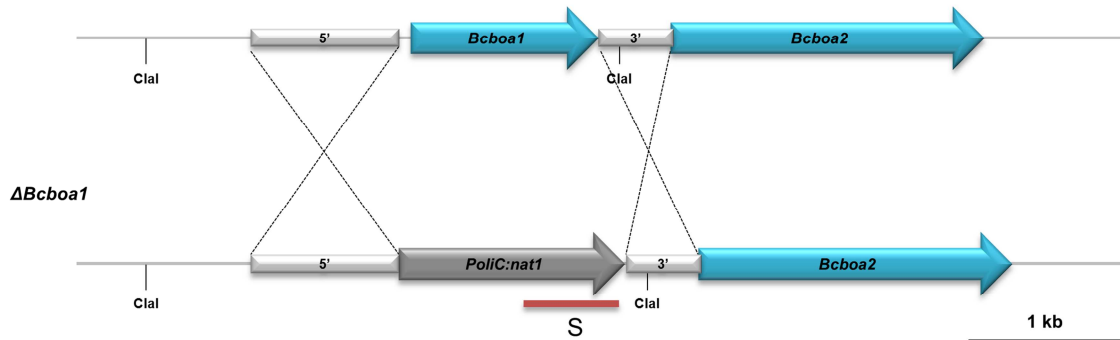
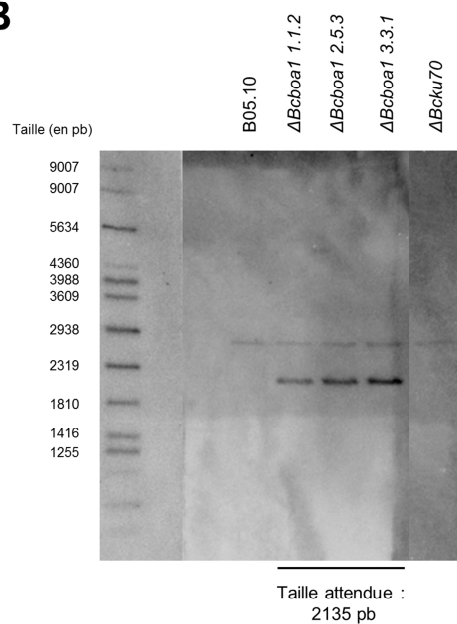
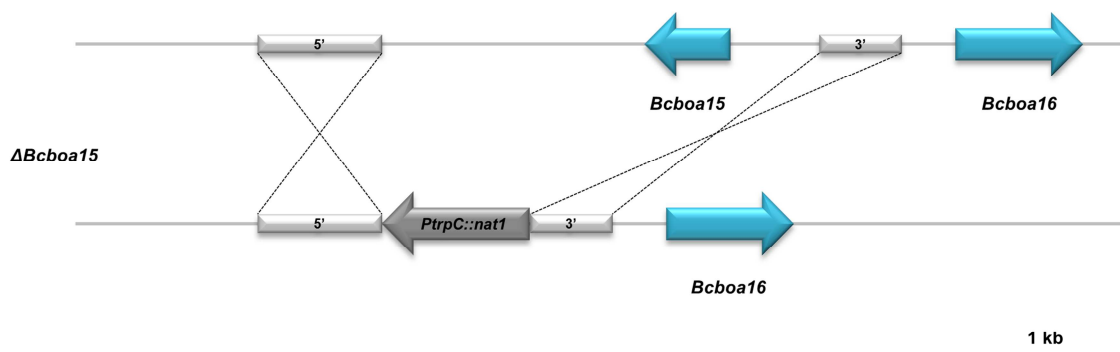


Fig. II.S2. Constructions du $\Delta Bcboa13$ et des différentes souches complémentées ou surexprimant le gène.

A. Les amorces utilisées pour la délétion de *Bcboa13* sont présentées dans le **Tableau MM.1 (Matériels et méthodes)**. Pour inactiver le gène chez B05.10, la totalité de la cassette de délétion a été amplifiée par PCR en utilisant les amorces HS-5F-bcboa13/HS-3R-bcboa13. Pour plus d'informations, Cf. **Matériels et méthodes**. Les amorces utilisées pour la vérification des mutants sont présentées. **B.**

L'insertion d'une unique copie de la cassette de résistance au locus ciblée n'a pu être démontrée que chez le $\Delta Bcboa13$ 4.6.2. L'analyse par Southern blot a été réalisée de la même façon que dans Porquier *et al.* (2016a) par DIG. La sonde utilisée (présentée en A) a été amplifiée avec les amorces hphR/hygro 8-5'. C. Le locus *Bcniad* a été ciblé pour l'intégration de différentes constructions. La première cassette de complémentation a été obtenue en amplifiant *Bcboa13* ainsi qu'une partie des régions 5' et 3' avec les amorces HS-boa13 comp F/HS-boa13 comp R. Cette construction a été intégrée dans le pNDN-OGG (digéré par NotI et SpeI) en utilisant la recombinaison homologue de la souche FY834 de *S. cerevisiae*. La cassette de surexpression de *Bcboa13* a été obtenue en amplifiant dans un premier temps l'ORF de *Bcboa13* (sans le stop) avec les amorces BD74/BD83. Cette amplicon a par la suite été intégré au pNDN-OGG (digéré par NcoI) et placé en aval du promoteur constitutif *pOliC* en transformant la souche FY834 de levure. La cassette de fusion de *Bcboa13:gfp* sous le contrôle du promoteur de *Bcboa13* a été obtenue en amplifiant le promoteur et l'ORF de *Bcboa13* (sans le stop) avec les amorces BD74/HS-boa13 comp F. Cette construction a par la suite été intégrée au pNDN-OGG (digéré par SpeI et NcoI) en transformant la souche FY834 de levure. Pour l'insertion des différentes cassettes au locus *Bcniad*, les plasmides ont été multipliés en transformant des bactéries puis extraits et utilisés pour transformer les individus correspondants de *B. cinerea*.

AWild type (*Bchoa1* locus)**B****C**Wild type (*Bchoa15* locus)**Fig. II.S3. Construction des $\Delta Bchoa1$ et $\Delta Bchoa15$.**

A. et **C.** Les amorces utilisées pour la construction des $\Delta Bchoa1$ et $\Delta Bchoa15$ sont présentées dans le **Tableau MM.1 (Matériels et méthodes)**. **B.** L'insertion unique de la cassette de délétion de *Bchoa1* au locus ciblée a été confirmée par Southern blot chez les trois mutants testés. La bande supérieure correspond à une hybridation aspécifique également présente chez B05.10 et $\Delta Bcku70$. Cette analyse a été réalisée avec une sonde radioactive présentée en **A** amplifiée avec les amorces Nourseo-ATG/K7 Nat1-Rev. Pour plus de détails, **Cf. Matériels et méthodes**.

Chapitre III

Caractérisation de *Bcpks7* et recherche du métabolite putatif associé

Introduction

Botrytis cinerea est un champignon phytopathogène polyphage responsable de la pourriture grise. Les hôtes de cet agent pathogène incluent notamment des espèces cultivées d'intérêt économique majeur. Ainsi, la pourriture grise entraîne à travers le monde des pertes économiques importantes. De ce fait, *B. cinerea* est un champignon largement étudié. Notamment, de nombreux efforts sont réalisés pour comprendre les différents facteurs impliqués dans sa virulence. Dans cette optique, une banque de 4508 mutants de la souche B05.10 générés par insertion aléatoire de l'ADN-T d'*Agroacterium tumefaciens* a été réalisée (Giesbert *et al.*, 2011 ; Poussereau *et al.*, non publié). Les mutants ont ensuite été classés en plusieurs types en fonction de leur capacité à infecter les feuilles de haricot et de cornichon. Les mutants de type 1 sont ceux incapables pénétrer les tissus de l'hôte. Les mutants de type 2 sont ceux qui ne provoquent pas de lésions secondaires (altérés dans le processus de colonisation). Enfin, les mutants de type 3 provoquent des nécroses similaires à la souche sauvage mais ne produisent pas ou peu de conidies. Ce crible a notamment permis d'identifier une phosphatase et un composant du complexe multiprotéique SAGA (BcSpt3) qui sont tous les deux cruciaux pour l'agressivité, la croissance, la différenciation morphologique mais aussi la résistance au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Giesbert *et al.*, 2011).

Dans le cadre d'une collaboration avec les universités de Münster et de Lyon, l'équipe MSN-BOT a identifié les sites d'intégration des ADN-T par Tail-PCR (P. Bally, G. Morgant, non publié). Chez un mutant (PA3450) déficient dans la colonisation et la production de conidies (mutant dit de type 3), nous avons localisé l'insertion de l'ADN-T au niveau d'une séquence génomique proche d'un gène (*BcPKS7*) codant une PKS-NRPS putative (Cf. **partie 4 de l'Introduction générale**). Au niveau transcriptomique, *BcPKS7* est exprimé lors de l'infection sur haricot et est dépendant de BcVel1 (Schumacher *et al.*, 2012; Schumacher, Simon, Kim C. Cohrs, *et al.*, 2015). De plus, l'expression de ce gène est fortement induite en condition de carence en azote (Viaud, non publié). D'après ces données, nous avons émis l'hypothèse que ce gène était impliqué(s) dans le pouvoir pathogène de B05.10. Pour tester cette hypothèse et avant mon arrivée dans l'équipe, un mutant $\Delta BcPKS7$ avait été généré en remplaçant l'ORF du gène prédit par une cassette de résistance à l'hygromycine. Plusieurs

homocaryons indépendants avaient été obtenus à l'issue de cette transformation et pour lesquels la cassette de délétion avait été intégrée au locus ciblé. L'insertion d'une unique copie de la cassette de résistance a été confirmée par *Southern blot*. Ces mutants présentaient un phénotype très différent de celui de la souche sauvage. En effet, le mycélium était ras (*vs* aérien) et de couleur blanche. L'incapacité à produire des conidies dans les conditions standards (alternance lumière / obscurité) avait également été observée. De plus, le pouvoir pathogène des individus avait été évalué sur feuilles détachées de haricot. Les résultats montraient que leur agressivité était fortement réduite. Une nécrose pouvait être observée mais il apparaissait que les mutants n'étaient pas capables de coloniser les tissus végétaux. Ce phénotype correspond à un mutant de type 2 dans le cadre du crible et l'inactivation de *Bcpks7* aurait ainsi encore plus d'effet que l'insertion de l'ADN-T au locus identifié. L'ensemble de ces résultats semblait donc particulièrement intéressant et supposait un rôle important de *Bcpks7* dans le développement et le pouvoir pathogène de *B. cinerea*. Dans le but de confirmer que le phénotype observé résultait bien de l'inactivation de *Bcpks7*, les mutants ont été croisés avec une souche compatible (SAS405). Une distribution mendélienne des descendants en fonction de différents critères (résistance à l'hygromycine, agressivité, aspect du mycélium) aurait permis de confirmer l'implication d'une unique mutation. Néanmoins, les résultats obtenus suggéraient plutôt l'implication de deux évènements de mutation indépendants. Ainsi, il apparaîtrait qu'une seconde mutation indépendante de l'évènement de transformation ait eu lieu. Le fait que tous les mutants présentaient le même phénotype laisse penser que cette mutation est apparue au sein de la souche sauvage utilisée pour la transformation.

Dans le cadre de mon travail de thèse, nous avons voulu étudier l'impact de l'absence de *Bcpks7* chez B05.10 et déterminer ce cluster est impliqué dans le pouvoir pathogène de B05.10 comme le laissait supposer le phénotype du mutant PA3450. Pour cela, nous avons généré un nouveau $\Delta Bcpks7$. Ici, nous présentons l'initiation de la caractérisation de ce gène. En parallèle, nous avons étudié les domaines de *Bcpks7* et conclut qu'il était probable qu'un métabolite soit produit par cette enzyme. En utilisant le nouveau mutant en parallèle de la souche sauvage, nous avons cherché à identifier le ou les métabolite(s) produit(s) à partir de cette PKS-NRPS putative. L'isolement et la caractérisation des

composés produits pourraient nous permettre de mieux appréhender leurs rôles pour *B. cinerea*. Par ailleurs, les exemples de PKS-NRPS associées aux métabolites qu'elles produisent étant encore peu nombreux, la caractérisation des métabolites produits par le cluster PKS7 renforcerait le champ de connaissances pour ce type de mégasynthèses. Enfin, la caractérisation du rôle de ce cluster dans le pouvoir pathogène s'inscrit dans un programme plus large sur la régulation du métabolisme secondaire de *B. cinerea*.

Résultats

1. Le cluster de gènes PKS7

1.1. Délimitation du cluster de gènes

L'identification de la région de l'insertion de l'ADN-T chez le mutant PA3450, nous a conduits à nous intéresser à un cluster du métabolisme secondaire (**Fig. III.1**). Le gène *Bcpks7* qui est présent au niveau de cette région est effectivement prédit pour coder une PKS-NRPS contenant les dix domaines fonctionnels habituellement présents dans de telles mégasynthèses (**Fig. III.2**). Un cluster du métabolisme secondaire peut inclure des gènes codant des protéines impliquées dans la modification du métabolite de base produit par l'enzyme clé, dans la régulation des gènes du cluster ou encore dans le transport du ou des métabolite(s) produit(s) (**Cf. partie 2.4 de l'Introduction générale**). Nous nous sommes par conséquent intéressés aux gènes présents au sein de cette région (**Fig. III.1**). Ceux pour lesquels une fonction est prédite (**Tableau III.1**) sont susceptibles d'être impliqués dans la production d'un métabolite. Les fonctions putatives de Bcin01g00020 et Bcin10g00060, respectivement un transporteur et une oxydoréductase, corroborent cette hypothèse. Nous dénommerons ce cluster PKS7 en raison du nom attribué au gène Bcin01g00040 codant la PKS-NRPS putative (*i.e. Bcpks7*) lors d'études précédentes (Kroken *et al.*, 2003; Amselem *et al.*, 2011). Ce cluster est localisé à l'extrémité du chromosome 10 (BCIN10).

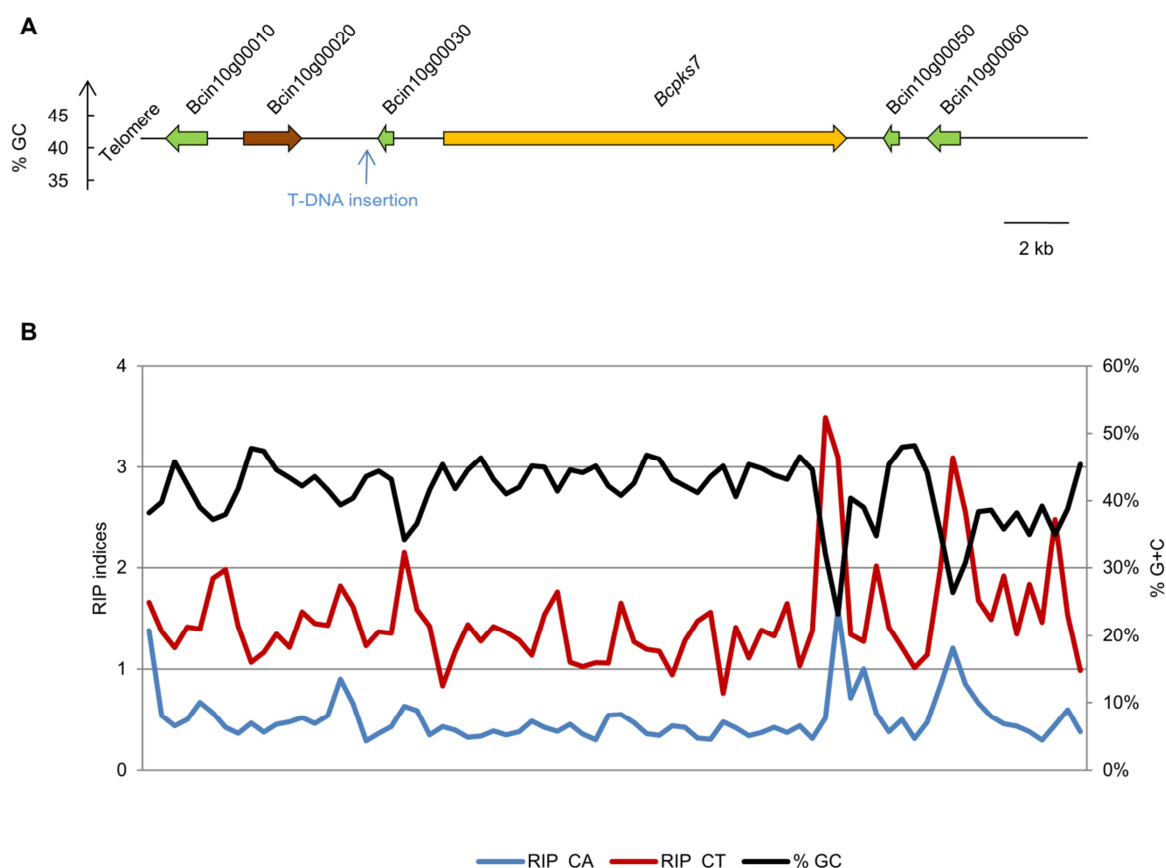


Fig. III.1. Présentation de la région génomique contenant *Bcpks7*.

A. Chez le mutant PA3450, l'ADN-T d'*A. tumefaciens* s'est inséré dans la partie 3'UTR de Bcin10g00030. La région génomique correspondante contient des gènes susceptibles d'intervenir dans le métabolisme secondaire (Cf. **Tableau III.1**). Le pourcentage en G+C de cette région a été déterminé grâce à l'outil GC-profile (Gao et Zhang, 2006). **B.** Le calcul des indices de RIP a été réalisé de la même façon que dans la publication Porquier *et al.* (2016a). En parallèle, le pourcentage G+C a été calculé. Les différents calculs ont été réalisés sur des fenêtres de 500 pb avec un pas de 400 pb.

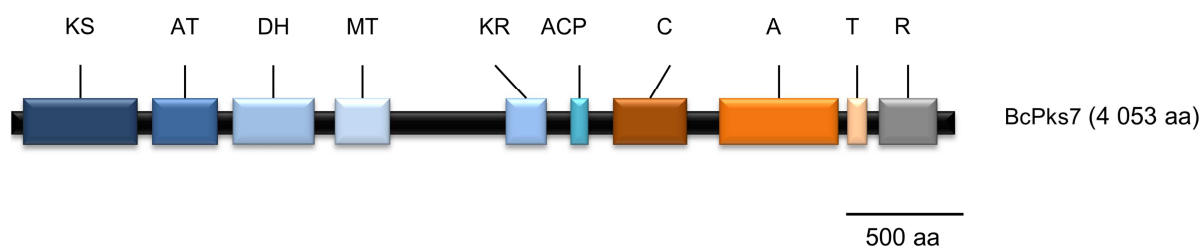


Fig. III.2. Domaines prédits de BcPks7.

Les domaines prédits de la partie PKS de BcPks7 sont présentés en bleu, ceux de la partie NRPS le sont en orange. Les abréviations correspondent aux domaines suivants : KS, cétyosynthase ; AT, acyltransférase ; DH, déshydratase ; MT, méthyltransférase ; KR, cétyoréductase ; ACP, protéine porteuse d'acyle ; C, condensation ; A, adénylation ; T, thiolation ; R, réductase. Pour plus d'informations, Cf. **Introduction générale**. Les domaines présentés ont été prédits avec BlastP sur le site NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).

Tableau III.1. Eléments génomiques présents dans la région comprenant le cluster PKS7.

Gène	Annotation	Taille (pb)	Fonction prédite
	Bcin10g00010	1, 277	Aucune
	Bcin10g00020	1, 785	Transporteur MFS
	Bcin10g00030	485	Inconnue (domaine EthD, PF07110)
<i>Bcps7</i>	Bcin10g00040	12, 384	PKS-NRPS
	Bcin10g00050	471	Aucune
	Bcin10g00060	1, 032	Oxydoréductase (liaison FAD-NADPH)

Les gènes sont listés dans l'ordre dans lequel ils apparaissent sur le chromosome BCIN10 (Fig. III.1).

Il est généralement admis que les gènes d'un même cluster du métabolisme secondaire sont co-régulés (Keller *et al.*, 2005). Pour essayer de délimiter le cluster PKS7, nous avons étudié l'expression des gènes présents sur la région génomique étudiée au sein de la souche sauvage et des *ΔBcvell* et *ΔBclae1* (Schumacher *et al.*, 2012; Schumacher, Simon, Kim C. Cohrs, *et al.*, 2015). Il est à noter que les résultats pour Bcin10g00050 ne sont pas disponibles puisqu'aucune sonde spécifique de ce gène n'était construite sur les puces utilisées. Les résultats présentés en **Fig. III.3** suggèrent que chez B05.10, les gènes Bcin10g00010 à Bcin10g00060 s'expriment plus ou moins intensément tandis que Bcin10g00070 et Bcin10g00080 semblent éteints. L'expression des gènes Bcin10g00010 à Bcin10g00040 est affectée par la délétion de *Bcvell* alors que chez le *ΔBcvell*, l'expression de Bcin10g00060 est comparable à celle observée chez B05.10. Finalement, la délétion de *Bclae1* ne semble pas affecter l'expression des gènes Bcin10g00010 à Bcin10g00060. Ces résultats suggèrent que les gènes Bcin10g00010 à Bcin10g00040 sont co-régulés et que Bcin10g00060 ne suit pas le même profil d'expression.

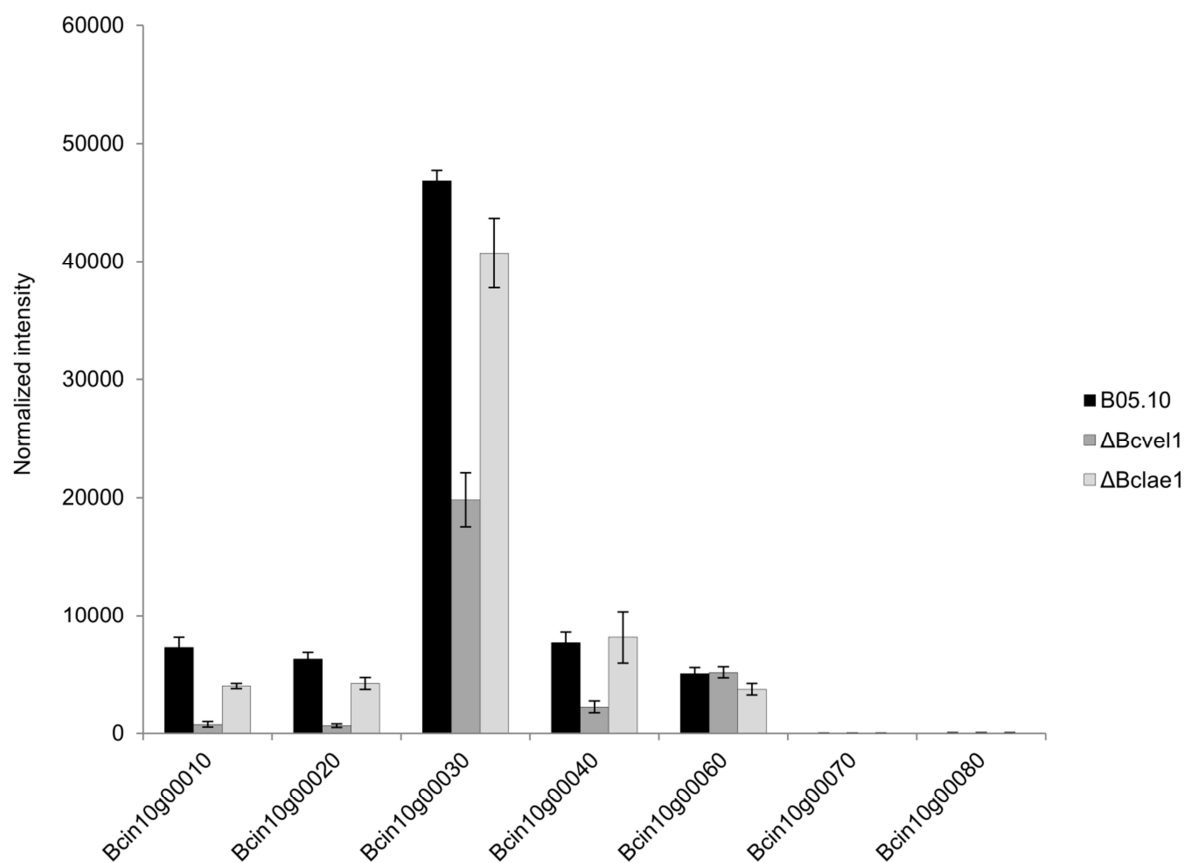


Fig. III.3. Les gènes Bcin10g00010 à Bcin10g00040 sont co-exprimés et dépendant de *Bcvel1*. D’après les données de puces à ADN publiées par Schumacher *et al.* (2015).

Pour compléter ces résultats, nous avons cherché à identifier chez d’autres organismes les homologues des gènes faisant putativement partie du cluster PKS7. Pour cela, nous avons réalisé des BlastP au NCBI. Grâce à ces recherches, nous avons pu mettre en évidence (par BDBH) que les gènes correspondant de Bcin10g00010 à Bcin10g00040 sont présents en un unique cluster chez plusieurs champignons ascomycètes phylogénétiquement éloignés de *B. cinerea* (**Tableau III.2, Fig. III.4**). Il s’agit de *Talaromyces (Penicillium) marneffeii*, un champignon pathogène opportuniste de l’Homme (Chan *et al.*, 2016), de *Rosellinia necatrix* qui est un champignon phytopathogène qui attaque les racines d’arbres fruitiers et forestiers (Pérez-Jiménez, 2006) et de *Stachybotrys chartarum*, un champignon reconnu comme produisant des métabolites affectant la santé des animaux et de l’Homme (Miller et McMullin, 2014). Ce dernier est notamment retrouvé dans le bois qui sert à différentes constructions (dont les habitations). Le fait que la synténie soit respectée entre ces différentes espèces

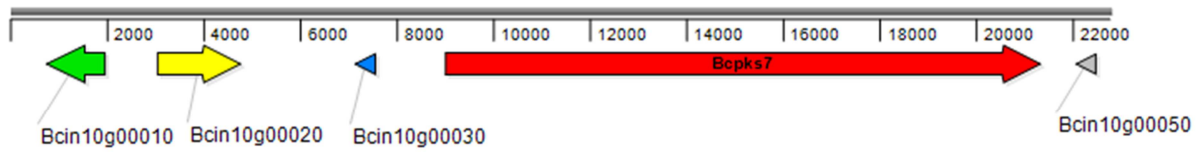
suggère que les gènes Bcin10g00010 à Bcin10g00040 forment un cluster. Ces gènes sont en revanche absents chez *Sclerotinia sclerotiorum* qui est une espèce proche de *B. cinerea*.

Tableau III. 2. Identification des homologues des gènes du cluster PKS7 chez d'autres organismes.

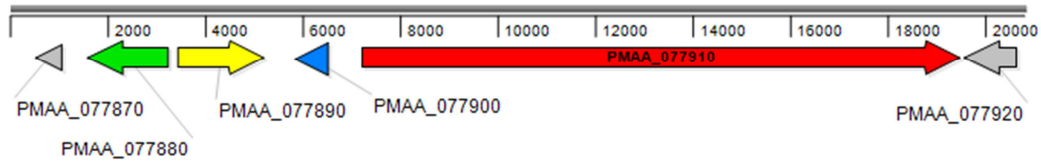
<i>Botrytis cinerea</i> (Bcin10gx)	<i>Talaromyces marneffei</i> (PMAA_x)	<i>Rosellinia necatrix</i> (SAM00023353_x)	<i>Stachybotrys chartarum</i> (S7711_x)
00010	077880 (65%)	8900300 (54%)	01845 (59%)
00020	077890 (73%)	8900290 (68%)	01844 (71%)
00030	077900 (56%)	8900280 (67%)	01843 (68%)
00040	077910 (56%)	8900270 (58%)	01842 (56%)
00050	-	-	-
00060	098710 (52%)	3900680 (55%)	-

Les gènes présentés ont été identifiés par BlastP au NCBI (BDBH) en utilisant les protéines de B05.10 comme requête. Les nombre entre parenthèses suivants les numéros d'accèsion correspondent au pourcentage d'identité des protéines identifiées par rapport aux protéines de *B. cinerea*. Le fond gris représente les gènes du cluster PKS7 chez les espèces fongiques présentées.

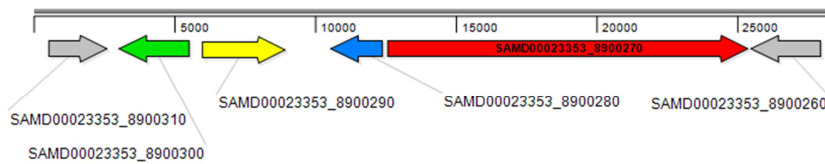
Botrytis cinerea



Talaromyces marneffei



Rosellinia necatrix



Stachybotrys chartarum

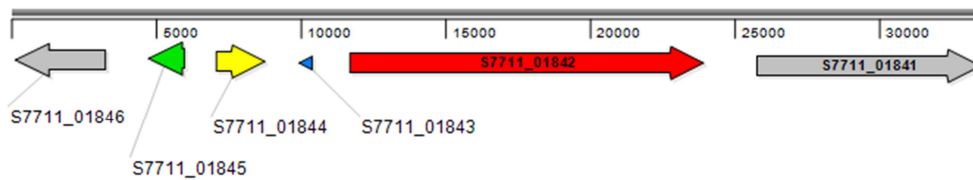


Fig. III.4. Les gènes correspondant de Bcin00010 à Bcin10g00040 sont clusterisés chez *Talaromyces marneffei*, *Rosellinia necatrix* et *Stachybotrys chartarum*.

Les régions génomiques présentées ont été extraites au NCBI et importées dans Seqbuilder (suite de logiciels Lasergene de DNASTAR). Les gènes représentés de la même couleur (vert, jaune, bleu et rouge) sont homologues (Cf. Tableau III.2).

1.2. Comparaison de l'environnement génomique de PKS7 avec ceux des clusters BOT et BOA

Dans les chapitres précédents, nous avons démontré que les clusters BOT et BOA étaient présents au niveau de régions génomiques particulières contenant des portions riches en A+T qui résultent de l'action du RIP (Porquier *et al.*, 2016a). Nous avons ainsi voulu définir si ce type de structure était présent au niveau du locus du cluster PKS7.

Le calcul du pourcentage en G+C de la région génomique étudiée n'a pas mis en évidence de zones A+T-riches comme pour les clusters BOT et BOA (**Fig. III.1B**). De plus, le calcul des points de segmentation avec GC-profile (Gao et Zhang, 2006) montre que les gènes du cluster PKS7 sont localisés sur une portion contenant 41,29% de G+C (**Fig. III.1A**), soit un nombre similaire à la moyenne du génome de B05.10 (*i. e.* 42,75%, Staats et van Kan, 2012). La portion riche en A+T (23,25% G+C) la plus proche est située à environ 50 kb en aval de *Bcps7*. Seule une diminution ponctuelle du pourcentage en G+C (entre 20 et 30%) est observée au niveau de la région suivant immédiatement *Bcps7* ainsi que qu'en aval de Bcin10g00060.

Pour aller plus loin dans la comparaison de l'environnement génomique de PKS7 avec celui des clusters BOT et BOA, nous avons cherché à localiser d'éventuelles copies d'éléments transposables (ETs). En utilisant l'annotation des ETs du génome de référence de B05.10 effectuée dans notre étude sur BcBot6 (Porquier *et al.*, 2016 ; **Chapitre I**), nous n'avons pas pu identifier d'ETs au niveau de la région génomique étudiée. De plus, le calcul d'indices de RIP sur cette même région (**Fig. III.1B**) ne suggère pas de mutations résultant de ce mécanisme. Ces indices n'augmentent que faiblement au niveau des régions (abordées ci-dessus) au sein desquelles le pourcentage en G+C diminue ponctuellement.

2. Délétion de *Bcps7* et phénotypage

La délétion de *Bcps7* a été réalisée en utilisant la même construction que celle utilisée pour le premier évènement de transformation (**Fig. III.S1A**). Deux homocaryons indépendants ($\Delta Bcps7$ B4 et D9) au sein desquels la cassette de résistance a été intégrée au locus ciblé ont été obtenus à l'issus

de trois clonages monospores. L'insertion unique de la cassette de transformation reste à confirmer par *Southern blot*. Au niveau macroscopique, les mutants obtenus étaient cette fois comparables à la souche sauvage. Effectivement, la délétion de *BcPKs7* n'a pas entraîné de modification de l'aspect du mycélium ou la capacité de produire des conidies. De plus, le pouvoir pathogène des $\Delta BcPKs7$ n'est pas affecté par rapport à B05.10 (Fig. III.5).

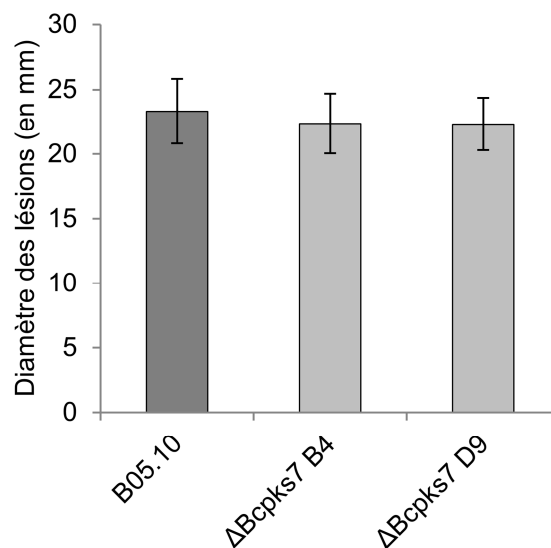


Fig. III.5. La délétion de *BcPKs7* n'affecte pas l'agressivité de B05.10 sur feuilles détachées de haricot.

Les résultats ont été obtenus avec 16 lésions pour B05.10 et huit lésions des $\Delta BcPKs7$ B4 et D9. Les inoculations ont été réalisées avec des *plugs* de mycélium (trois jours sur ML). Les barres d'erreur représentent les écarts types. Les résultats ne sont pas significativement différents d'après un test-t de Wilcoxon ($p \leq 0.05$).

3. Recherche et isolement d'un métabolite candidat

En raison du mode d'action itératif cryptique des PKS fongiques et du manque d'outils prédictifs pour la partie NRPS associée (contrairement aux NRPS bactériennes pour lesquelles une prédiction de l'acide aminé recruté par le domaine A est possible), nous ne pouvons pas, sur la base des données de séquences, avoir une idée de la structure de la molécule putativement produite par BcPKs7.

Pour identifier le métabolite putativement produit par BcPks7, nous avons choisi une approche consistant à comparer les profils métaboliques des extraits de B05.10 et du mutant $\Delta Bcpks7$ par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS). Ainsi, les métabolites présents dans l'extrait B05.10 et absents de l'extrait de $\Delta Bcpks7$ seront nos candidats. Cette approche a été mise en œuvre sous la direction de Stéphane Mann au Muséum national d'Histoire naturelle à Paris.

D'après des données de *Northern blot* disponibles au sein de l'équipe, l'expression de *Bcpks7* serait stimulée lors de la carence en azote. Nous avons donc décidé d'utiliser un milieu carencé en cet élément pour stimuler l'expression du gène chez la souche sauvage en supposant que cela aurait un effet positif sur la production du métabolite putatif. Dans un premier temps, nous avons cultivé les individus sur milieu solide standard (ML). Après sept jours de cultures à 23 °C avec une alternance lumière / obscurité (douze heures), le mycélium des différents individus a été collecté et utilisé pour ensemercer un litre de milieu Siesler liquide. Après deux jours de culture sous agitation dans les mêmes conditions de température et de lumière que celles utilisées pour la culture sur boîte, le mycélium a été récupéré par filtration. La moitié de la biomasse a été utilisée pour ensemercer à nouveau un litre de milieu Siesler liquide mais carencé en azote. Après deux jours de culture, le mycélium a été séparé du milieu de culture par centrifugation.

Comme le cluster PKS7 possède un gène codant un transporteur putatif, nous avons émis l'hypothèse que le métabolite putatif devait être présent dans le milieu de culture. Une extraction des métabolites à l'acétate d'éthyle a donc été réalisée à partir du milieu. Une analyse de ces extraits par LC-MS a été réalisée et les différences significatives entre les deux profils métaboliques ont été recherchées grâce au logiciel XCMS online. Ainsi, nous avons pu identifier un ion quasi moléculaire m/z 318,23 $[M+H]^+$ ($t_{ret} = 28,1$ min) présent dans l'extrait du milieu de culture de la souche sauvage (**Fig. III.5**) et qui est totalement absent dans l'extrait du milieu de culture du mutant. Le métabolite correspondant possède une masse exacte impaire de 317,22 Da. De cette espèce nous pouvons déduire la formule brute la plus probable $C_{16}H_{31}NO_5$, compatible avec la composition chimique d'un métabolite issu d'une PKS-NRPS, qui recrute un acide aminé dans la biosynthèse et donc au moins un atome d'azote. De plus, ce métabolite possède deux insaturations. La caractérisation de ce composé

par RMN nous permettra d'obtenir sa structure et de valider ces premiers résultats. Pour cela l'isolement du composé à partir de cultures en grands volumes (plusieurs litres) est en cours.

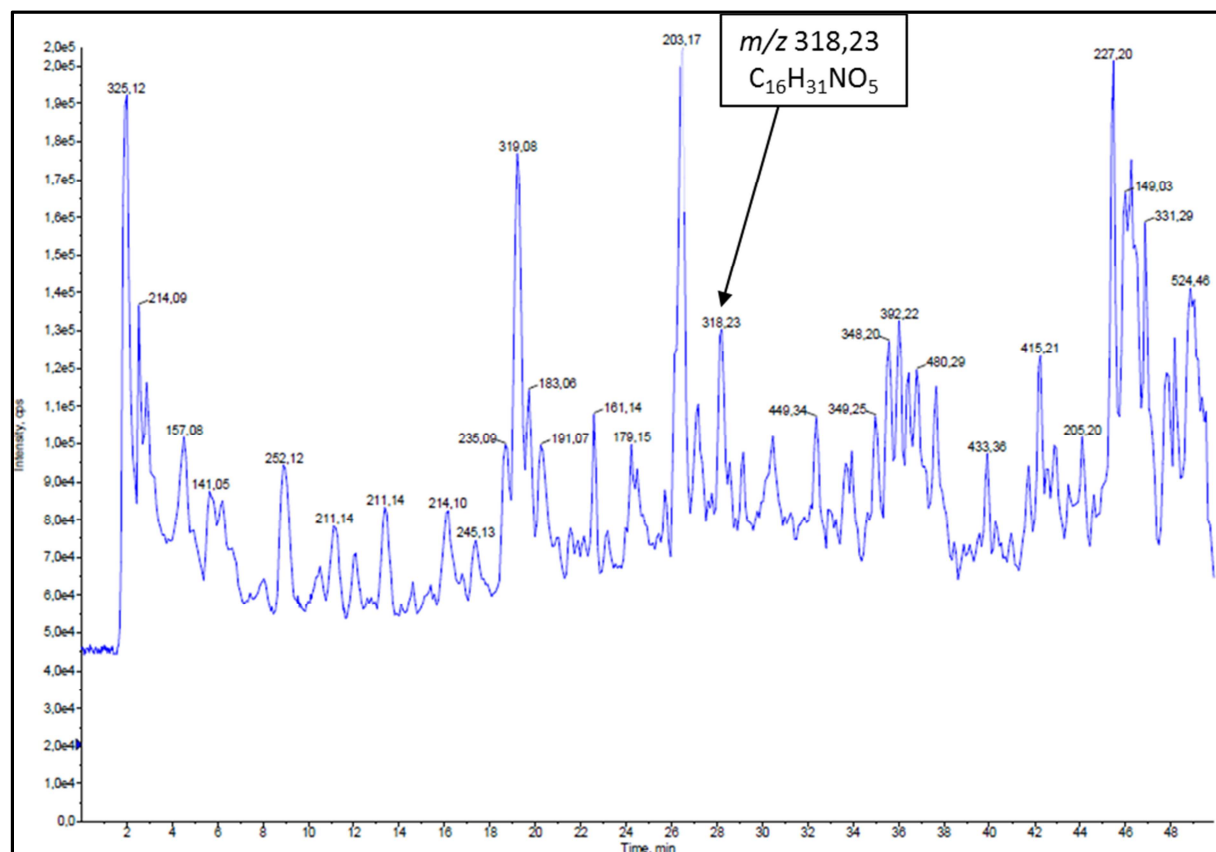


Fig. III.5. Profil métabolique LC/MS, en courant ionique total (TIC) de l'extrait du milieu de culture de B05.10.

Les résultats présentés ont été obtenus à partir de mycélium ayant été récupéré à l'issue de la culture de deux jours dans un milieu Siesler liquide carencé en azote. Le surnageant a été extrait à l'acétate d'éthyle (V/V) et la phase organique séchée sur sulfate de magnésium puis concentrée à l'évaporateur rotatif. L'extrait brut obtenu (5 mg) est analysé par LC/MS (colonne Zorbax Eclipse XDB Phenyl 100 x 1 mm, 3,5 μ m éluée avec un gradient eau/acétonitrile de 75/15 à 10/90 en 50 min en présence de 0,1% d'acide trifluoroacétique, et couplée à un spectromètre de masse Quadrupole-Time of flight (Q-TOF pulsar i, Applied Biosystems, France) équipé d'une source electrospray (ESI). Les ions ont été détectés dans une gamme m/z 120 à m/z 1200.

Pour compléter les résultats obtenus avec le mutant $\Delta Bcpks7$, nous avons adopté la stratégie opposée à la délétion qui consiste à surexprimer le gène. Pour cela, nous avons intégré, chez B05.10, un promoteur constitutif (*PoliC*) en amont de l'ORF de *Bcpks7* (**Fig.III.S1B**). Une analyse par RT-qPCR a confirmé la surexpression du gène d'un facteur six (**Fig. III.6**) chez un des transformants (*OE:Bcpks7 5.2*) au sein duquel la cassette a été intégrée au locus ciblé. Nous envisageons d'effectuer des analyses métaboliques sur cet individu dans le but de vérifier si le métabolite candidat y est surproduit.

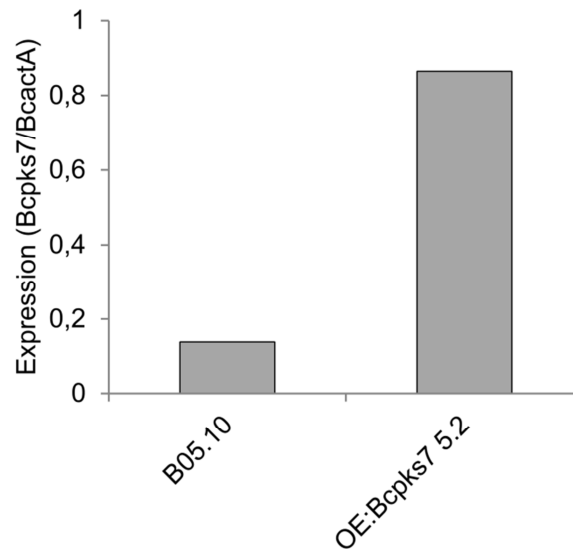


Fig. III.6. *Bcpks7* est surexprimé chez le *OE:Bcpks7* par rapport à B05.10.

Les résultats présentés ont été obtenus à partir de mycélium ayant été récupéré à l'issue de la culture de deux jours dans du Siesler liquide carencé en azote. Un unique réplicat biologique a été utilisé. Les résultats ont été obtenus en utilisant la méthode du $2^{-\Delta Ct}$ (Livak et Schmittgen, 2001) en utilisant *BcactA* comme référence.

Discussion

1. Peu de métabolites issus de PKS-NRPS fongiques sont connus

L'étude des métabolites secondaires représente un enjeu important pour comprendre leur rôle dans le cycle de vie des champignons mais aussi dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules utiles pour l'Homme. Ces dernières peuvent effectivement être utilisées pour l'industrie ou pour la recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes pour lutter contre les agents pathogènes des plantes mais aussi des animaux et des humains. A l'heure actuelle, moins d'une vingtaine de molécules hybrides PK-NRP a été associée à des clusters de gènes de biosynthèse chez les champignons (Boettger et Hertweck, 2013; Fisch, 2013). Parmi ces molécules, on retrouve notamment la toxine fusarine C de *Fusarium graminearum* ou l'agent immunosuppresseur pseurotine A d'*Aspergillus fumigatus*. Un métabolite issu d'un cluster comprenant une PKS-NRPS (Ace1) chez *Magnaporthe oryzae* est particulièrement recherché. Il s'agit d'un métabolite impliqué dans la reconnaissance spécifique du champignon par le cultivar résistant de riz contenant le gène de résistance *Pi33* (Böhnert *et al.*, 2004; Collemare *et al.*, 2008). Une étude récente suggère que le métabolite provenant de Ace1 n'est pas directement responsable de l'avirulence de *M. oryzae* sur le cultivar de riz *Pi33*. Il est ainsi possible que l'action des autres gènes du cluster soit requise pour former le métabolite impliqué dans ce phénomène. Il pourrait s'agir d'une cytochalasine (Song *et al.*, 2015).

2. Phénotype du $\Delta Bcpks7$

Chez *B. cinerea*, trois gènes putativement impliqués dans la production d'un métabolite hybride PK-NRP ont été prédits (*Bcpks3*, *Bcpks5* et *Bcpks7*; Cf. **partie 4 de l'Introduction générale**). Un de ces trois gènes se trouve à proximité de l'insertion de l'ADN-T d'*A. tumefaciens* dans un mutant (PA3450) obtenu dans le cadre de la création d'une banque de mutants (Giesbert *et al.*, 2011). Pour déterminer si le phénotype observé chez le mutant PA3450 était causé par l'absence putative de la production d'un métabolite par le cluster PKS7, nous avons entrepris l'inactivation du gène codant l'enzyme clé BcPks7. Le fait que le phénotype des mutants obtenus ne présente *a priori*

pas de différence significative par rapport à la souche sauvage en ce qui concerne l'aspect mycélien ou l'agressivité sur feuilles de haricot suggère que la délétion de *BcPKs7* ne valide pas l'insertion de l'ADN-T observé chez le mutant PA3450. Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. La première est que chez le mutant PA3450, l'insertion de l'ADN-T et la mutation sont indépendantes. Ce phénomène se produit dans environ 50% des cas (Blaise *et al.*, 2007; Giesbert *et al.*, 2011). La seconde hypothèse repose sur le fait qu'il est possible que l'insertion conduise à un phénotype différent du KO. Il serait alors intéressant d'étudier par exemple l'expression des différents gènes du cluster PKS7 chez le mutant PA3450 pour déterminer l'effet de l'insertion.

Le fait que les mutants générés lors de la première tentative présentaient un phénotype très marqué par rapport aux mutants générés par la suite avec la même construction suggère une différence génomique. La confirmation d'une unique insertion de la cassette par *Southern blot* chez les premiers mutants implique l'intervention d'une mutation supplémentaire indépendante de la cassette de délétion. Etant donné que ces derniers présentaient tous le même phénotype, il est probable que la mutation non-désirée soit apparue au sein même de la souche sauvage qui a servi de souche réceptrice lors de l'étape de transformation. D'après les informations que nous avons pu recueillir auprès de différents collègues, il n'est pas rare d'observer ce genre de phénomène chez *B. cinerea*. Néanmoins, les phénomènes qui sont responsables de ces observations sont inconnus. Il est possible que des gènes impliqués dans le développement (comme *Bcvel1*) subissent plus fréquemment que d'autres des mutations ponctuelles dans des conditions de laboratoire et résultent en ce type de phénotype.

3. Recherche et rôle du métabolite putativement produit par BcPKs7

En dépit des différences observées entre le mutant PA3450 et le $\Delta BcPKs7$ que nous avons généré, nous avons cherché à identifier le métabolite produit par BcPKs7 en collaboration avec Stéphane Mann qui travaille sur les PKS-NRPS fongiques. Pour cela, nous avons initié une analyse métabolique visant à comparer les composés produits par la souche sauvage B05.10 et le $\Delta BcPKs7$. L'utilisation de la LC/MS nous a permis d'identifier un candidat. La formule brute de ce dernier ($C_{16}H_{31}NO_5$) est cohérente avec le type de métabolite recherché. Pour compléter notre étude, il s'agit

maintenant d'isoler le composé candidat à partir de volumes de culture plus importants et de caractériser la structure de la molécule par RMN. Ces analyses nous permettront notamment de confirmer ou d'infirmer nos premiers résultats mais aussi de tester le rôle putatif du métabolite pour *B. cinerea* en appliquant par exemple directement ce composé sur différentes plantes ou microorganismes. Il est possible que le métabolite putatif qui résulte de l'action du cluster PKS7 soit impliqué dans le pouvoir pathogène de *B. cinerea* et que le $\Delta Bc\text{pks}7$ ne présente pas de différence d'agressivité avec B05.10 en raison du rôle redondant du métabolite putatif avec d'autres molécules comme le botrydial ou l'acide botcinique. Cette hypothèse de toxicité serait par ailleurs cohérente avec le fait que le métabolite putatif semble ne pouvoir être produit que par de rares espèces fongiques, toutes pathogènes.

4. Le cluster PKS7 : distribution, composition et régulation

Les données transcriptomiques présentées ici semblent indiquer que le cluster PKS7 pourrait se limiter aux gènes Bcin10g00010 à Bcin10g00040. Néanmoins, il n'est pas à exclure que la production du métabolite putatif nécessite l'intervention d'autres protéines comme par exemple une énoyle réductase (domaine ER *en trans*) (Boettger et Hertweck, 2013). Il est également possible que des enzymes interviennent dans la prise en charge et la modification du métabolite putativement produit par BcPks7. Effectivement, certains clusters du métabolisme secondaire sont divisés en plusieurs parties qui se trouvent à des loci différents au sein des génomes fongiques. C'est notamment le cas du cluster de synthèse des trichothécènes chez certaines espèces de *Fusarium* (Proctor *et al.*, 2009). Pour essayer d'identifier d'autres gènes faisant putativement partie du cluster PKS7, nous envisageons d'étudier les gènes voisins des quatre gènes du cluster PKS7 identifié chez d'autres espèces fongiques. La présence de gènes putativement impliqués dans la production d'un métabolite pourrait permettre l'identification des homologues chez *B. cinerea*. De plus, étant donné qu'aucun FT spécifique ne semble présent au sein du cluster PKS7, nous avons entrepris le clonage du promoteur de *Bc\text{pks}7* pour cribler notre banque de FTs en simple hybride. Pour cela, nous avons choisi, de la même façon que pour les *pBcbot6* et *pBcboa13* (Cf. Chapitre II), d'adopter une approche sans *a priori* et de cloner différentes parties du promoteur en prenant des régions chevauchantes (Fig. III.S2).

Ceci pourrait nous permettre d'identifier des facteurs directement impliqués dans la régulation de ce gène (et notamment d'un FT spécifique présent au sein du reste putatif du cluster) et donc de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la production du métabolite putatif.

Finalement, certains clusters du métabolisme secondaires ne semblent pas posséder de FTs spécifiques et sont régulés par des FTs globaux ainsi que par des mécanismes de régulation chromatinien (Brakhage, 2012). C'est par exemple le cas des clusters *ltm* (lolitrème) et *eas* (alcaloïdes de l'ergot) chez *Epichloë festucae*. Ces deux clusters sont tous les deux localisés en position sub-télomérique et sont notamment contrôlés par la triméthylation des H3K9 et H3K27 mises en place par les histones lysines méthyltransférases ClrD et EzhB (Chujo et Scott, 2014). Le cluster PKS7 est également localisé au niveau d'un subtélomère et il est probable que l'expression des gènes soit sous le contrôle de mécanismes chromatinien. Pour tester cette hypothèse, nous avons entrepris la caractérisation de modificateurs chromatinien putatifs (**Cf. Chapitre IV**).

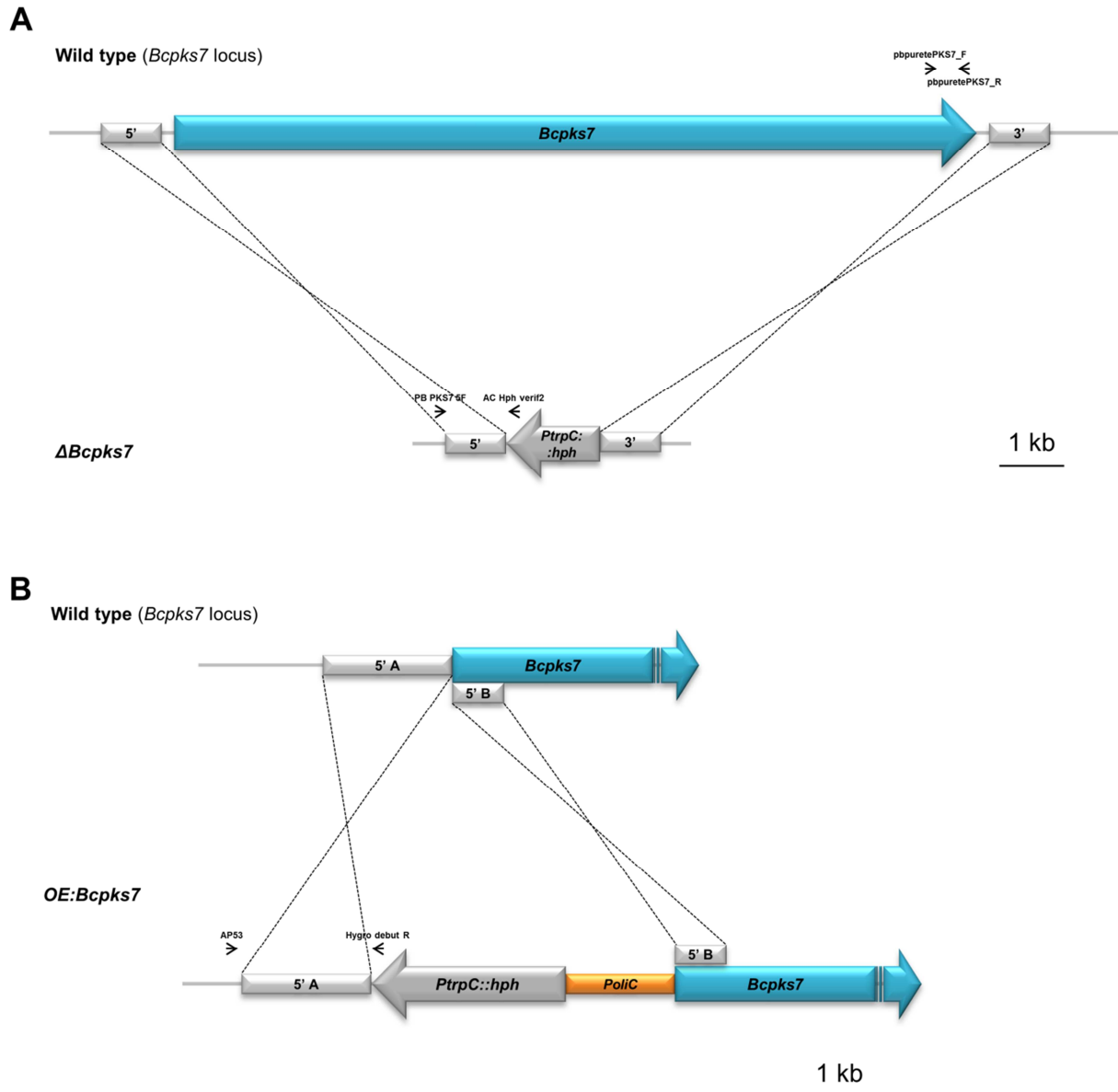


Fig. III.S1. Constructions générées pour la caractérisation de *Bcpks7*.

A. Le $\Delta Bcpks7$ a été généré en remplaçant l'ORF du gène par une cassette de résistance à l'hygromycine. Les amorces utilisées pour la construction du mutant sont présentées dans le **Tableau MM.1 (Matériels et méthodes)**. Les amorces utilisées pour la vérification du mutant sont représentées. **B.** Le transformant *OE:Bcpks7* a été obtenu en intégrant le *pOliC* en amont de l'ORF du gène. Pour cela, la partie 5' de *Bcpks7* a été amplifiée avec les amorces AP48/AP49, la cassette de résistance à l'hygromycine (*pTrpC:hph*) a été amplifiée avec les amorces hphR/hphF, le *pOliC* a été amplifié avec les amorces AP50/pOliCR et le début de l'ORF de *Bcpks7* a été amplifié avec les amorces AP51/AP52. Ces constructions ont été fusionnées et intégrées dans le pRS426 grâce aux queues chevauchantes présentes sur les différentes amorces. Pour plus d'informations, Cf. **Matériels et méthodes**.

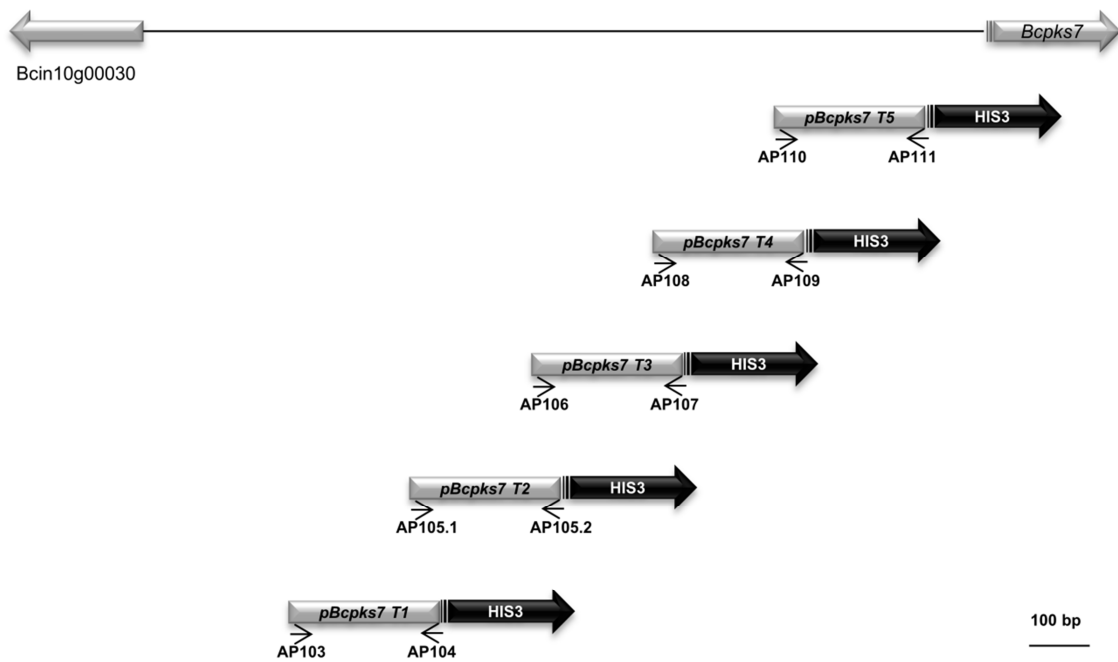


Fig. III.S2. Constructions générées pour le *pBcpks7* pour l’approche par simple hybride. Des troncations du *pBcpks7* ont été amplifiées et été fusionnées en amont du gène rapporteur HIS3 pour l’approche simple hybride. Les amorces utilisées sont représentées.

Chapitre IV

Régulation chromatinienne du métabolisme secondaire chez *B. cinerea*

Introduction

La régulation du métabolisme secondaire fongique est complexe et fait intervenir de nombreux acteurs agissant à différents niveaux hiérarchiques (Brakhage, 2012). Ces mécanismes ont déjà été abordés dans l'introduction de ce manuscrit et font intervenir les FTs spécifiques, les FTs globaux, les complexes protéiques (*e. g.* Velvet) mais aussi les modificateurs chromatinien.

La chromatine, qui est composée de nucléosomes (ADN enroulé autour d'un octamère d'histones), est une structure effectivement impliquée dans le contrôle de l'expression génique. Elle se présente sous deux formes : l'euchromatine et l'hétérochromatine. L'euchromatine correspondant à un état relâché de la chromatine permettant la fixation des FTs alors que l'hétérochromatine correspond à une structure condensée répressive à l'initiation de la transcription. La chromatine est une structure dynamique qui rend possible le passage de l'une des formes à l'autre et *vice versa*. La modification de la structure chromatinienne a précédemment été démontrée comme résultant notamment de l'ajout de modifications post-traductionnelles (principalement des méthylations et des acétylations) au niveau des queues N-terminales des histones (Kouzarides, 2007a). On parle alors de code histone (Jenuwein et Allis, 2001). Les protéines responsables de l'ajout ou de la suppression de ces marques sont communément appelées modificateurs chromatinien (Rice et Allis, 2001).

De nombreux modificateurs chromatinien régulant l'expression des gènes, notamment impliqués dans le métabolisme secondaire, ont été caractérisés chez différents champignons (*e. g.* *Epichloë festucae*, *Fusarium graminearum* ou encore divers Aspergilli). On retrouve des protéines appartenant à différentes familles et présentant donc des rôles variés. Il y a ainsi des histones méthyltransférases (Reyes-Dominguez *et al.*, 2010; Connolly *et al.*, 2013), des histones déméthylases (Gacek-Matthews *et al.*, 2015), des histones acétyltransférases (Soukup *et al.*, 2012) ou encore des histones déacétylases (Shwab *et al.*, 2007). Il ressort de ces études que plusieurs marques sont impliquées dans les mécanismes d'activation / de répression des clusters du métabolisme fongique. Ainsi, la triméthylation des H3K9 et H3K27 est généralement impliquée dans la formation d'hétérochromatine et donc dans la répression de l'expression des gènes (Reyes-Dominguez *et al.*,

2010; Connolly *et al.*, 2013; Studt, Rösler, *et al.*, 2016). A l'inverse, la méthylation des H3K4 est en général impliquée dans l'activation de la transcription (Liu *et al.*, 2015; Gacek-Matthews *et al.*, 2016).

Ce sont Rea et ses collaborateurs (2000) qui ont pour la première fois démontré l'activité d'une histone (lysine) méthyltransférase. Il s'agissait des homologues de KMT1 chez l'Homme (SUV39H1) et chez la souris (Suv39h) qui agissent au niveau des H3K9. Les protéines de la famille de KMT1 sont responsables de la triméthylation des H3K9 (Cf. **Tableau IV.1** pour des exemples chez les champignons). La première de ces protéines fongiques à avoir été caractérisée est DIM-5 chez *N. crassa* (Tamaru et Selker, 2003). La triméthylation des H3K9 par cette protéine mène, *via* le recrutement successif de l'hétérochromatine protéine 1 (HP1, codée par *hpo*) et l'ADN méthyltransférase DIM-2, à la formation d'hétérochromatine (Freitag *et al.*, 2004 ; Cf. **Introduction générale**). Chez *A. nidulans*, l'inactivation de *clrD* et de *hepA* (les homologues de *dim-5* et *hpo*) mène à la surexpression de gènes des clusters de la stérigmatocystine et de la pénicilline (Reyes-Dominguez *et al.*, 2010). De façon similaire, la délétion de l'homologue de *hpo* (*Hep1*) chez *F. graminearum* entraîne une surexpression du cluster de l'aurofusarine et la surproduction conséquente du métabolite (Reyes-Dominguez *et al.*, 2012). Les mécanismes de régulation par la voie impliquant DIM-5 et HP1 semblent ainsi conservés en ce qui concerne la régulation du métabolisme secondaire de ces espèces (**Tableau IV.1**).

Tableau IV.1. Exemple de modificateurs chromatiniens fongiques caractérisés liés à la méthylation des lysines H3K9 et H3K27 chez les champignons filamenteux.

Famille	Espèce	Gène / Protéine	Phénotype des mutants (déletion ou RNAi)	Effet de l'inactivation sur le métabolisme secondaire / les effecteurs protéiques	Analyse de la structure chromatinienne par ChIPseq
KMT1 (triméthylation des H3K9)	<i>Neurospora crassa</i>	<i>dim-5</i> / DIM-5 (Tamaru et Selker, 2001)	Croissance réduite, moins de spores produites		Oui (Jamieson <i>et al.</i> , 2016)
	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>clrD</i> / ClrD (Reyes-Dominguez <i>et al.</i> , 2010)	Pas de modification	Sur-expression du cluster ST et surproduction du métabolite	Oui, ChIP-qPCR (Reyes-Dominguez <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Leptosphaeria maculans brassicae</i>	<i>LmDIM5</i> /LmDIM5 (Soyer <i>et al.</i> , 2014)	Croissance et agressivité réduite	Surexpression de gènes codant notamment des effecteurs protéiques	Oui (Soyer, communication personnelle)
	<i>Epichloë festucae</i>	<i>clrD</i> / ClrD (Chujo et Scott, 2014)	Croissance et morphologie altérées, capacité à coloniser des plants de Ray-grass réduite	Sur-expression de certains gènes des clusters <i>ltm</i> et <i>eas</i> mais pas de sur-production des métabolites	Oui, ChIP-qPCR (Chujo et Scott, 2014)
	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Bcdim-5</i> / BcDim-5 (Zhang <i>et al.</i> , 2016)	Croissance et agressivité réduites, production de conidies et de sclérotes affectée*	Sous-expression de gènes impliqués dans le pouvoir pathogène, notamment dans le métabolisme secondaire	Non
HP1 (lecture des H3K9me3)	<i>Neurospora crassa</i>	<i>hpo</i> / HP1 (Freitag <i>et al.</i> , 2004)	Croissance réduite, moins de spores produites		Oui (Jamieson <i>et al.</i> , 2016)
	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>hepA</i> / HepA (Reyes-Dominguez <i>et al.</i> , 2010)	Pas de modification	Augmentation de l'expression et de la production de plusieurs MSs	Oui, ChIP-qPCR (Reyes-Dominguez <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Leptosphaeria maculans brassicae</i>	<i>LmHP1</i> /LmHP1 (Soyer <i>et al.</i> , 2014)	Croissance réduite	Surexpression de gènes codant des effecteurs protéiques	Oui (Soyer, communication personnelle)
	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Hep1</i> / HEP1 (Reyes-Dominguez <i>et al.</i> , 2012)	Pas de modification	Sur- et sous-expression de gènes du métabolisme secondaires et sur- ou sous-production des métabolites	Oui, ChIP-qPCR (Reyes-Dominguez <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Bchp1</i> / BcHp1 (Zhang <i>et al.</i> , 2016)	Pas de modification		Non
KMT6 (triméthylation des H3K27)	<i>Neurospora crassa</i>	<i>set-7</i> / SET-7 (Jamieson <i>et al.</i> , 2013)	Pas de modification		Oui (Jamieson <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Aspergillus nidulans</i>	absent			
	<i>Fusarium fujikuroi</i>	<i>KMT6</i> / Kmt6 (Studt, Rösler, <i>et al.</i> , 2016)	Croissance et développement asexué affectés	Surexpression de clusters du métabolisme secondaire et surproduction de métabolites	Oui (Studt, Rösler, <i>et al.</i> , 2016)
	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>kmt6</i> / KMT6 (Connolly <i>et al.</i> , 2013)	Croissance et morphologie altérée, stérilité	Surexpression de clusters du métabolisme secondaire et surproduction de métabolites	Oui (Connolly <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Epichloë festucae</i>	<i>ezhB</i> / EzhB (Chujo et Scott, 2014)	Tallage et biomasse racinaire augmentés chez les plantes infectées	Sur-expression de certains gènes des clusters <i>ltm</i> et <i>eas</i> mais pas de sur-production des métabolites <i>in vitro</i> , sur-expression de gènes <i>eas</i> et surproduction d'alcaloïdes <i>in planta</i>	Oui, ChIP-qPCR (Chujo et Scott, 2014)
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Bckmt6</i> / BcKmt6				

ST, stérigmatocystine ; *ltm*, lolitremé ; *eas*, alcaloïdes de l'ergot ; * résultats non confirmés par notre étude.

En parallèle de la voie impliquant les H3K9me3, l'hétérochromatine peut également être formée à partir des H3K27me3. Chez la drosophile, la triméthylation des H3K27 implique un complexe multimérique nommé Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2). Ce complexe est composé de quatre protéines conservées dont une histone méthyltransférase (nommée E(Z) (Enhancer of Zeste) chez *D. melanogaster*) (Shaver *et al.*, 2010). Cette protéine a pour la première fois été mise en évidence comme un régulateur négatif de l'expression de gènes homéotiques (Jones et Gelbart, 1993). PRC2 est absent chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces pombe* mais aussi chez les *Aspergilli* et *Ustilago maydis* (Shaver *et al.*, 2010; Connolly *et al.*, 2013) chez qui les H3K27me3 ne sont pas présentes. Ce complexe est en revanche présent chez plusieurs espèces fongiques. L'histone méthyltransférase nommée KMT6 (lysine méthyltransférase) a été caractérisée chez deux espèces de *Fusarium* (Connolly *et al.*, 2013; Studt, Rösler, *et al.*, 2016) ainsi que chez *Epichloë festucae* (Chujo et Scott, 2014). D'après ces études, elle serait notamment impliquée dans la répression de clusters du métabolisme secondaire et la délétion du gène mène à la surexpression et la production de métabolites cryptiques situés dans des régions enrichies en H3K27me3 chez la souche sauvage.

L'activité des modificateurs chromatiniens présentée ci-dessus repose sur la présence de domaines caractéristiques. Ainsi, les histones méthyltransférases possèdent un domaine SET (IPR001214). Ce domaine conservé au cours de l'évolution a dans un premier temps été caractérisé comme un motif commun aux protéines identifiées chez *Drosophila melanogaster* (Jenuwein *et al.*, 1998). Ces protéines sont SU(VAR)3-9 (Suppressor of variegation 3-9 ; Tschiersch *et al.*, 1994), E(Z) (Enhancer of Zeste) du groupe Polycomb (Jones et Gelbart, 1993) et TRX (régulateur de gènes homéotiques du groupe de protéines trithorax ; Stassen *et al.*, 1995). Rea *et al.* (2000) ont ensuite démontré que le domaine SET était impliqué dans l'activité catalytique chez les histones méthyltransférases. De plus, les domaines pre-SET (IPR007728) et post-SET (IPR003616) ont été démontrés comme nécessaires à l'activité des protéines de la famille KMT1. Chez les protéines de la famille de KMT6, le domaine SET est associé à un domaine CXC (IPR026489). Ce dernier est composé de motifs répétés riches en cystéines (Hobert *et al.*, 1996) et est important pour la reconnaissance du substrat et l'activité enzymatique. En ce qui concerne la protéine lectrice HP1, la

présence des domaines caractéristiques Chromo (IPR000953) et Chromo-Shadow (IPR008251) permet respectivement la fixation au niveau des histones méthylées (Nielsen *et al.*, 2002) et l'agrégation des protéines HP1 entre elles entraînant ainsi une compaction de la chromatine (Yamamoto et Sonoda, 2003).

Dans le cadre de nos études précédentes (**Chapitres I, II et III**), la localisation génomique ainsi que la composition des régions contenant les clusters BOT, BOA et PKS7 nous ont amené à émettre l'hypothèse d'une régulation chromatinienne. Ainsi, nous avons voulu déterminer ici si les acteurs DIM-5, HP1 et KMT6 impliqués dans la régulation du métabolisme secondaire chez d'autres espèces fongiques pouvaient également avoir un rôle dans la régulation des clusters chez *B. cinerea*. Plus particulièrement, nous nous sommes intéressés aux gènes impliqués dans la production de BOT, de BOA et du composé putativement produit par le cluster PKS7. Dans cet objectif, nous avons identifié et inactivé ces trois régulateurs chromatinien putatifs. Dans le cadre d'expérimentations préliminaires, nous avons par la suite analysé l'expression de gènes du métabolisme secondaire chez ces transformants. Finalement, nous avons initié la caractérisation phénotypique des mutants.

Résultats

1. Les orthologues des gènes *dim-5*, *hpo* et *set-7* sont présents chez *B. cinerea*

Dans le but d'identifier les homologues chez *B. cinerea* de *dim-5*, *hpo* et *set-7* de *N. crassa*, nous avons procédé à des analyses par BlastP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) en utilisant les séquences des protéines correspondantes. BcDim5, BcHp1 et BcKmt6 (respectivement Bcin11g02360, Bcin13g05340 et Bcin06g04490 et donc les gènes correspondant) ont été identifiées par BDBH (bidirectional best hit). L'identification des candidats a été confirmée par l'utilisation de FungiPath (<http://fungipath.i2bc.paris-saclay.fr/ortho.php>), un outil permettant l'identification d'homologues. Les protéines de *B. cinerea* présentent respectivement 50, 48 et 29 % d'identité par rapport aux homologues de *N. crassa*. Elles présentent de plus les domaines caractéristiques des familles auxquelles elles appartiennent (**Fig. IV.1**). Ainsi, *Bcdim-5* code une protéine prédite de 308 acides aminés qui possède les domaines caractéristiques des histones lysine méthyltransférases, soient les

domaines Pre-SET (IPR007728), SET (IPR001214) et Post-SET (IPR003616). *Bchp1* code une protéine prédite de 243 acides aminés qui présente un domaine Chromo (IPR000953) en partie N-terminale et un domaine Chromo-shadow (IPR008251) en C-terminale. Le gène *kmt6* identifié chez *B. cinerea*, *Bckmt6*, code une protéine prédite possédant des domaines CXC (IPR026489 ; spécifique au groupe de protéines Polycomb) et SET (IPR001214).

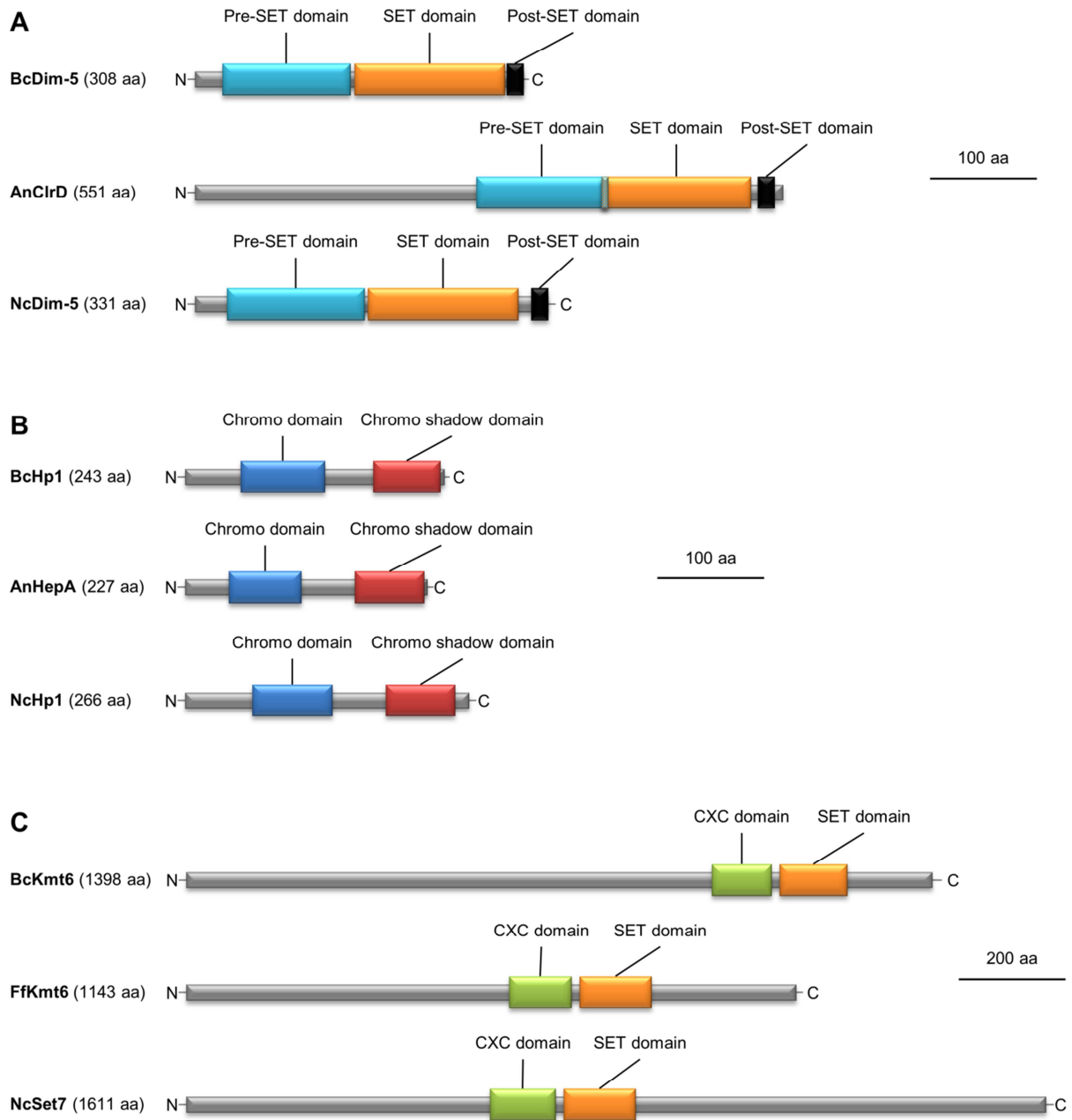


Fig. IV.1. Les protéines prédites BcDim5, BcHp1 et BcKmt6 présentent les domaines caractéristiques similaires aux homologues caractérisés chez d'autres espèces fongiques.

BcDim-5 (A), BcHp1 (B) et BcKmt6 (C) sont représentées en parallèle des homologues caractérisés chez d'autres espèces fongiques. Les domaines ont été prédits avec InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>). Les accès IPR sont les suivantes : Pre-SET domain (IPR007728) ; SET domain (IPR001214) ; Post-SET domain (IPR003616) ; Chromo domain (IPR000953) ; Chromo-shadow domain (IPR008251) ; CXC domain (IPR026489).

2. *Bcdim-5*, *Bchp1* et *Bckmt6* sont dispensables au développement de B05.10

Afin d'étudier le rôle de certains modificateurs chromatinien putatifs chez B05.10, nous avons procédé à l'inactivation des gènes d'intérêt.

2.1. Délétion de *Bcdim-5*

La délétion de *Bcdim-5* a été réalisée en deux étapes. Une première série d'inactivation avait été réalisée (construction 1 sur **Fig. IV.2A**) en cherchant à remplacer l'ORF de *Bcdim-5* par une cassette de résistance à la nouséothricine (*pOliC:nat1*). Néanmoins, seuls trois transformants ayant intégré la cassette de résistance ont pu être obtenus. Les analyses moléculaires n'ont pas permis de démontrer une insertion au locus ciblé et pourraient suggérer une insertion ectopique. Les trois transformants présentaient un phénotype très affecté (très faible vitesse de croissance et aspect du mycélium). A la suite de ces observations, nous avons émis l'hypothèse que la courte séquence utilisée pour la recombinaison homologe en amont du gène à inactiver n'ait pas permis l'insertion correcte de la cassette de résistance. Pour contourner ce problème supposé, nous avons généré une nouvelle cassette (construction 2 sur **Fig. IV. 2A et Fig. IV.S1A**) en prenant cette fois une séquence plus longue pour la recombinaison homologe incluant le premiers exon et intron de *Bcdim-5*. Cette nouvelle construction impliquait alors de déléter uniquement les deux derniers exons de *Bcdim-5* prédits pour coder les domaines impliqués dans l'activité des histones méthyltransférases. La transformation avec cette construction a mené à l'obtention de plus de dix transformants. Après un clonage monospore, des homocaryons ayant inséré la cassette au locus ciblé ont été obtenus pour quatre mutants. Une analyse par Southern blot a démontré que la cassette de résistance a été insérée en une unique copie au locus ciblé chez les trois mutants testés (**Fig. IV. S1C**).

Au niveau macroscopique, la délétion de *Bcdim-5* n'entraîne pas de différence avec la souche sauvage. En effet, les $\Delta Bcdim-5$ ne présentent pas de défaut de croissance sur ML et produisent des conidies et des sclérotas respectivement à la lumière et à l'obscurité. De plus, l'inoculation de feuilles de haricot détachées avec les $\Delta Bcdim-5$ n'entraîne pas de diminution de la taille des nécroses par rapport à B05.10 (**Fig. IV.3**).

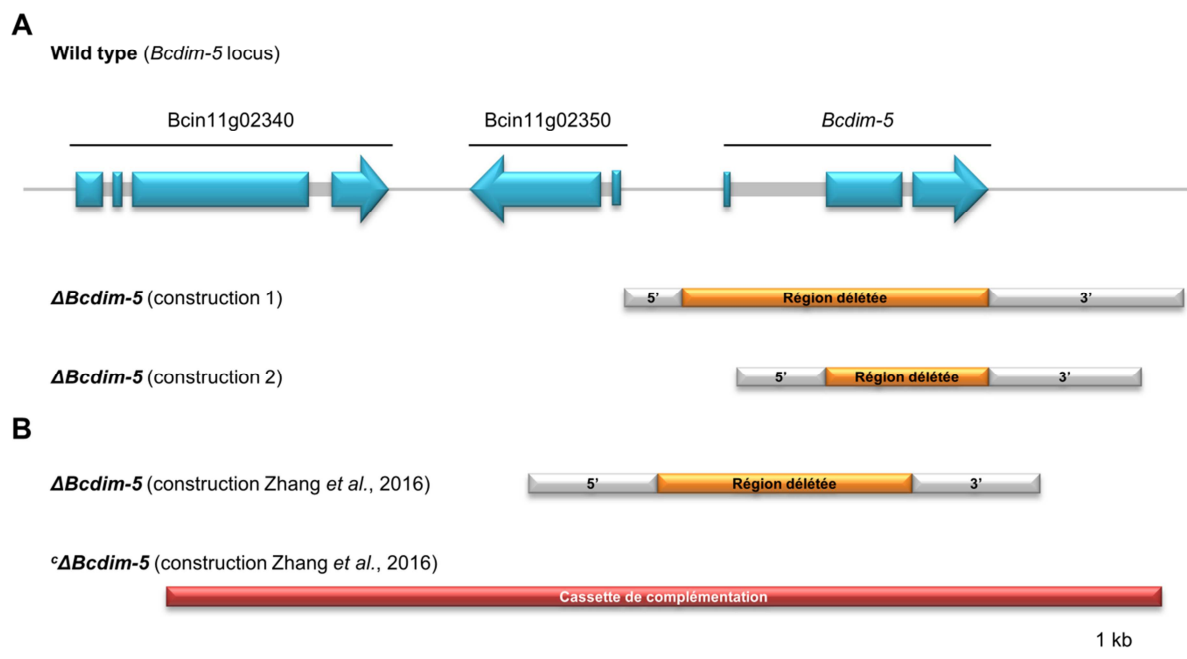


Fig. IV.2. Constructions utilisées pour l'inactivation de *Bcdim-5*.

A. Nous avons mené l'inactivation de *Bcdim-5* en utilisant deux constructions différentes (1 et 2). **B.** Les constructions utilisées par Zhang *et al.* (2016) pour la délétion *Bcdim-5* et la complémentation ectopique sont représentées. Les régions 5' et 3' représentées en gris sont les régions utilisées pour la recombinaison homologue. La région déléetée suite à l'insertion de la cassette est représentée en orange.

2.2. Délétion de *Bchp1*

Pour l'inactivation de *Bchp1*, l'ORF du gène a été remplacé par une cassette de résistance à l'hygromycine (**Fig. IV.S1B**). Plus de dix transformants ont été obtenus. Après deux clonages monospores, les vérifications moléculaires ont permis d'identifier six homocaryons indépendants au sein desquels la cassette a été intégrée au locus ciblé. Néanmoins, l'analyse par Southern blot (**Fig. IV.S1C**) n'a pas permis d'identifier d'individu ayant inséré une copie de la cassette de résistance parmi les trois Δ *Bchp1* testés. Une analyse des autres mutants disponibles sera effectuée pour identifier un événement d'insertion unique de la cassette.

De la même façon que pour les résultats obtenus avec la délétion de *Bcdim-5*, l'inactivation de *Bchp1* n'a mené à l'observation d'aucune différence par rapport à B05.10 en ce qui concerne la vitesse

de croissance, l'aspect du mycélium, la production de conidies et de sclérotés ou encore l'agressivité (Fig. IV.3).

2.3. Déléation de *Bckmt6*

L'inactivation de *Bckmt6* a été réalisée en remplaçant l'ORF du gène par une cassette de résistance à l'hygromycine (Fig. IV.S2). Une première série de transformation a permis d'obtenir plus de dix transformants. Après vérification de l'insertion de la cassette d'inactivation au locus ciblé, cinq transformants ont été conservés pour l'obtention d'homocaryons. Néanmoins, trois clonages monospores menés sur les cinq transformants n'ont permis d'obtenir qu'un seul transformant homocaryotique. Une seconde transformation a été effectuée. Après trois clonages monospores, deux nouveaux homocaryons indépendants chez qui la cassette de résistance a été intégrée au locus ciblé ont été obtenus. Ces $\Delta Bckmt6$ devront être vérifiés par Southern blot pour confirmer l'insertion d'une unique copie de la cassette.

Les trois $\Delta Bckmt6$ ont été étudiés au niveau développemental (croissance, production de conidies et de sclérotés). Aucune différence significative n'a été observée dans les conditions testées. De plus, la déléation de ce gène ne mène pas, d'après nos résultats, à une modification de l'agressivité en comparaison de B05.10 (Fig. IV.3).

3. L'expression des gènes du métabolisme secondaire semble affectée chez les $\Delta Bcdim-5$, $\Delta Bchp1$ et $\Delta Bckmt6$.

Pour étudier l'influence sur le métabolisme secondaire des modificateurs chromatiniens putatifs étudiés, nous avons analysé l'expression de certains gènes par RT-qPCR chez les mutants générés. Nous nous sommes intéressés à l'expression de quatre gènes, *Bcbot2*, *Bcboa6* et *Bcboa9* ainsi que *Bcpks7* qui sont impliqués dans la production de BOT, BOA et d'un métabolite putatif. Pour optimiser nos chances d'observer une différence entre B05.10 et les différents mutants, nous avons analysé l'expression des quatre gènes du métabolisme secondaire chez des individus ayant poussé sur

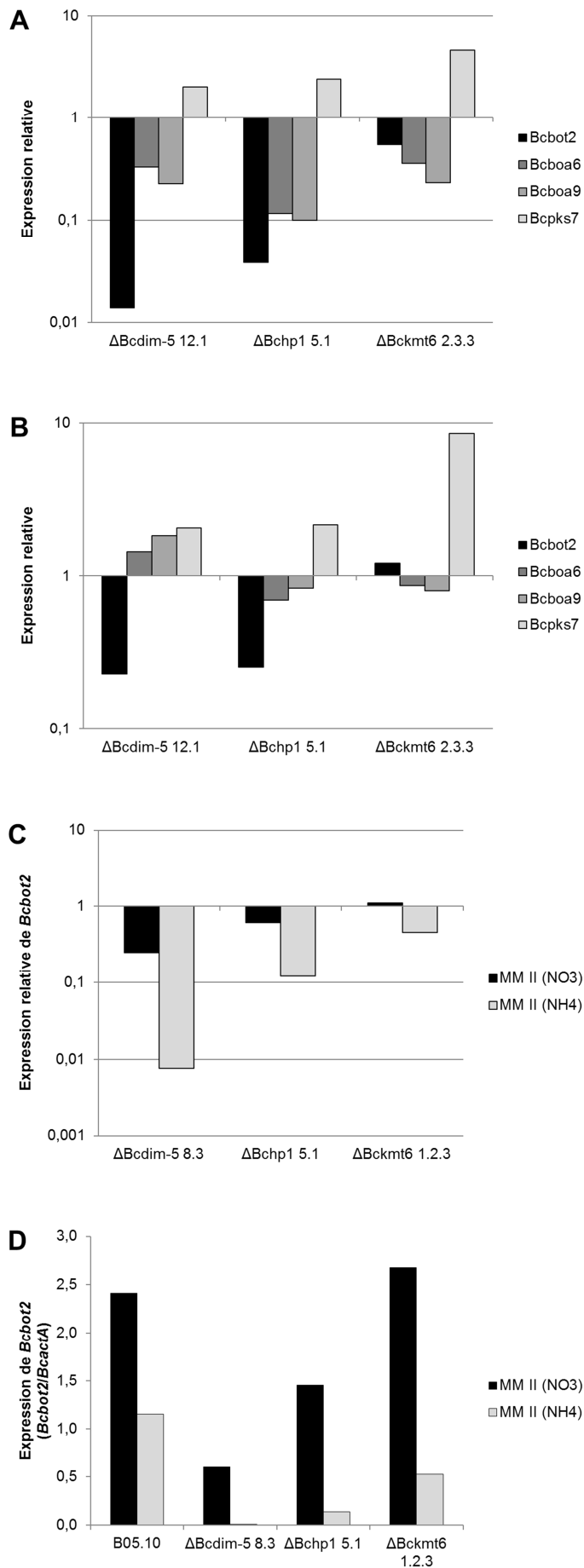


Fig. IV. 3. L'expression de gènes du métabolisme secondaire est affectée par la délétion de *Bcdim-5*, *Bchp1* et *Bckmt6*.

A. Analyse de l'expression de gènes du métabolisme secondaire chez des individus ayant été cultivés sur JDR. **B.** Analyse de l'expression de gènes du métabolisme secondaire chez des individus ayant été cultivés sur ML. **C.** et **D.** Analyse de l'expression de *Bcbot2* sur les milieux indiqués. Des suspensions de conidies (10^6 conidies/mL) ont été préparées pour les différents individus étudiés. 300 μ L de ces suspensions ont été étalées sur une feuille de cellophane déposée sur les milieux indiqués. Après 48 h de culture à 23°C en chambre climatique avec une alternance de 14 h d'obscurité et 10 h de lumière blanche, le jeune mycélium a été récupéré et utilisé pour la préparation des échantillons. Les résultats présentés ont été obtenus à partir d'un répliquât biologique d'après la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (**A**, **B** et **C**) ou $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (**D**) (Livak et Schmittgen, 2001) en utilisant la souche sauvage B05.10 en contrôle et le gène *BcactA* (Bcin16g02020) en référence.

les milieux ML et JDR. Ces milieux ont été choisis en raison de l'expression contrastée des gènes du métabolisme secondaire entre un milieu riche (ML) et le milieu JDR qui mime l'infection (Viaud *et al.*, 2016). De plus, nous avons démontré précédemment que *Bcbot2* était sous-exprimé sur MM II (NH₄) par rapport au milieu MM II (NO₃) (Porquier *et al.*, 2016). Nous avons donc étudié l'expression de ce gène chez B05.10 et les différents mutants ayant été cultivés sur MM II (NO₃) et MM II (NH₄) (**Fig. IV.4C et D**).

Il est à noter que les résultats présentés en **Fig. IV.4** ont été obtenus à partir d'un unique répliquât biologique. Ainsi, des répétitions devront être réalisées pour démontrer de façon significative les différences et effets observés.

Le $\Delta Bcdim-5$ 12.1 a été utilisé pour déterminer l'expression des gènes du métabolisme secondaire sur ML et JDR et le $\Delta Bcdim-5$ 8.3 a été utilisé pour l'analyse sur les milieux MM II (NO₃) et MM II (NH₄). Les résultats obtenus avec ces deux mutants semblent confirmer qu'en l'absence de *BcDim-5*, *Bcbot2* est sous-exprimé sur les milieux JDR et MM II (NH₄) par un facteur d'environ 100 (**Fig. IV.3**). Pour les gènes *Bcboa6* et *Bcboa9*, une faible sous-expression est observée sur JDR. Néanmoins, l'utilisation d'un unique répliquât biologique et la faible intensité de cette différence ne nous permet pas de conclure quant à un rôle activateur de *BcDim-5* chez B05.10. La délétion de *Bcdim-5* n'entraîne pas de différence significative de l'expression de *Bcpks7* par rapport à B05.10.

Les résultats obtenus pour le $\Delta Bchp1$ 5.1 sont similaires à ceux des $\Delta Bcdim-5$. La sous-expression observée sur le milieu MM II (NH₄) est cependant moins importante (facteur d'environ 10). De plus, les gènes *Bcboa* étudiés sont également sous-exprimés (par 10) sur milieu JDR par rapport à la souche sauvage. L'expression de *Bcpks7* n'est en revanche pas affectée.

A l'inverse des $\Delta Bcdim-5$ et $\Delta Bchp1$, la délétion de *Bckmt6* ne semble pas avoir d'effet sur les gènes *Bcbot* et *Bcboa*. En revanche, le $\Delta Bckmt6$ 2.3.3 présente une surexpression de *Bcpks7* sur milieu ML (facteur 9) et en moindre mesure sur milieu JDR.

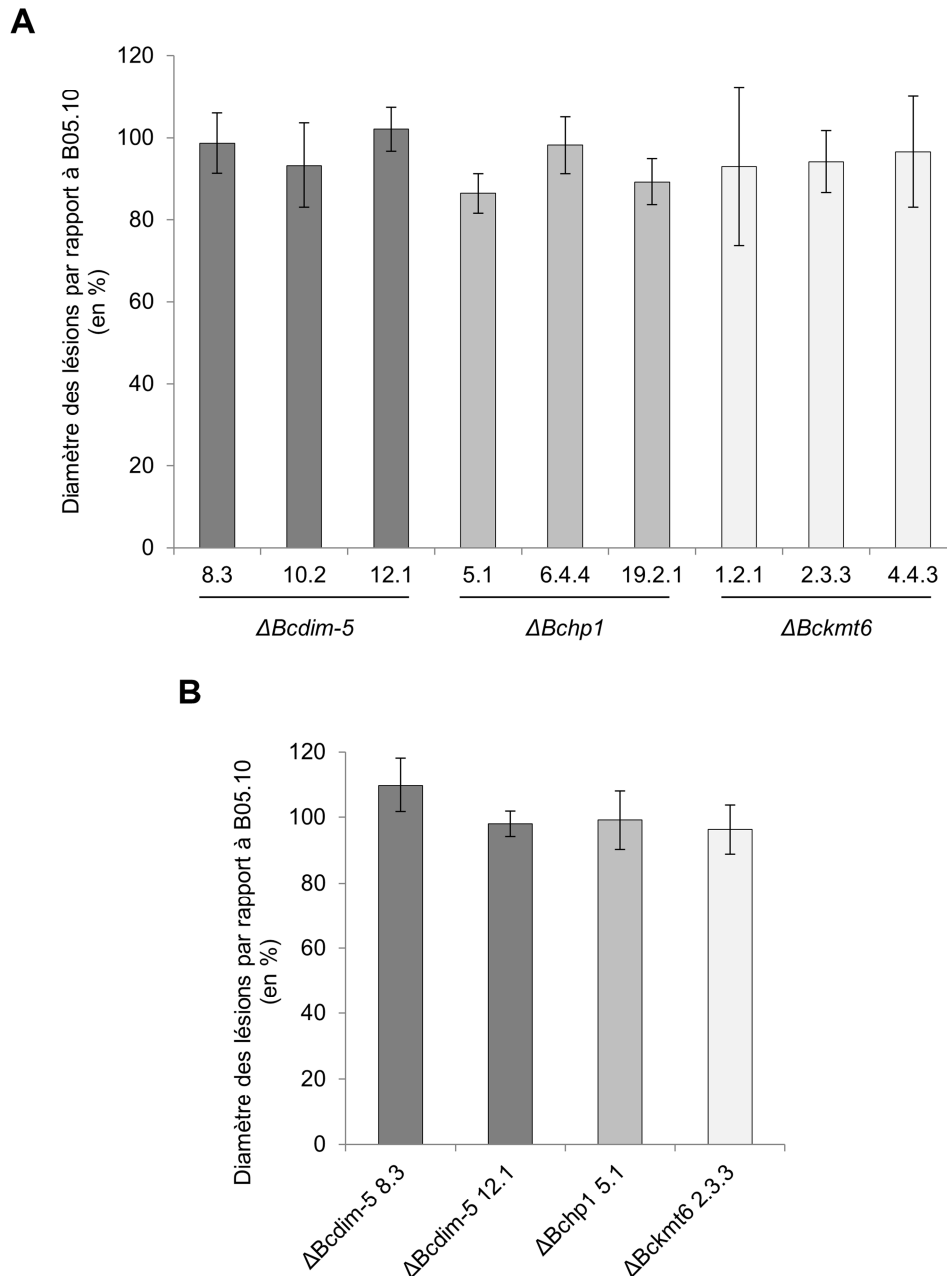


Fig. IV. 4. La délétion de *Bcdim-5*, *Bchp1* et *Bckmt6* ne semble pas affecter l'agressivité par rapport à la souche sauvage.

Des plugs de mycélium (3 jours sur ML) (A) ou 10 μ l de suspensions de conidies (10^5 conidies/ml) (B) ont été déposés sur feuilles détachées de haricot. Les feuilles inoculées ont été placées dans des boîtes plastiques contenant un tissu humide pour maintenir une atmosphère humide. Les boîtes ont été mises en chambre climatique (hygrométrie de 75 %) avec une alternance de 16 h de lumière à 22°C et 8 h d'obscurité à 18°C. Chaque feuille a été infectée par un dépôt de mutant et un dépôt de B05.10. Les valeurs ont été obtenues en calculant le pourcentage du diamètre des lésions induites par le mutant par rapport à B05.10. **A.** Les résultats ont été calculés après 3 jours d'incubation à partir de 8 feuilles (et donc 8 lésions) par mutant. **B.** Les résultats présentés ont été obtenus avec des mesures effectuées après 5 jours d'incubation et à partir de 4 feuilles par mutant. Les barres d'erreurs représentent les écarts types. Des analyses statistiques (test de Wilcoxon) n'ont pas permis de déterminer de différence significative ($p \leq 0.01$) entre les symptômes induits par les mutants et la souche sauvage.

Discussion

Les domaines ainsi que la fonction enzymatique des protéines DIM-5 et HP1 sont conservés chez les eucaryotes. Il en est de même pour les organismes qui possèdent un homologue de KMT6. Chez *B. cinerea*, l'homologue identifié de DIM-5 (BcDim-5) possède les domaines caractéristiques des protéines de la famille KMT1 (DIM-5, Clr4 et Su(var)3-9). Il s'agit des domaines Pre-SET, SET et Post-SET (Cheng *et al.*, 2005). Pour BcHp1, les domaines chromo-shadow et chromo sont présents. En ce qui concerne KMT6, les deux domaines essentiels à l'activité d'histone méthyltransférase (CXC et SET) et conservés chez tous les homologues (E(z) chez *D. melanogaster* (Margueron et Reinberg, 2011), EZH2 chez l'humain (Simon et Kingston, 2009), et Kmt6 chez *F. graminearum* et *F. fujikoroii* (Connolly *et al.*, 2013; Studt, Rösler, *et al.*, 2016)), sont présents chez BcKmt6. La présence des domaines caractéristiques de ces différentes protéines suggère une conservation de structure et donc probablement de fonction enzymatique avec les protéines caractérisées notamment chez d'autres champignons filamenteux. Récemment, une étude portant sur la caractérisation de *Bcdim-5*, *Bchp1* et *Bcdim-2* a été publiée (Zhang *et al.*, 2016). Dans le cadre de ce travail, les auteurs ont montré par Western blot que les modifications H3K9me3 disparaissaient chez le $\Delta Bcdim-5$ et que BcDim-5 était donc responsable de la mise en place de cette marque. La fonction de cette protéine semble donc effectivement conservée chez *B. cinerea* par rapport aux autres organismes chez qui KMT1 a été caractérisée (Tamaru et Selker, 2001; Reyes-Dominguez *et al.*, 2010).

1. La délétion de *Bcdim-5*, *Bchp1* et *Bckmt6* n'entraîne pas de modification du phénotype de B05.10

La caractérisation des $\Delta Bcdim-5$, $\Delta Bchp1$ et $\Delta Bckmt6$ a été initiée lors de cette étude. Aucune différence n'a pu être observée en comparaison de B05.10 en ce qui concerne la vitesse de croissance et l'aspect du mycélium, la production de conidies et de sclérotas. De plus, aucune différence d'agressivité n'a été détectée sur feuilles de haricot détachées. Ces résultats semblent indiquer que BcDim-5, BcHp1 et BcKmt6 ne sont pas significativement impliqués dans le développement ou le pouvoir pathogène de B05.10. L'impact de la délétion de ces différents acteurs est variable selon les organismes.

Chez *N. crassa*, la délétion de *dim-5* entraîne un défaut de croissance (Tamaruet Selker, 2001). De plus, la production de spores est réduite et ces dernières sont non viables. A l'inverse, chez *A. nidulans*, la délétion et le silencing par ARNi de l'homologue de *dim-5* (*i. e. clrD*) n'entraîne pas de modification phénotypique par rapport à la souche sauvage.

En ce qui concerne *hp1*, la délétion chez *N. crassa* (*hpo*) entraîne un retard de croissance encore plus sévère que pour le $\Delta dim-5$ alors que chez *A. nidulans*, la délétion du gène n'a mené à l'observation d'aucune différence avec la souche sauvage (Reyes-Dominguez *et al.*, 2010).

Les souches délétées pour *kmt6* chez *F. graminearum* sont stériles, présentent des défauts morphologiques et sont affectées au niveau de la pigmentation (Connolly *et al.*, 2013). A *fortiori*, KMT6 semble indispensable au développement de *F. fujikoroï* puisqu'aucun transformant homocaryotique n'a pu être obtenu (Studt, Rösler, *et al.*, 2016). A l'inverse, chez *N. crassa*, la délétion de *set-7* n'entraîne aucune différence phénotypique avec la souche sauvage (Jamieson *et al.*, 2013).

2. $\Delta Bcdim-5$: différentes stratégies d'inactivation du gène conduisent à des phénotypes différents

Lors de la caractérisation de *Bcdim-5*, *Bchp1* et *Bcdim-2*, Zhang et ses collaborateurs (2016) ont mis en évidence que les $\Delta Bchp1$ et $\Delta Bcdim-2$ ne présentent pas de modification du phénotype (conidiation, production de sclérotés, agressivité) par rapport à la souche sauvage. Ces résultats sont en accord avec ce que nous avons pu observer pour le $\Delta Bchp1$ que nous avons généré. En revanche, d'après ces auteurs, la délétion de *Bcdim-5* mène à une altération importante du phénotype. Ainsi, le $\Delta Bcdim-5$ généré dans le cadre de leur étude présente un retard de croissance, une diminution de la masse mycélienne mais aussi une diminution de la production de conidies et des sclérotés. De plus, ce $\Delta Bcdim-5$ est très affecté dans son agressivité par rapport à B05.10. Ces résultats sont donc opposés à ce que nous avons pu relever dans nos expérimentations.

Notre hypothèse la plus probable pour expliquer ces résultats contrastés entre les deux équipes repose sur le choix de la construction utilisée pour l'inactivation de *Bcdim-5*. Pour générer nos mutants, nous avons effectivement choisi une région flanquante 5' (utilisée pour la recombinaison

homologue) qui n'incluait pas le gène proche en amont (Bcin11g02350) et qui était relativement éloignée de la région promotrice (**Fig. IV.2**). A l'inverse, la stratégie adoptée par Zhang et ses collaborateurs a consisté à utiliser une région flanquante 5' comprenant une partie importante de Bcin11g02350. De plus, la région inactivée par l'utilisation de cette cassette inclut le promoteur de Bcin11g02350. Or, ce gène est putativement impliqué dans la génération de l'ARN ribosomique 28S et est donc probablement important pour le bon développement de *B. cinerea*. Nous pensons que l'inactivation de *Bcdim-5* réalisée dans le cadre de l'étude de Zhang *et al.* a entraîné une modification de l'expression de ce gène soit (i) en ayant inséré une mutation (dans le gène ou dans sa partie promotrice non-délétée) lors de l'amplification par PCR pour la construction de la cassette de délétion ou (ii) en ayant délété une partie de la région promotrice nécessaire à l'expression du gène. Il ne serait alors pas étonnant que le phénotype des transformants soit affecté. De plus, pour compléter leur mutant, les auteurs de l'étude inséré ectopiquement une construction comprenant non seulement l'ORF de *Bcdim-5* mais aussi une région de 3 kb en amont (incluant donc l'ORF de Bcin11g02350) et 1 kb en aval du gène. La restauration partielle du phénotype du mutant pourrait donc s'expliquer par le fait que la cassette de complémentation contient une version fonctionnelle de Bcin11g02350. Pour confirmer que le $\Delta Bcdim-5$ que nous avons généré est correct, il serait particulièrement intéressant de vérifier l'absence des marques H3K9me3 par Western blot ou par ChIPseq. Le fait que ces marques soient absentes chez notre mutant suggérerait alors que l'affectation du phénotype observé par Zhang et ses collaborateurs ne résulte effectivement pas de la délétion de *Bcdim-5* (et de l'absence subséquente des H3K9me3) mais bien d'un autre évènement.

3. La délétion de *Bcdim-5* et *Bchp1* affecterait l'expression des gènes du métabolisme secondaire

L'objectif principal de la délétion de *Bcdim-5* et *Bchp1* reposait sur notre volonté d'étudier le rôle probable de ces modificateurs chromatinien putatifs sur l'expression de gènes du métabolisme secondaire. Ainsi, l'analyse de l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de BOT (*Bcbot2*), de BOA (*Bchoa6* et *Bchoa9*) et du métabolite putatif produit par le cluster PKS7 (*Bcps7*) a été effectuée chez les différents mutants. Nos données préliminaires suggèrent que l'effet le plus marquant entraîné

par la délétion de *Bcdim-5* et de *Bchp1* est la sous-expression de *Bcbot2* par rapport à la souche sauvage B05.10. De plus, il semblerait que les gènes *Bcboa6* et *Bcboa9* pourraient être sous-exprimés chez les $\Delta Bcdim-5$ et $\Delta Bchp1$ ayant été cultivés sur JDR. Les expérimentations devront être répétées pour être confirmées et mener à des résultats significatifs. De plus, la création d'une complémentation des mutants est prévue. Cependant, nous pensons qu'il est peu probable que la délétion de *Bcdim-5* et/ou *Bchp1* puisse mener à une sous-expression simultanée des deux clusters BOT et BOA *in planta* sans affecter l'agressivité des transformants. Effectivement, les deux toxines BOT et BOA ont un rôle redondant et quand aucune n'est produite, l'agressivité de B05.10 est réduite (Dalmais *et al.*, 2011). Il serait donc particulièrement intéressant d'étudier l'expression des deux clusters BOT et BOA chez les $\Delta Bcdim-5$ et $\Delta Bchp1$ lors de l'infection *in planta*.

Des analyses de l'expression de gènes impliqués dans le pouvoir pathogène de *B. cinerea* (notamment *Bcbot1*, *Bcbot2* et *Bcboa9*) ont été réalisées dans l'étude de Zhang *et al.* (2016). Les résultats montrent que chez le $\Delta Bcdim-5$, l'expression de l'ensemble des gènes testés est diminuée par rapport à la souche sauvage, ce qui suggère une régulation positive par BcDim-5 chez la souche sauvage. Ces résultats sont concordants pour l'expression de *Bcbot2* avec les données que nous avons obtenues par RT-qPCR chez le $\Delta Bcdim-5$ que nous avons généré.

Chez *A. nidulans*, l'absence de ClrD et HepA entraîne une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la production de stérigmatocystine, de pénicilline et de terrequinone A (Reyes-Dominguez *et al.*, 2010). Ces résultats renseignent sur le rôle de répresseur de ClrD et de HepA. Cependant, chez *F. graminearum*, la délétion de *Hep1* entraîne à la fois une surexpression des gènes impliqués dans la production d'aurofusarine mais également et concomitamment une sous-expression du cluster du déoxylivalénol (Reyes-Dominguez *et al.*, 2012). Il semblerait ainsi que HP1 puisse être à la fois impliquée dans la répression et l'activation de gènes du métabolisme secondaire. Il est possible que ces observations résultent en partie d'effets indirects.

D'après les données obtenues dans les chapitres précédents, nous pouvons affirmer que les trois clusters auxquels nous nous sommes intéressés (c'est-à-dire BOT, BOA et PKS7) ne présentent

pas le même environnement génomique. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que les clusters BOT et BOA contenaient des parties riches en A+T résultant probablement de copies d'ETs mutées par le RIP (Porquier *et al.*, 2016). Ces observations nous laissaient penser que comme chez *N. crassa*, les séquences RIPées étaient ciblées par DIM-5 pour former de l'hétérochromatine grâce au recrutement de HP1 et DIM-2 (Lewis *et al.*, 2009). D'après les résultats présentés ci-dessus, il semblerait qu'un scénario différent se déroule au niveau des clusters BOT et BOA chez *B. cinerea* puisque l'inactivation des gènes *Bcdim-5* et *Bchp1* semble mener à une sous-expression de *Bcbot2* et aussi peut-être de *Bcboa6* et *Bcboa9*. A partir de ces observations, deux hypothèses nous semblent donc possibles : (i) la sous-régulation de ces gènes implique un phénomène indépendant de l'environnement génomique ou (ii) l'environnement génomique des clusters BOT et BOA est effectivement impliqué dans leur régulation. Dans le premier cas, nous pensons qu'il est possible qu'un répresseur putatif des clusters BOT et BOA pourrait être surexprimé chez les $\Delta Bcdim-5$ et $\Delta Bchp1$. Dans ce cas, la protéine surproduite pourrait réprimer l'expression des gènes *Bcbot* et *Bcboa*. Dans le second cas, il est possible que la compensation entre les modifications post-traductionnelles au niveau des histones soit impliquée dans les observations que nous avons pu faire. En effet, chez *N. crassa*, la délétion de *dim-5* entraîne une relocalisation des H3K27me_{2/3} au niveau des régions marquées par des H3K9me₃ chez la souche sauvage (Jamieson *et al.*, 2016). Nous pouvons ainsi faire l'hypothèse d'un scénario similaire chez B05.10 : des modifications H3K9me₃ pourraient être présentes au niveau des ETs des clusters BOT et BOA, disparaître chez le $\Delta Bcdim-5$ et entraîner une relocalisation des H3K27me₃ dans ces mêmes régions. Ceci expliquerait la sous-expression observée au niveau de ces deux clusters. Pour tester cette hypothèse d'une relocalisation des marques, il serait particulièrement d'intérêt d'effectuer des analyses ChIPseq chez les différents mutants. De plus, dans le but d'observer l'effet de l'absence simultanée des marques silencieuses H3K9me₃ et H3K27me₃, nous avons initié la construction d'un double mutant $\Delta Bcdim-5\Delta Bckmt6$.

Le fait que l'expression de *Bcpks7* ne soit pas affectée chez les $\Delta Bcdim-5$ et $\Delta Bchp1$ pourrait s'expliquer par le fait que l'environnement génomique du cluster soit différent de celui des clusters BOT et BOA. Effectivement, le pourcentage G+C n'est pas anormalement faible dans cette région du

génomique et aucune copie d'ET n'a été prédite, ce qui ne suggère pas une régulation chromatinienne similaire à celle des clusters BOT et BOA (*i. e. via* BcDim-5 et BcHp1).

4. La formation d'hétérochromatine chez *B. cinerea* implique-t-elle une méthylation d'ADN via BcDim-2 ?

Chez *N. crassa*, la formation d'hétérochromatine constitutive implique une méthylation *de novo* via l'ADN méthyltransférase DIM-2 (Kouzminova and Selker, 2001; Rountree and Selker, 2010). Chez cet organisme modèle pour la formation d'hétérochromatine, le pourcentage d'ADN méthylé (5mC) s'élève à environ 1.5% (Foss *et al.*, 1993). Dans le cadre de la présente étude, il serait intéressant de déterminer si, chez *B. cinerea*, les mécanismes menant à la formation d'hétérochromatine constitutive sont similaires. Il a été démontré que la méthylation d'ADN est présente chez B05.10 avec un taux d'environ 0.6% (Breen *et al.*, 2016) qui est donc inférieur à celui de *N. crassa*. L'inactivation de *Bcdim-2* par Zhang *et al.* (2016) n'a pas mené à l'observation de différences entre le mutant et la souche sauvage en ce qui concerne l'agressivité ou la vitesse de croissance. Néanmoins, ces résultats ne donnent pas plus d'indications sur le rôle putatif de *Bcdim-2* dans la méthylation d'ADN ou dans la formation d'hétérochromatine. Des études supplémentaires sont donc requises pour lever le voile sur le rôle de BcDim-2. Dans le cadre de la continuité de ce projet, il serait intéressant d'étudier l'expression de nos gènes favoris du métabolisme secondaire pour les confronter avec ceux obtenus notamment chez les $\Delta Bcdim-5$ et $\Delta Bchp1$ pour déterminer l'implication dans une voie commune putative comme c'est le cas chez *N. crassa* (Lewis *et al.*, 2009).

5. *Bcpks7* est affecté chez le $\Delta Bckmt6$

La délétion de *Bckmt6* semble indiquer que la protéine est impliquée dans la répression de *Bcpks7*. Effectivement, nos données préliminaires suggèrent que ce gène est surexprimé (notamment sur ML) chez le $\Delta Bckmt6$. En revanche, les clusters BOT et BOA ne semblent pas régulés par cette protéine. Ces résultats sont en accord avec le rôle répresseur du métabolisme secondaire de KMT6 chez *F. graminearum* et *F. fujikuroi* (Connolly *et al.*, 2013; Studt, Rösler, *et al.*, 2016). Dans le second cas, l'inactivation du gène a même entraîné la production de quatre métabolites cryptiques et a permis l'identification d'un nouveau sesquiterpène. D'après les résultats que nous avons obtenus, nous

pensons que la région génomique contenant le cluster PKS7 est sous le contrôle de BcKmt6 à travers les H3K27me2/3. A l'inverse, les régions des clusters BOT et BOA ne seraient pas soumis au contrôle de ce modificateur chromatinien. Il est donc probable que l'environnement génomique différent entre ces trois clusters explique la régulation par la voie de formation de l'hétérochromatine impliquant BcDim-5 et BcHp1 ou la voie impliquant BcKmt6.

Cette étude nous a donc permis d'initier la caractérisation de modificateurs chromatiniens impliqués dans la régulation du métabolisme secondaire chez *B. cinerea*. Nous avons démontré que les gènes de nos clusters favoris semblaient effectivement sous le contrôle de certains de ces régulateurs. Les mutants générés seront utilisés au sein de l'équipe pour une caractérisation plus approfondie. D'autre part, l'obtention de données de CHIP-seq chez le WT serait particulièrement intéressante pour localiser les différentes marques (H3K9me3/H3K27me3) au niveau des clusters du métabolisme secondaire mais aussi chez les mutants pour étudier le phénomène possible de relocalisation des marques. Finalement, des analyses transcriptomiques et métaboliques globales des mutants en comparaison de la souche sauvage permettra de définir si BcDim-5 a aussi un rôle répresseur sur des gènes notamment impliqués dans la production d'autres métabolites secondaires.

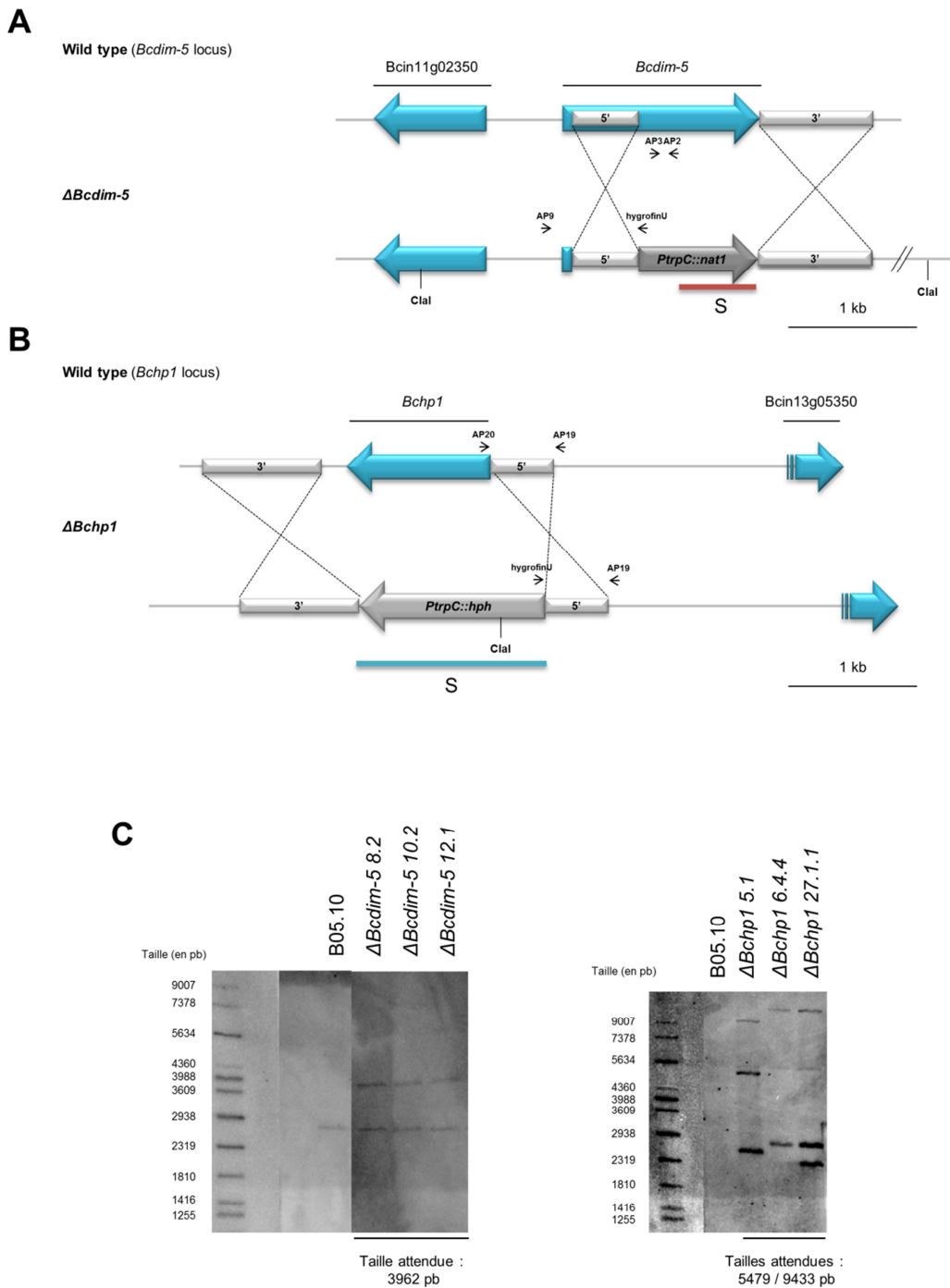


Fig. IV.S1. Création des $\Delta Bcdim-5$ et $\Delta Bchp1$.

Bcdim-5 a été délété en remplaçant une partie de l'ORF (contenant les domaines fonctionnels) par une cassette de résistance à la nourseothricine (A) tandis que la totalité de l'ORF de *Bchp1* a été remplacée par une cassette de résistance à l'hygromycine (B). Les amorces utilisées pour la construction des mutants sont présentées dans le **Tableau MM.1 (Matériels et méthodes)**. Les amorces utilisées pour la vérification de l'insertion des cassettes aux locus ciblés ainsi que la pureté des mutants (obtention d'homocaryons) sont représentées. C. L'analyse des homocaryons $\Delta Bcdim-5$ par Southern blot a révélé une unique insertion au locus ciblé. La bande additionnelle est également présente chez le WT et correspond à une hybridation aspécifique. L'analyse des $\Delta Bchp1$ a révélé l'insertion probable de copies additionnelles de la cassette au sein du génome. Les résultats ont été obtenus en hybridant les ADN des mutants digérés avec *Cla*I avec les sondes radioactives spécifiques aux cassettes illustrées en A et B (amplifiées respectivement avec Nourseo-ATG/K7 Nat1-Rev et hphF/hphR). Pour plus de détails, Cf. partie **Matériels et méthodes**.

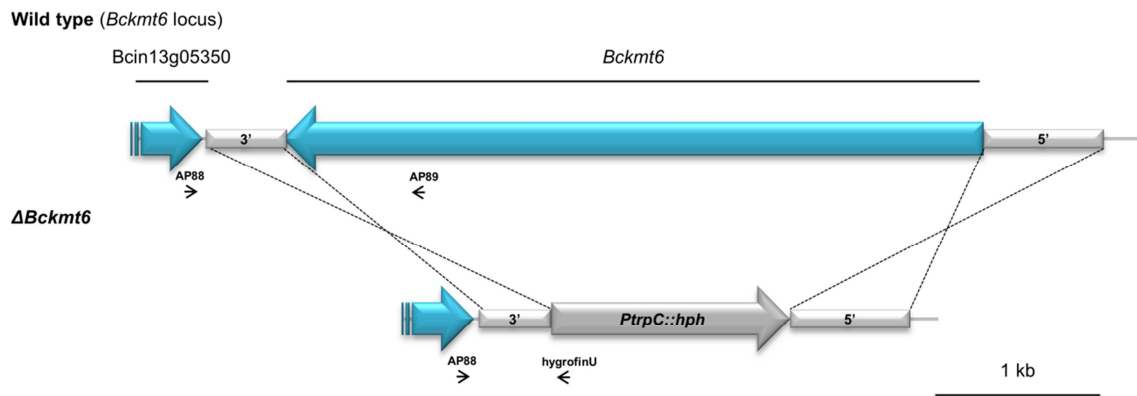


Fig. IV.S2. Création des $\Delta Bckmt6$.

Les $\Delta Bckmt6$ ont été obtenus en remplaçant l'ORF par une cassette de résistance à l'hygromycine. Les amorces utilisées pour la construction du mutant sont présentées dans le **Tableau MM.1 (Matériels et méthodes)**. Les amorces utilisées pour la vérification de l'insertion des cassettes aux locus ciblés ainsi que la pureté des mutants (obtention d'homocaryons) sont représentées.

Discussion générale et perspectives

Le pouvoir pathogène de *B. cinerea* repose en partie sur la production de métabolites phytotoxiques. Néanmoins, les mécanismes qui gouvernent l'expression des clusters responsables de la production de ces métabolites demeuraient méconnus. L'objectif de mon projet de thèse était d'étudier la régulation de trois clusters de gènes (BOT, BOA et PKS7) démontrés ou supposés comme impliqués dans le pouvoir pathogène de *B. cinerea*. Au début de ma thèse, une vue seulement partielle de l'environnement des gènes du métabolisme secondaire était disponible chez cet organisme. Dans ce contexte, nous avons peu d'outils pour émettre des hypothèses quant à la régulation de ces gènes. Nous savions néanmoins que les deux clusters BOT et BOA étaient bordés par des régions riches en A+T. De plus, il était déjà connu qu'un gène codant un FT putatif est présent dans le cluster BOA. Pendant la réalisation des différents travaux présentés dans ce manuscrit, nous avons eu accès à l'assemblage complet du génome de B05.10. L'obtention de cette information a été précieuse pour ma thèse puisqu'elle nous a permis (i) d'avoir accès à l'ensemble des gènes faisant putativement partie d'un même cluster et (ii) de localiser les clusters sur les chromosomes et d'étudier leur environnement génomique. Au cours de cette discussion générale, nous verrons que ces informations génomiques couplées à nos analyses fonctionnelles ont permis de faire évoluer nos connaissances sur la régulation de la synthèse de métabolites phytotoxiques chez *B. cinerea*. De plus, certaines observations originales sur le métabolisme secondaire ainsi que sur sa régulation chromatinienne ont été révélées par rapport à d'autres champignons modèles.

1. Les clusters BOT et BOA sont régulés par des FTs spécifiques

Le cluster BOA, tel qu'il avait été défini par Dalmais *et al.* (2011), présente un gène (*Bcboa13*) codant un FT putatif de type Zn(II)₂Cys₆. Dans le cadre de mon projet, nous avons caractérisé ce gène et démontré que BcBoa13 agissait effectivement comme un régulateur positif majeur et probablement spécifique du cluster BOA (Cf. **Chapitre II**). Au cours de ma thèse et grâce à la nouvelle annotation de B05.10, nous avons identifié un gène adjacent aux gènes *Bcbot* déjà identifiés. Comme pour *Bcboa13*, la délétion de ce gène (*Bcbot6*) affecte l'expression de l'ensemble du cluster BOT suggérant un rôle positif majeur de la protéine. De plus, des analyses métabolites ont confirmé que le mutant

n'était plus capable de produire de botrydial ou de botryanes. A l'inverse des clusters BOT et BOA, le cluster PKS7 ne contient apparemment pas de gène codant un régulateur putatif. Il est par conséquent possible qu'une autre portion du cluster contenant un gène de régulation soit présente ailleurs dans le génome. Néanmoins, certains clusters du métabolisme secondaire fongique ne possèdent pas de FT spécifique (Brakhage, 2012; Chujo and Scott, 2014). Il est donc alternativement possible que seuls les FTs globaux et des mécanismes chromatinien agissent pour la régulation du cluster PKS7.

En ce qui concerne l'ensemble du métabolisme secondaire chez B05.10, il semblerait que seul un quart environ de la quarantaine de clusters contient un gène codant un régulateur putatif (majoritairement de type Zn(II)₂Cys₆). Deux de ces FTs ont été caractérisés et sont impliqués dans la production de mélanine (Schumacher, 2016a). Les études que nous avons menées sur BcBot6 et BcBoa13 constituent donc une contribution importante dans l'acquisition de connaissances sur la régulation spécifique du métabolisme secondaire. D'après l'ensemble des informations dont nous disposons à l'heure actuelle, il apparaît donc que, comme chez les autres champignons, le métabolisme secondaire de *B. cinerea* est partiellement contrôlé par des FTs spécifiques. Néanmoins, la régulation du métabolisme secondaire fongique est complexe et fait intervenir des acteurs agissant à différents niveaux hiérarchiques. BcYoh1 est par exemple un FT C₂H₂ qui régule, en plus de différents mécanismes impliqués dans la nécrotrophie, des clusters du métabolisme secondaire (Simon *et al.*, 2013). Pour identifier des régulateurs globaux agissant en amont de nos trois clusters favoris, nous avons initié des criblages par simple hybride. Cette méthode a permis d'identifier un FT candidat putativement impliqué dans le contrôle de *Bcbot6*. Cet acteur serait donc un régulateur de l'activateur majeur du botrydial. Cette approche pourrait nous permettre de remonter la voie de régulation pour la relier à des acteurs impliqués dans les voies de signalisation connues notamment celle du calcium (impliquant notamment BcBcg1, BcPlc1 et BcCrz1) et celle du stress oxydatif (impliquant BcSak1), toutes deux jouant sur la synthèse des phytotoxines (Schumacher, 2016b; Viaud *et al.*, 2016). Effectivement, même si un effet direct du stress oxydatif n'a pas encore été démontré dans la régulation des clusters du métabolisme secondaire chez *B. cinerea*, la délétion d'acteurs impliqués dans la réponse à ce stress entraîne la modulation de la production de botrydial et d'acide botcinique.

De plus, l'application de H₂O₂ entraîne une légère surexpression de *Bcbot2* (Cf. **Chapitre I**), ce qui suggère que ce signal pourrait stimuler la production de botrydial *in planta*.

2. Le cluster BOA est-il régulé par la protéine NmrA-like BcBoa1 ?

En plus de *Bcboa13*, il est possible qu'un autre gène soit impliqué dans la régulation spécifique du cluster BOA. Il s'agit de *Bcboa1* qui est prédit pour coder une protéine présentant un domaine NmrA. Chez *F. fujikuroi*, une telle protéine a un rôle positif sur des gènes du cluster de la bikavérine (Wiemann *et al.*, 2009). L'analyse de l'expression des gènes *Bcboa* chez le $\Delta Bcboa1$ n'a pour le moment pas permis de mettre en évidence de différence avec la souche sauvage ce qui ne suggère pas un rôle indispensable dans l'activation de l'expression. La présence d'un gène contenant un domaine NmrA est assez originale au sein du métabolisme secondaire. Chez B05.10, seul un autre cluster en contient un. Il s'agit de *Bcbik4* du cluster de la bikavérine (l'homologue du gène de *F. fujikuroi*). Chez B05.10, ce cluster est non-fonctionnel tandis que chez d'autres souches, l'expression du cluster résulte en une coloration rose des colonies due à la présence de ce pigment (Schumacher *et al.*, 2013). Des gènes ne se trouvant pas dans des clusters du métabolisme secondaire possèdent aussi des domaines NmrA (29 chez B05.10). Il sera donc d'intérêt de déterminer le rôle de BcBoa1 et de voir si la fonction définie pourrait être la même pour ces gènes. Nous émettons l'hypothèse que cette protéine pourrait être un senseur du statut redox de la cellule et que son action pourrait avoir un impact sur l'expression des gènes du cluster BOA. Ces suppositions sont basées sur le fait que la structure tertiaire de la protéine NmrA (sur laquelle le domaine NmrA est basé) forme un pli Rossman qui retrouvé chez les enzymes capables de lier le NAD(P). De façon intéressante, ce domaine est retrouvé chez plusieurs répresseurs transcriptionnels comme Gal80 chez *S. cerevisiae*, les CtBPs (*C-terminal Binding Proteins*) des Mammifères ou encore la déacétylase Sir2 (voir Wong *et al.* (2008) et les références citées dans cet article). Ainsi, il est possible que BcBoa1, en réponse à un changement du statut redox de la cellule, agisse par exemple en interagissant avec BcBoa13 pour réguler les gènes *Bcboa*. Ce type de régulation pourrait intervenir dans la réponse globale de la cellule au burst oxydatif *in planta* puisque la perturbation de la voie de réponse à ce stress entraîne la modulation de la

production de botcinines (Segmuller *et al.*, 2007; Schumacher, 2008a, 2008b; Michielse *et al.*, 2011; Heller *et al.*, 2012; Temme *et al.*, 2012; Viaud *et al.*, 2016).

3. Rôle des éléments transposables dans l'évolution et l'expression des clusters du métabolisme secondaire

Chez *B. cinerea* mais également chez d'autres champignons filamenteux, certains clusters du métabolisme secondaire sont co-localisés au sein des génomes avec des éléments transposables actifs ou avec des copies inactivées par le RIP (Palmer and Keller, 2010; Porquier *et al.*, 2016a). Il est possible que ces éléments soient impliqués dans l'évolution des clusters de différentes façons. La première repose sur le fait que les transposons sont des éléments répétés qui sont susceptibles d'intervenir dans des recombinaisons homologues. Ces phénomènes peuvent alors mener à des réarrangements chromosomiques qui peuvent altérer les clusters ou les diviser en plusieurs parties. Remarquablement, des gènes orthologues aux gènes *Bcbot* sont retrouvés co-localisés avec des orthologues des gènes *Bcab1* à *Bcaba3* chez deux espèces de *Colletotrichum* (Hacquard *et al.*, 2016; Porquier *et al.*, 2016a). Les gènes *Bcaba* sont impliqués dans la production d'acide abscissique chez certaines souches de *B. cinerea*. La souche B05.10 possède ces gènes mais sa capacité à produire cette hormone n'a jamais été démontrée. Des éléments transposables sont présents de part et d'autres du cluster BOT et de *Bcab1* à *Bcaba3* chez B05.10 et il est donc possible que les gènes *Bcbot* et *Bcaba* aient été séparés suite à l'action des transposons. En plus de ces phénomènes, les éléments transposables sont susceptibles d'entraîner des effets délétères sur les gènes, notamment en s'insérant au sein des séquences codantes ou au niveau d'éléments impliqués dans la régulation (*e. g.* sites de fixation des FTs). Une insertion d'éléments transposables à proximité de gènes peut aussi mener à la pseudogénéisation suite à l'action du RIP. Il a été abordé dans le **Chapitre II** que la pseudogénéisation de *Bcboa15* et *Bcboa16* pourrait résulter de ce phénomène. De même, chez B05.10, une partie du cluster de la bikavérine est intacte (*Bcbik4* à *Bcbik6*) tandis que l'homologue de *bik1* de *F. fujikuroi* est absent et que *Bcbik2* et *Bcbik3* semblent avoir subi une pseudogénéisation (Schumacher *et al.*, 2013). La pseudogénéisation de *Bcbik3* a par ailleurs été suggérée lors d'une recherche globale des

pseudogènes fongiques par van der Burgt *et al.* (2014). De façon intéressante, une copie d'élément transposable est présente au niveau du cluster BIK (Cf. **Fig. 25 de l'Introduction générale**), entre les gènes *Bcbik3* et *Bcbik4*. Il est ainsi possible que l'insertion du transposon au sein du cluster ait entraîné des mutations de l'ADN par le RIP et que les gènes présents au niveau de ce locus (*Bcbik1* à *Bcbik3*) aient subi des mutations délétères. En plus de ces hypothèses, il est probable que l'action des éléments transposables affecte la régulation des clusters au sein desquels ils s'insèrent par des mécanismes chromatiniens. Effectivement, les éléments transposables sont fréquemment mutés par le RIP. Chez *N. crassa*, il a été démontré que les séquences RIPées sont ciblées par l'histone méthyltransférase DIM-5, résultant *in fine* en la formation d'hétérochromatine à ces loci (Lewis *et al.*, 2009).

4. Le métabolisme secondaire de B05.10 est-il régulé par la structure de la chromatine ?

Il est maintenant bien connu que les gènes impliqués dans le métabolisme secondaire fongique sont régulés par des mécanismes impliquant la structure de la chromatine (Keller *et al.*, 2005; Brakhage, 2012). Chez *B. cinerea*, la caractérisation de la méthyltransférase putative BcLae1, qui est probablement impliquée dans le remodelage de la chromatine (Reyes-Dominguez *et al.*, 2010), a démontré son rôle dans la régulation de plusieurs clusters du métabolisme secondaire (Schumacher, Simon, Kim C. Cohrs, *et al.*, 2015). De plus, la mutation de *Bcspt3*, un membre du complexe SAGA (impliqué dans la modification des histones et responsable de l'activation de certains gènes du métabolisme secondaire chez *A. nidulans* (Nutzmann *et al.*, 2011)) résulte en une pigmentation brun/jaune qui suggère une altération du métabolisme secondaire de *B. cinerea* (Giesbert *et al.*, 2011). L'ensemble de ces résultats soulève donc la question du contrôle chromatiniens du métabolisme secondaire chez l'agent de la pourriture grise. Pour tester cette hypothèse, deux types d'approches ont été initiées, l'une à l'échelle des nucléosomes, l'autre à l'échelle des histones (Cf. **parties 5 et 6 ci-dessous**).

Les marques déposées au niveau des histones par les modificateurs chromatiniens servent de signal pour le recrutement de complexes intervenant dans le remodelage de la chromatine (Olufemi and Bartholomew, 2013). L'action de ces complexes est dépendante de l'ATP et permet de diminuer les interactions entre les histones et l'ADN. Différents phénomènes comme l'éviction ou le déplacement des nucléosomes peuvent alors avoir lieu. Les promoteurs des gènes de ménage constitutivement exprimés ne contiennent pas de nucléosomes au niveau de leur promoteur tandis que d'autres gènes finement régulés ont tendance à être sous le contrôle de ces remodeleurs chromatiniens (Becker and Workman, 2013). Un des complexes connu et conservé entre les mammifères et les champignons est le complexe SWI/SNF (Dechassa *et al.*, 2008). Il est recruté par l'acétylation des histones et son action permet de réguler 5% des gènes de la levure. Chez l'agent de la malaria, *Plasmodium falciparum*, il a été démontré qu'au cours du développement la structure chromatinienne (position des nucléosomes) change et permet la régulation d'un certain nombre de gènes (Ponts *et al.*, 2010). Il est probable que ce type de complexe intervienne notamment dans la régulation du métabolisme secondaire fongique (Palmer and Keller, 2010). Ainsi, dans le cadre d'une collaboration avec Nadia Ponts (*Fusarium graminearum*) et Isabelle Fudal (*Leptosphaeria maculans*), nous sommes intéressés à ce mécanisme putatif modulant l'accessibilité à l'ADN et avons initié des analyses par MAINESeq. Cette méthode implique l'utilisation d'une DNase qui digère l'ADN se trouvant entre les nucléosomes mais qui n'affecte pas l'ADN intimement lié aux histones. Le séquençage de l'ADN restant à l'issue de l'action de la DNase est par la suite séquencé, permettant ainsi le positionnement des nucléosomes sur le génome de référence. Nous avons utilisé cette technique chez B05.10 dans des conditions menant à une expression contrastée des clusters du métabolisme secondaire (milieu riche vs jus de raisin). De plus, dans le but d'étudier le rôle putatif de la modulation de la structure chromatinienne par BcLae1, nous avons utilisé le $\Delta Bclae1$ pour nos analyses. Nous pensons qu'en fonction des conditions, il est possible que la position des nucléosomes soit modulée pour moduler l'accessibilité au niveau des gènes des clusters du métabolisme. Ces données de MAINESeq ont été couplées à des analyses d'expression par RNAseq afin de mettre en parallèle la localisation des nucléosomes et l'expression des différents gènes. L'analyse des différents résultats est actuellement en cours et devrait permettre d'obtenir à court terme des informations.

5. Régulation du métabolisme secondaire par la voie de l'hétérochromatine impliquant BcDim-5 et BcHp1

L'histone méthyltransférase DIM-5 et la protéine hétérochromatinienne HP1 sont généralement associées à la mise en place d'hétérochromatine et donc à un rôle répresseur de l'expression des gènes. Notamment, les marques générées par DIM5 (H3K9me3) sont généralement associées aux régions contenant des éléments transposables RIPés (Lewis *et al.*, 2009). Etant donné que les clusters BOT et BOA contiennent ce type d'éléments, nous nous attendions à un contrôle négatif par la voie putative de l'hétérochromatine impliquant BcDim-5. Dans ce cas de figure, la délétion du gène aurait dû mener à l'observation d'une surexpression des gènes *Bcbot* et *Bcboa* chez les mutants $\Delta Bcdim-5$ et $\Delta Bchp1$. A l'inverse, la délétion de *Bchp1* et *a fortiori* de *Bcdim-5* semble mener à une sous-expression importante de *Bcbot2* et une sous-expression modérée de *Bcboa6* et *Bcboa9*. Certains de ces résultats ont également été observés lors de la caractérisation de *Bcdim-5* par Zhang *et al.* (2016). Ces observations surprenantes restent à expliquer. Une analyse de la localisation des différentes marques sera primordiale car des phénomènes de compensation entre les marques H3K9me3 et H3K27me3 ont déjà été mis en évidence chez les champignons (Jamieson *et al.*, 2016). Ces résultats sont originaux puisqu'à notre connaissance la délétion des orthologues de *dim-5* chez divers organismes entraîne un effet positif sur l'expression des gènes du métabolisme secondaire ou codant des effecteurs protéiques (Reyes-Dominguez *et al.*, 2010; Chujo and Scott, 2014; Soyer *et al.*, 2014). En revanche, un effet négatif de la délétion de *hp1* sur le métabolisme secondaire avait déjà été observé chez *F. graminearum* (Reyes-Dominguez *et al.*, 2012).

A l'échelle globale du métabolisme secondaire chez *B. cinerea*, seul un nombre limité de clusters est présent au niveau de régions contenant des transposons et des portions riches en A+T. Ainsi, il serait intéressant de définir par CHIP si les marques présentes au niveau de ces régions sont les mêmes que celles présentes au sein des clusters qui ne présentent pas cet environnement génomique. De plus, il est probable que les régions qui ne contiennent pas de gènes impliqués dans le métabolisme secondaire, qui sont riches en A+T et qui contiennent des éléments transposables résultent elles-aussi du RIP. Certaines de ces régions ont été prédites comme étant les centromères des

différents chromosomes (van Kan *et al.*, 2016). Là encore, il est possible que ces régions soient enrichies en H3K9me3 pour la formation d'hétérochromatine. Chez d'autres champignons, il a été démontré que les portions riches en A+T pouvaient contenir des gènes impliqués dans le pouvoir pathogène. C'est notamment le cas chez *L. maculans brassicae*. Ce champignon possède un génome contenant une alternance d'isochores GC (larges portions d'ADN contenant un ratio G+C/A+T équilibré) et d'isochores AT (larges portions d'ADN contenant un fort pourcentage en A+T) (Rouxel *et al.*, 2011). Chez cet organisme, des gènes codant des effecteurs impliqués dans l'infection du colza sont localisés dans des isochores AT et sont sous le contrôle de LmDIM5 et LmHP1 (Soyer *et al.*, 2014). Le déplacement de plusieurs de ces gènes dans des isochores GC a mené à leur surexpression en conditions de croissance *in vitro*. Ces résultats suggèrent que la localisation des gènes est impliquée dans leur contrôle par LmDIM5 et LmHP1. Autrement, chez *A. parasiticus*, dans des conditions d'induction de l'expression des gènes du cluster de l'aflatoxine, le déplacement de deux gènes du cluster (*ver-1* et *nor-1*) à d'autres loci du génome entraîne une diminution de leur expression (Liang *et al.*, 1997; Chiou *et al.*, 2002). De plus, chez *A. nidulans*, le déplacement du gène *aflR* en dehors du cluster de la stérigmatocystine (entouré d'éléments transposables) le soustrait au contrôle par LaeA tandis que l'ajout d'un gène extérieur au cluster le place sous le contrôle de ce régulateur global (Bok, Noordermeer, *et al.*, 2006).

6. Régulation du métabolisme secondaire par la voie de l'hétérochromatine impliquant BcKmt6

En plus de la voie impliquant les H3K9me3, la triméthylation des H3K27 entraîne la formation d'hétérochromatine dite « facultative ». Néanmoins, ce terme est à employer avec précautions puisque l'acquisition croissante des connaissances montre que l'hétérochromatine induite par la triméthylation des H3K9 est également dynamique et réversible (Reyes-Dominguez *et al.*, 2010). De façon intéressante, la voie de l'hétérochromatine impliquant l'histone méthyltransférase KMT6 (responsable des H3K27me3) n'est présente que chez certaines espèces fongiques comme

Fusarium graminearum (Connolly *et al.*, 2013), *Fusarium fujikuroi* (Studt, Rösler, *et al.*, 2016) ou *Neurospora crassa* (Jamieson *et al.*, 2013) et absente notamment chez les Aspergilli.

Les résultats préliminaires de notre étude sur l'histone méthyltransférase *Bckmt6* suggèrent que l'expression de *Bcpks7* est sous le contrôle de la structure chromatinienne. Ce gène est effectivement surexprimé chez le $\Delta Bckmt6$, ce qui suggère un rôle répresseur de la protéine chez la souche sauvage. Il est ainsi probable que le locus du cluster PKS7 contienne des marques H3K27me3 qui permettent le maintien de la répression du cluster dans certaines conditions.

L'ensemble de ces observations semble donc confirmer une régulation du métabolisme secondaire par des mécanismes chromatiniens chez *B. cinerea*. En revanche, à l'inverse des autres champignons et d'après nos résultats préliminaires, le phénotype de *B. cinerea* n'est affecté par la délétion d'aucun des trois gènes *Bcdim-5*, *Bchp1* ou *Bckmt6*. Il sera ainsi d'intérêt de poursuivre cette étude et de déterminer le rôle de ces modificateurs chromatiniens putatifs dans le cycle de vie de l'agent de la pourriture grise. De plus, d'autres marques (notamment des acétylations) sont probablement impliquées dans la régulation du métabolisme secondaire chez *B. cinerea*. La caractérisation d'autres modificateurs chromatiniens devra être réalisée pour approfondir les connaissances relatives à ce contrôle chromatinien. Finalement, il n'est pas à exclure que le métabolisme secondaire soit aussi régulé par la méthylation de l'ADN. Une étude a récemment mis en évidence chez *B. cinerea* le déclin de l'agressivité suite à des repiquages successifs *in vitro* (Breen *et al.*, 2016). Les auteurs de cette étude suggèrent que ces observations étaient liées à la méthylation progressive d'un certain nombre de gènes dont certains appartiennent au métabolisme secondaire. Ce mécanisme est réversible puisque l'agressivité est restaurée suite à des inoculations sur *Arabidopsis thaliana* en parallèle de modifications du profil de méthylation de l'ADN.

7. Existe-t-il un phénomène de TPE chez *B. cinerea* ?

Chez les Aspergilli, il a été supposé que les clusters du métabolisme secondaire fongiques sont préférentiellement localisés au niveau des subtélomères où ils sont sous le contrôle des modificateurs chromatiniens (Palmer *et al.*, 2010; Galazka and Freitag, 2014). Notamment, le phénomène de TPE

(*Telomere Position Effect*) affecte l'expression des gènes présents au niveau de certains subtélomères chez différentes espèces (Palmer and Keller, 2010) et implique la protéine KU70. Il semblerait que les clusters chez *B. cinerea* ne sont pas préférentiellement positionnés dans ces régions particulières du génome ce qui est également le cas chez *Sclerotinia sclerotiorum* (Amselem *et al.*, 2011). Il sera néanmoins intéressant de déterminer si les clusters qui sont dans ces régions (cinq à moins de 100 kb des télomères) sont plus sous un contrôle chromatinien que les autres clusters. Deux de nos clusters favoris sont positionnés sub-télomériquement. Il s'agit de BOA et de PKS7 qui sont respectivement localisés à des extrémités des chromosomes 1 et 10. Ces deux clusters présentent un profil d'expression différent. Alors que les gènes *Bcboa* s'expriment fortement dans de nombreuses conditions, le cluster PKS7 présente une expression relativement faible (Viaud *et al.*, 2016 ; **partie 4 de l'Introduction générale**). Il est possible qu'un mécanisme réprimant l'expression de gènes qui se trouvent au niveau des télomères existe chez *B. cinerea* mais qu'il soit à restreint à certains télomères (comme celui où est localisé le cluster PKS7). Néanmoins, d'après nos résultats, l'expression de *Bcpcs7* (comme celle des gènes *Bcboa*) n'est pas affectée par la délétion de *Bcku70*.

8. Recherche des métabolites produits par *B. cinerea*

Avec les différentes études que nous avons menées, il apparaît clairement que les approches moléculaires peuvent être utilisées afin de manipuler le champignon pour induire ou inhiber la production de métabolites. Par exemple, la surexpression du FT BcBoa13 semble induire une augmentation de la production de métabolites (actuellement en cours de vérification) qui affecte le phénotype initial. D'autre part, il semblerait que la délétion de régulateurs chromatinien ait un rôle sur le contrôle de l'expression des clusters (positif ou négatif) et donc sur la production de métabolites secondaires. Ces observations sont intéressantes dans le cadre de la recherche des métabolites produit par l'agent de la pourriture grise.

La recherche des métabolites fongiques est active notamment dans le but d'identifier de nouvelles molécules d'intérêt industriel et médical. Néanmoins, un nombre important de clusters permettant la synthèse de ces métabolites est silencieux dans les conditions classiques de culture, ce

qui entraîne la non production des métabolites. De nombreux efforts sont faits au sein de la communauté pour lever les verrous moléculaires qui permettent la synthèse de ces molécules. La plus simple des approches consiste à cultiver les champignons dans différents milieux et sous différentes conditions. Cette approche nommée OSMAC pour One Strain MAny Compounds, permet la stimulation de différents mécanismes moléculaires (faisant notamment intervenir des FTs globaux et des modificateurs chromatininiens) et permet la dérégulation de certains clusters. Cette approche a notamment permis d'identifier les aspoquinolones A-D (alcaloïdes) chez *A. nidulans* (Scherlach and Hertweck, 2006). L'avantage de son utilisation repose sur le fait qu'elle ne nécessite pas la compréhension des mécanismes de régulation sous-jacents. A l'inverse, plusieurs approches visant à manipuler les mécanismes de régulation ont été mises en place et ont permis l'identification de nouveaux métabolites. Une de ces stratégies repose sur la modification des FTs spécifiques putatifs des clusters. Ainsi, le remplacement du promoteur du gène *afoA* chez *A. nidulans* par un promoteur inductible a permis l'isolation et l'identification de l'asperfuranone (Chiang *et al.*, 2009). Chez cet organisme, l'insertion de copies ectopiques du gène *apdR* sous le contrôle d'un promoteur inductible a également mené à l'induction de l'expression des gènes d'un cluster et a permis la découverte de deux métabolites cytotoxiques : les apyridones A et B (Bergmann *et al.*, 2007). D'autres stratégies consistent à jouer sur les modificateurs chromatininiens afin de lever la répression de l'expression de clusters du métabolisme secondaire. Ceci peut être réalisé en utilisant des produits chimiques inhibant l'activité de certains modificateurs chromatininiens. Par exemple, l'utilisation d'un inhibiteur de HDAC (SAHA) a mené à la production de perylenequinones complexes comme les cladochromes ou la calphostine B (Williams *et al.*, 2008). Finalement, la délétion des gènes codant des modificateurs chromatininiens est une méthode efficace pour la recherche de nouveaux métabolites. La délétion de *cclA* chez *A. nidulans* a permis l'identification d'un cluster impliqué dans la production de monodictyphénone et d'émodine (Bok *et al.*, 2009).

D'après les données génomiques disponibles, la souche sauvage B05.10 de *B. cinerea* a le potentiel pour produire une quarantaine de métabolites (Amselem *et al.*, 2011; van Kan *et al.*, 2016; Viaud *et al.*, 2016). Jusqu'ici, seul un faible nombre de ces métabolites (une dizaine) a été isolé et

caractérisé. Les métabolites produits par cet organisme sont donc largement sous-étudiés. Il serait par conséquent intéressant d'utiliser les méthodes présentées ci-dessus dans le cadre du *genome mining* pour identifier de nouveaux métabolites. Dans cette optique, nous allons initier des analyses métaboliques, en collaboration avec Jamal Ouazzani et Emilie Adelin de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif sur Yvette, chez les $\Delta Bcdim-5$, $\Delta Bchp1$ et $\Delta Bckmt6$. Ces analyses s'inscrivent dans le cadre d'un projet ANR (HerbiFun 2017-2020) mené par Muriel Viaud en partenariat avec différentes équipes de BIOGER. Ce projet vise à identifier des molécules herbicides avec un nouveau mode d'action. Le travail présenté dans ce manuscrit va donc servir de base à un projet à plus long terme et pouvant aboutir à une utilisation pratique.

9. Rôle biologique de BOT et BOA chez *B. cinerea*

Plusieurs études ont déjà démontré le rôle phytotoxique du botrydial et de l'acide botcinique. Néanmoins, les clusters qui permettent leur synthèse ne sont pas exprimés uniquement en conditions d'infection mais présentent plutôt une expression importante dans de nombreuses conditions. Ces observations suggèrent ainsi un rôle plus large de ces métabolites. De plus, des informations récentes suggèrent que ces métabolites pourraient intervenir d'autres interactions biotiques. Notamment, une étude de Malmierca *et al.* (2016) semble indiquer que le botrydial et les botcinines sont impliqués dans la modulation de l'expression de gènes du métabolisme secondaire lors de l'interaction avec *Trichoderma arundinaceum*. Plusieurs rapports suggèrent également le rôle antibactérien et antifongique des botryanes (Fehlhaber *et al.*, 1974; Durán-Patrón *et al.*, 1999 ; Pieckenstain, 17^{ème} symposium international sur Botrytis au Chili, 2016). De même, les botcinines ont une activité antifongique envers *M. oryzae* (Tani *et al.*, 2005). Ces différents métabolites semblent donc intervenir dans plusieurs phases de vie de l'agent de la pourriture grise. Ceci pourrait expliquer le fait que les gènes qui permettent leur synthèse sont exprimés dans de nombreuses conditions. A l'inverse, certains métabolites sont susceptibles d'intervenir dans des phases précises du cycle de vie de *B. cinerea*. Nous savons notamment que plusieurs clusters sont exprimés dans les apothécies chez B05.10, alors que leur expression est nulle lors de l'infection ou en conditions de croissance *in vitro* (Jan van Kan,

communication personnelle). Dans les apothécies, les clusters BOT et BOA sont éteints. Il serait donc intéressant de comparer les mécanismes de régulation de ces différents clusters, notamment en ce qui concerne la régulation chromatinienne pour voir si les mêmes acteurs ou les mêmes marques sont impliqués.

En plus des deux phytotoxines déjà identifiées, il est probable que *B. cinerea* produise d'autres molécules impliquées dans son pouvoir pathogène. Néanmoins, le rôle redondant des différents métabolites pourrait entraîner un problème pour la caractérisation et empêcher l'observation d'une différence d'agressivité des mutants par rapport à la souche sauvage. Pour contourner ces obstacles, une des approches consiste à isoler le métabolite produit à partir d'un gène ou d'un cluster et d'étudier l'effet de son application directement sur plante. Dans cette optique, l'isolation du métabolite putatif produit par BcPks7 pourrait mener à l'identification d'un nouveau facteur de virulence chez *B. cinerea*. Finalement, certains clusters du métabolisme secondaire s'expriment principalement ou même uniquement lors de l'infection (Kelloniemi *et al.*, 2015 ; Jan van Kan, communication personnelle). La recherche des métabolites associés aux clusters est particulièrement prometteuse pour l'identification de nouvelles phytotoxines.

10. Le métabolisme secondaire : une cible d'intérêt pour le contrôle des champignons

Les données fournies par la littérature ainsi que celles présentées dans le cadre de ce travail de thèse illustrent la complexité des mécanismes qui gouvernent l'expression du métabolisme secondaire chez les champignons. La progression dans la compréhension de ces mécanismes est particulièrement importante pour l'Homme puisque les champignons sont (i) des producteurs d'envergure de molécules utilisées quotidiennement dans l'industrie ou la médecine et (ii) de grands ravageurs des cultures mais aussi des agents pathogènes de l'Homme. Pour le premier point, il est intéressant de maîtriser les mécanismes de régulation des métabolites secondaires pour amener les champignons à produire à grande échelle les molécules désirées mais aussi dans le cadre de la recherche de nouveaux métabolites qui pourraient être exploités. En ce qui concerne le second point, l'établissement de

méthodes de lutte contre les champignons pathogènes est envisageable à partir des connaissances acquises sur la régulation du métabolisme secondaire. Ces dernières pourraient ainsi être utilisées dans le cadre de cribles afin de déterminer les signaux environnementaux qui gouvernent la production des métabolites secondaires (par exemple pendant les phases de stockage des denrées pour les champignons phytopathogènes) et d'essayer de les contrôler. De plus, les régulateurs spécifiques et globaux du métabolisme secondaire sont des cibles intéressantes pour la recherche de nouveaux produits anti-fongiques, d'autant plus que les protéines du complexe Velvet et les FTs de type $Zn(II)_2Cys_6$ sont spécifiques aux champignons.

Pour *B. cinerea* qui affecte plusieurs centaines d'espèces végétales au champ mais aussi dans les serres ou dans les phases de stockage (*e. g.* chambre froide), les études présentées dans ce manuscrit pourraient ouvrir des pistes intéressantes pour le contrôle du champignon. En effet, les FTs spécifiques régulant la synthèse des deux phytotoxines majeures ont été caractérisés et leur contrôle pourrait limiter la production de botrydial et d'acide botcinique. De plus, nos résultats suggèrent un contrôle chromatinien du métabolisme secondaire chez *B. cinerea*. Ils permettent donc d'envisager l'identification des signaux agissant en amont des modificateurs chromatinien dans le but de contrôler de manière globale la production de molécules phytotoxiques chez l'agent de la pourriture grise.

Matériels et méthodes

Cultures des souches de *Botrytis cinerea*

La souche modèle de *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. B05.10 (Quidde *et al.*, 1998) a été utilisée dans le cadre des études présentées pour la délétion des différents gènes. La délétion de *Bcboal* a été entreprise dans cette même souche dans laquelle le gène *Bcku70* a été inactivé (Choquer *et al.*, 2008). Pour la culture standard des différents individus, le milieu riche ML a été utilisé (20 g/L malt extract, 5 g/L yeast extract et 15 g/L agar) et supplémenté pour les transformants correspondants avec de l'hygromycine B (Sigma-Aldrich ; 100 µg/mL) ou de la nouséothricine (Werner Bioagents ; 80 µg/mL). Les cultures standard en boîtes de Pétri ont été réalisées en chambre de culture (21°C avec une alternance de 12 h de lumière blanche et 12 h d'obscurité).

Pour les analyses d'expression, les souches ont été cultivées sur un milieu jus de raisin solide (JDR ; 15 g/L agar et pH ajusté à 4) recouvert d'une feuille de cellophane. Les boîtes de Pétri ont ensuite été incubées dans une enceinte climatique (Sanyo MLR-350H) à 23°C avec une alternance de 14 h d'obscurité et 10 h de lumière (néons OSRAM L 36W/640).

Le milieu MMII (aussi appelé MMII(NO₃)) ainsi que le milieu MMII(NH₄) ont également été utilisés. Pour plus d'informations, voir la partie **Material and methods** du **Chapitre I**.

Bioinformatique

Le génome sans gap de la souche B05.10 de *B. cinerea* disponible au sein de la base de données EnsemblFungi (van Kan *et al.*, 2016) a été utilisé pour les analyses bioinformatiques. La structure bipartite (isochore-like) a été déterminée pour l'ensemble des chromosomes en utilisant le programme GC-profile (Gao et Zhang, 2006). Les paramètres suivants (pour détecter les isochores dans les génomes Eucaryotes) ont été utilisés : taille minimum = 3000 pb, paramètre d'interruption = 100, taille des gap < 1 % de la taille du chromosome.

L'annotation des transposons du génome de *B. cinerea* a été effectuée dans Porquier *et al.* (2016) (**Chapitre I**). Pour déterminer une action du RIP sur des régions d'intérêt, l'alignement de certains TEs avec leur TE consensus a été utilisé pour déterminer le taux de transitions/transversions

avec RIPCAL (Hane et Oliver, 2008). Toutes les mutations possiblement induites par le RIP (CA->TA, CT->TT, CC->TC, CG->TG et leur complément inverse) ont été calculées. De plus, les indices de RIP ont été calculés au niveau des régions 0 - 88 100 pb du BCIN01 et 0 - 30 100 du BCIN10 avec des fenêtres glissantes de 500 nt et des recouvrements de 400 nt. Les calculs correspondant aux conversions CA->TA et CT-> TT (et leur complément inverse TG->TA et AG->AA) sont les suivants : $RIP_CA=TA/(CA+TG)$ et $RIP_CT=(TT+AA)/(CT+AG)$, selon Hane et Oliver (2008). Le pourcentage en G+C a été calculé selon les mêmes fenêtres glissantes.

Les signaux de localisation nucléaire (NLS) ont été prédits avec WOLF pSORT (<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>). Les domaines protéiques ont été prédits avec PFAM (<http://pfam.xfam.org/>), InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>) ou SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1).

Méthodes moléculaires standards

Toutes les amorces utilisées dans cette étude sont présentées dans le **Tableau Annexe 1**. L'ADN génomique fongique a été extrait en utilisant la méthode basée sur un tampon au sarcosyl précédemment utilisée dans Dalmais *et al.* (2011). Pour les PCR de vérification, l'enzyme Mytaq polymérase (Bioline) a été utilisée selon les instructions du fournisseur. Pour les étapes de clonage, l'enzyme haute-fidélité Accuzyme polymérase (Bioline) a été utilisée selon les instructions du fournisseur. Pour les vérifications par *Southern blot*, l'ADN génomique des différentes souches a été digéré en utilisant l'enzyme de restriction ClaI. Les fragments génomiques ont par la suite été séparés sur un gel d'agarose 0,8 % et transférés sur une membrane chargée positivement (Biodyne B (positive) TM membrane ; MPbio). L'hybridation a ensuite été réalisée en utilisant le kit de marquage et de détection DIG (sonde froide) (Roche) selon les instructions du fournisseur. Alternativement, une hybridation avec des sondes radioactives marquées au ³²P a été réalisée. Les amorces utilisées pour les différentes sondes sont indiquées dans la légende des différentes figures.

Croisements des souches

Le croisement des mutants délétés dans la souche sauvage B05.10 (Mat1-1) a été réalisé avec la souche sauvage SAS405 compatible (Mat1-2). Pour cela, les différents individus ont été inoculés sur des boîtes contenant du ML. Ces boîtes ont ensuite été incubées pendant un mois dans l'obscurité totale à 21°C. Par la suite, ces mêmes boîtes ont été incubées à 1°C pendant un mois supplémentaire. Les sclérotés et les microconidies formées ont été récupérées et lavées à l'eau stérile. Pour chaque croisement, les sclérotés du premier individu ont été placés dans des Erlenmeyer dans lesquels les microconidies du second individu ont été ajoutées. Le croisement inverse (sclérotés du second individu avec les microconidies du premier individu) a également été réalisé. Les Erlenmeyer ont ensuite été placés deux semaines à l'obscurité à 12°C puis à la lumière de deux lampes (OSRAM L36W/640 (Cool White) et 36W/76 (Natura)). Après plusieurs semaines, les stipes puis les apothécies se forment. Après le brunissement des apothécies, les ascospores ont été récupérées et diluées dans l'eau stérile puis étalées sur boîte pour la récupération.

Analyses par qRT-PCR

L'extraction des ARN (sans ADN) a été réalisée à partir des différentes cultures comme dans Simon *et al.* (2013). Les ADNc ont été obtenus à partir de 1 µg d'ARN par rétro-transcription en utilisant la transcriptase inverse M-MLV (Invitrogen) comme dans Porquier *et al.* (2016). Les réactions de RT-qPCR ont été réalisées sur les échantillons d'ADNc dilués au 1/10^{ème} et utilisant le mix MESA Green qPCR Mastermix Plus for SYBR Assay (Eurogentech) et le système de détection CFX96 Touch real-time PCR (Bio-Rad). Les amorces utilisées (200 nM) sont listées dans le **Tableau Annexe 1**. L'absence de contamination par de l'ADN génomique a été vérifiée sur les ADNc dilués et l'absence de contaminants dans l'eau a été vérifiée pour chaque expérimentation. Le programme de RT-qPCR consiste en une étape de dénaturation initiale de 5 min à 95°C suivie par 40 cycles de 15 s de dénaturation et de 1 min d'hybridation / extension à 60 °C. L'analyse des courbes de fusion (augmentation de 0,1°C/min) des produits finaux a confirmé l'absence de contamination et de dimères d'amorces. Les données ont été analysées avec le logiciel CFX Manager (Bio-Rad). L'efficacité des

couples d'amorces a été testée sur un mélange d'ADNc et s'est avérée supérieure à 90 %. Le niveau d'expression des gènes a été calculé comme le ratio de l'expression entre le gène d'intérêt et le gène constitutivement exprimé *BcactA* selon la méthode du $2^{-\Delta Ct}$ ou $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak et Schmittgen, 2001).

Tests d'agressivité

Pour tester le pouvoir pathogène des transformants, des feuilles détachées de haricots (*Phaseolus vulgaris* cv. *Caruso*) (cultivés en enceinte climatique) ont été inoculées avec des implants (*plugs*) de jeune mycélium (3 j sur ML). Alternativement, des suspensions de conidies calibrées à 10^5 conidies/ml ont été préparées dans du tampon saccharose phosphate (10 mM saccharose, 10 mM KH_2PO_4). 10 μl de ces suspensions ont été utilisés pour induire l'infection. Les feuilles ont ensuite été placées dans des boîtes plastiques contenant un papier mouillé pour maintenir une atmosphère humide. Les boîtes ont été placées dans des enceintes climatiques à 75 % d'hygrométrie avec une alternance de 16 h de lumière blanche à 22°C et 8 h d'obscurité à 18°C.

Etude de localisation

Les études de localisation effectuées avec le transformant *OE:Bcboa13* ont été réalisées de la même façon que dans Porquier *et al.* (2016a) (Cf. **Material and methods du Chapitre I**).

Construction des mutants

La délétion des différents gènes a été réalisée en utilisant le système de recombinaison homologue de *B. cinerea* (Levis *et al.*, 1997). Pour cela, les parties flanquantes 5' et 3' des régions à inactiver ont été amplifiées par PCR avec des amorces contenant des queues chevauchantes utiles pour la suite du protocole. Les amorces utilisées pour amplifier ces parties sont présentées dans le **Tableau MM.1**. En parallèle, les cassettes de résistance utilisées ont été amplifiées. Ces cassettes sont : *PtpC:hph* présente dans le pCSN44 pour la résistance à l'hygromycine, *PoliC:nat1* du pNR1 et *PtpC:nat1* du pNDN-OGG pour la résistance à la nouséothricine (Schumacher, 2012). Les parties flanquantes 5' et 3' des différentes régions à inactiver ont par la suite été fusionnées de part et d'autre

de la cassette de résistance souhaitée par la transformation de la souche FY834 de *S. cerevisiae*. Le système de recombinaison homologue de cet organisme permet la fusion des différentes constructions grâce aux queues chevauchantes des amorces. Par la suite, la cassette de délétion est amplifiée par PCR à partir de l'ADN de levure. Quand cela est indiqué, l'amplification de la cassette de délétion a été réalisée en deux parties qui ont été utilisées pour transformer *B. cinerea* par la technique du split marker (Catlett *et al.*, 2003). Pour les constructions les plus grandes, les plasmides ont été extraits des levures et ont été utilisés pour transformer des bactéries. Ces plasmides ont par la suite été extraits et utilisés (après digestion dans certains cas) pour transformer *B. cinerea*. La transformation de *B. cinerea* a été réalisée de la même façon que dans Porquier *et al.* (2016).

Tableau MM.1. Informations sur la stratégie de construction des différents mutants.

Transformant	Annotation	Souche réceptrice	Partie flanquante 5'		Partie flanquante 3'		Cassette de résistance		
			Taille	Amorces	Taille	Amorces	Promoteur:gène	Taille	Amorces
<i>ΔBcboa1</i>	Bcin01g00010	<i>ΔBcku70</i>	930	AP40/AP41	471	AP42/AP43	<i>PoliC:nat1</i>	1420	K7 Nat1 fwd/K7 Nat1 rev
<i>ΔBcboa13</i>	Bcin01g00130	B05.10	1131	HS-5f-bcboa13/HS-5r-bcboa13	1063	HS-3f-bcboa13/HS-3r-bcboa13	<i>PtrpC:hph</i>	1447	hphF/hphR
<i>ΔBcboa15</i>	Bcin01g00140	B05.10	780	AP122/AP123	517	AP124/AP125	<i>PtrpC:nat1</i>	926	AP Nat1 pNDN F/AP Nat1 pNDN R
<i>ΔBcdim-5</i>	Bcin11g02360	B05.10	517	AP76/AP77	884	AP78/AP79	<i>PtrpC:nat1</i>	926	AP Nat1 pNDN F/AP Nat1 pNDN R
<i>ΔBchp1</i>	Bcin13g05340	B05.10	464	AP11.2/AP12.2	902	AP13/AP14	<i>PtrpC:hph</i>	1447	hphF/hphR
<i>ΔBckmt6</i>	Bcin06g04490	B05.10	727	AP83bis/AP84	441	AP85/AP86	<i>PtrpC:hph</i>	1447	hphF/hphR
<i>ΔBcps7</i>	Bcin10g00030	B05.10	995	pb_pks7_5f/pb_pks7_5r	1001	pb_pks7_3f/pb_pks7_3r	<i>PtrpC:hph</i>	1447	hphF/hphR

Extraction des métabolites de *B. cinerea*

Pour la recherche du métabolite putativement produit par BcPks7, les souches B05.10 et $\Delta Bc pks7$ ont été cultivés sur ML ou ML supplémenté en hygromycine sur dix boîtes de Pétri (diamètre 55 mm) par souche. Après 7 jours de culture à 23°C avec une alternance de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité, le mycélium des différents individus a été collecté et utilisé pour ensemercer 1 litre de milieu Siesler liquide (2g/l KH_2PO_4 , 1,5 g/l K_2HPO_4 , 1 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g/l glucose, 2 g/l yeast extract). Après 2 j de culture sous agitation dans les mêmes conditions de culture que celles utilisées pour la culture sur boîte, le mycélium a été récupéré par filtration. La moitié de la biomasse a été utilisée pour ensemercer un nouveau litre de milieu liquide (Siesler carencé en azote, sans ajout de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et yeast extract). Après deux nouveaux jours de culture, le surnageant a été récupéré par centrifugation.

Ce dernier a ensuite été extrait à l'acétate d'éthyle (V/V) et les phases organiques séchées sur sulfate de magnésium puis concentrées à l'évaporateur rotatif. Les extraits bruts obtenus (5 et 15 mg pour B05.10 et $\Delta Bc pks7$ respectivement) sont analysés par LC/MS (colonne Zorbax Eclipse XDB Phenyl 100 x 1 mm, 3,5 μm éluée avec un gradient $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}$ de 75/15 à 90/10 en 50 min en présence de 0,1 % de TFA, et couplée à un spectromètre de masse Quadrupole-Time of flight (Q-TOF pulsar i, Applied Biosystems, France) équipé d'une source electrospray (ESI). Les ions ont été détectés dans une gamme m/z 120 à m/z 1200. Une comparaison des profils métaboliques obtenus pour les souches sauvage et le $\Delta Bc pks7$ a été réalisée grâce à l'interface XCMS online (https://xcmsonline.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage, méthode : *Pairwise job*) (Tautenhahn *et al.*, 2012).

Mise en place du système rapporteur GFP

Les différentes constructions ont été générées en amplifiant les différentes parties du *pBcboa9* avec les amorces indiquées dans la **Tableau Annexe 1**. Ces constructions ont par la suite été insérées dans le pNDN-OGG (Schumacher, 2012) linéarisé avec NcoI. Ces vecteurs ont ensuite été extraits des

levures et linéarisés avec SacII et utilisés pour transformer *B. cinerea* au locus *Bcniad* grâce aux séquences flanquantes du pNDN-OGG.

Simple hybride

Les clonages pour les analyses par simple hybride ont été réalisés de la même façon que dans Simon *et al.* (2013) en utilisant les amorces et les enzymes présentées dans le **Tableau MM.2**.

L'absence de mutation lors de l'amplification a été confirmée par séquençage.

Tableau MM.2. Amorces et enzymes utilisées pour la construction des promoteurs pour le simple hybride.

Construction		Amorces pour amplification, promoteur	Enzymes pour intégration au pINT-HIS3	Enzymes pour intégration dans génome de levure
<i>pBcboa6</i>	T1	pBcboa6 F / pBcboa6 R	NotI / AvrII	NcoI / ScaI
	T2	AP181 / AP182	NotI / SpeI	NcoI / ScaI
<i>pBcboa9</i>	T1	AP57 / AP59	NotI / SpeI	NcoI / HpaI
	T2	AP58 / AP59	NotI / SpeI	NcoI / HpaI
	T3	AP58 / AP60	NotI / SpeI	NcoI / HpaI
	T4	AP57 / AP80	NotI / SpeI	NcoI / HpaI
	T5	AP57 / AP81	NotI / SpeI	NcoI / HpaI
	T6	AP172 / AP173	NotI / SpeI	NcoI / SacI
	T7	AP179 / AP180	NotI / SpeI	NcoI / SacI
<i>pBcboa13</i>	T1	AP92 / AP93	NotI / AvrII	NcoI / SacI
	T2	AP94 / AP95	NotI / AvrII	NcoI / SacI
	T3	AP96 / AP97	NotI / AvrII	NcoI / SacI
	T4	AP98 / AP99	NotI / AvrII	NcoI / SacI
	T5	AP100 / AP101	NotI / AvrII	NcoI / SacI
<i>pBcbot6</i>	T1	AP132 / AP133	NotI / SpeI	NcoI / SacI
	T2	AP134 / AP135	NotI / SpeI	NcoI / SacI
	T3	AP136 / AP137	NotI / SpeI	NcoI / SacI
	T4	AP138 / AP139	NotI / SpeI	NcoI / SacI
<i>pBcpcs7</i>	T1	AP103 / AP104	NotI / AvrII	NcoI / SacI
	T2	AP105.1 / AP105.2	NotI / AvrII	NcoI / SacI
	T3	AP106 / AP107	NotI / AvrII	NcoI / SacI
	T4	AP108 / AP109	NotI / AvrII	NcoI / SacI
	T5	AP110 / AP111	NotI / AvrII	NcoI / SacI

Les versions du FT BcBoa13 (totalité ou uniquement la région comprenant le domaine de liaison à l'ADN) ont été clonés en amplifiant les régions désirées sur de l'ADNc en utilisant respectivement les amorces AS889/AP61 et AS889/AS890. Les amplicons ont par la suite été digérés avec PciI et BamHI et ligés au pACT2st digéré NcoI/BamHI. Les plasmides ont par la suite servis pour la transformation de bactéries et ont été extraits. L'absence de mutation a été vérifiée par séquençage.

Bibliographie

- Abe, Y., Ono, C., Hosobuchi, M., and Yoshikawa, H. (2002) Functional analysis of *mlcR*, a regulatory gene for ML-236B (compactin) biosynthesis in *Penicillium citrinum*. *Mol. Genet. Genomics* **268**: 352–361.
- Agrios, G. (2005) Plant Pathology 5th ed.
- Amoutzias, G., Veron, A., Weiner, J., Robinson-Rechavi, M., Bornberg-Bauer, E., Oliver, S., and Robertson, D. (2006) One Billion Years of bZIP Transcription Factor Evolution: Conservation and Change in Dimerization and DNA-Binding Site Specificity. *Mol. Biol. Evol.* **24**: 827–835.
- Amselem, J., Cuomo, C.A., van Kan, J.A.L., Viaud, M., Benito, E.P., Couloux, A., *et al.* (2011) Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genet.* **7**: e1002230.
- Amselem, J., Lebrun, M.-H., and Quesneville, H. (2015) Whole genome comparative analysis of transposable elements provides new insight into mechanisms of their inactivation in fungal genomes. *BMC Genomics* **16**: 141.
- Andrianopoulos, A., Kourambas, S., Sharp, J.A., Davis, M.A., and Hynes, M.J. (1998) Characterization of the *Aspergillus nidulans* *nmrA* gene involved in nitrogen metabolite repression. *J. Bacteriol.* **180**: 1973–1977.
- Aoyagi, N. and Wassarman, D.A. (2000) Genes Encoding *Drosophila melanogaster* RNA Polymerase II General Transcription Factors. *J. Cell Biol.* **150**: 45–50.
- Ayarpadikannan, S. and Kim, H.-S. (2014) The Impact of Transposable Elements in Genome Evolution and Genetic Instability and Their Implications in Various Diseases. *Genomics Inform.* **12**: 98.
- Bahn, Y.-S., Xue, C., Idnurm, A., Rutherford, J.C., Heitman, J., and Cardenas, M.E. (2007) Sensing the environment: lessons from fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 57–69.
- Bailey, B.A. (1995) Purification of a Protein from Culture Filtrates of *Fusarium oxysporum* that Induces Ethylene and Necrosis in Leaves of *Erythroxylum coca*. *Phytopathology* **85**: 1250.
- Balan, J., Fuska, J., Kuhr, I., and Kuhrová, V. (1970) Bikaverin, an antibiotic from *Gibberella fujikoi*, effective against *Leishmania brasiliensis*. *Folia Microbiol. (Praha)* **15**: 479–484.
- Ballario, P. and Macino, G. (1997) White collar proteins: PASSing the light signal in *Neurospora crassa*. *Trends Microbiol.* **5**: 458–462.
- Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* **21**: 381–395.
- Bateman, A. (2004) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **32**: 138D–141.
- Baulcombe, D. (2013) Small RNA--the Secret of Noble Rot. *Science* **342**: 45–46.
- Baxevanis, A.D. and Vinson, C.R. (1993) Interactions of coiled coils in transcription factors: where is the specificity? *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**: 278–285.
- Baxter, C.S. and Byvoet, P. (1975) Intercalating agents as probes of the spatial relationship between chromatin components. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **63**: 286–291.
- Bayram, O., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J.W., Helmstaedt, K., Valerius, O., *et al.* (2008) VelB/VeA/LaeA Complex Coordinates Light Signal with Fungal Development and Secondary Metabolism. *Science* **320**: 1504–1506.
- Bbosa, G.S., Mwebaza, N., Odda, J., Kyegombe, D.B., and Ntale, M. (2014) Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. *Health (N. Y.)* **06**: 410–425.
- Becker, P.B. and Workman, J.L. (2013) Nucleosome Remodeling and Epigenetics. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**: a017905–a017905.
- Bell, A.A., Puhalla, J.E., Tolmsoff, W.J., and Stipanovic, R.D. (1976) Use of mutants to establish (+)-scytalone as an intermediate in melanin biosynthesis by *Verticillium dahliae*. *Can. J. Microbiol.* **22**: 787–799.
- Bergmann, S., Schümann, J., Scherlach, K., Lange, C., Brakhage, A.A., and Hertweck, C. (2007) Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. *Nat. Chem. Biol.* **3**: 213–217.
- Blackwell, M. (2011) The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am. J. Bot.* **98**: 426–438.

- Blaise, F., Rémy, E., Meyer, M., Zhou, L., Narcy, J.-P., Roux, J., *et al.* (2007) A critical assessment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for pathogenicity gene discovery in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Fungal Genet. Biol.* **44**: 123–138.
- Boettger, D. and Hertweck, C. (2013) Molecular Diversity Sculpted by Fungal PKS-NRPS Hybrids. *ChemBioChem* **14**: 28–42.
- Böhnert, H.U., Fudal, I., Dioh, W., Tharreau, D., Notteghem, J.-L., and Lebrun, M.-H. (2004) A Putative Polyketide Synthase/Peptide Synthetase from *Magnaporthe grisea* Signals Pathogen Attack to Resistant Rice. *Plant Cell* **16**: 2499–2513.
- Bok, J.W., Chiang, Y.-M., Szewczyk, E., Reyes-Domingez, Y., Davidson, A.D., Sanchez, J.F., *et al.* (2009) Chromatin-level regulation of biosynthetic gene clusters. *Nat. Chem. Biol.* **5**: 462–464.
- Bok, J.W., Chung, D., Balajee, S.A., Marr, K.A., Andes, D., Nielsen, K.F., *et al.* (2006) GliZ, a Transcriptional Regulator of Gliotoxin Biosynthesis, Contributes to *Aspergillus fumigatus* Virulence. *Infect. Immun.* **74**: 6761–6768.
- Bok, J.W. and Keller, N.P. (2004) LaeA, a Regulator of Secondary Metabolism in *Aspergillus spp.* *Eukaryot. Cell* **3**: 527–535.
- Bok, J.W., Noordermeer, D., Kale, S.P., and Keller, N.P. (2006) Secondary metabolic gene cluster silencing in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **61**: 1636–1645.
- Bolton, M.D., Thomma, B.P.H.J., and Nelson, B.D. (2006) *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Mol. Plant Pathol.* **7**: 1–16.
- Borel, J.F. (2002) History of the discovery of cyclosporin and of its early pharmacological development. *Wien. Klin. Wochenschr.* **114**: 433–437.
- Brakhage, A.A. (2012) Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**: 21–32.
- Brakhage, A.A., Spröte, P., Al-Abdallah, Q., Gehrke, A., Plattner, H., and Tüncher, A. (2004) Regulation of Penicillin Biosynthesis in Filamentous Fungi. In, Brakhage, A.A. (ed), *Molecular Biotechnology of Fungal beta-Lactam Antibiotics and Related Peptide Synthetases*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 45–90.
- Breen, J., Mur, L., Sivakumaran, A., Akinyemi, A., Wilkinson, M., and Rodriguez Lopez, C.M. (2016) *Botrytis cinerea* loss and restoration of virulence during in vitro culture follows flux in global DNA methylation.
- Brito, N., Espino, J.J., and González, C. (2006) The Endo- β -1,4-Xylanase Xyn11A Is Required for Virulence in *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **19**: 25–32.
- Brosch, G., Ransom, R., Lechner, T., Walton, J.D., and Loidl, P. (1995) Inhibition of maize histone deacetylases by HC toxin, the host-selective toxin of *Cochliobolus carbonum*. *Plant Cell* **7**: 1941–1950.
- Brown, D.W., Butchko, R.A.E., Busman, M., and Proctor, R.H. (2007) The *Fusarium verticillioides* FUM Gene Cluster Encodes a Zn(II)2Cys6 Protein That Affects FUM Gene Expression and Fumonisin Production. *Eukaryot. Cell* **6**: 1210–1218.
- Brown, D.W., Yu, J.H., Kelkar, H.S., Fernandes, M., Nesbitt, T.C., Keller, N.P., *et al.* (1996) Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 1418–1422.
- van der Burgt, A., Karimi Jashni, M., Bahkali, A.H., and de Wit, P.J.G.M. (2014) Pseudogenization in pathogenic fungi with different host plants and lifestyles might reflect their evolutionary past. *Mol. Plant Pathol.* **15**: 133–144.
- Butchko, R.A.E., Brown, D.W., Busman, M., Tudzynski, B., and Wiemann, P. (2012) Lae1 regulates expression of multiple secondary metabolite gene clusters in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet. Biol.* **49**: 602–612.
- Byvoet, P., Shepherd, G.R., Hardin, J.M., and Noland, B.J. (1972) The distribution and turnover of labeled methyl groups in histone fractions of cultured mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **148**: 558–567.
- Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W., and Keller, N.P. (2002) Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 447–459.
- Canessa, P., Schumacher, J., Hevia, M.A., Tudzynski, P., and Larrondo, L.F. (2013) Assessing the Effects of Light on Differentiation and Virulence of the Plant Pathogen *Botrytis cinerea*: Characterization of the White Collar Complex. *PLoS ONE* **8**:

- Cannon, P.F., Damm, U., Johnston, P.R., and Weir, B.S. (2012) *Colletotrichum* – current status and future directions. *Stud. Mycol.* **73**: 181–213.
- Carisse, O. (2016) Epidemiology and Aerobiology of *Botrytis spp.* In, Fillinger, S. and Elad, Y. (eds), *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer International Publishing, pp. 127–148.
- Carrozza, M.J., Utley, R.T., Workman, J.L., and Côté, J. (2003) The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet.* **19**: 321–329.
- Casas-Vila, N., Scheibe, M., Freiwald, A., Kappei, D., and Butter, F. (2015) Identification of TTAGGG-binding proteins in *Neurospora crassa*, a fungus with vertebrate-like telomere repeats. *BMC Genomics* **16**.
- Castanera, R., López-Varas, L., Borgognone, A., LaButti, K., Lapidus, A., Schmutz, J., et al. (2016) Transposable Elements versus the Fungal Genome: Impact on Whole-Genome Architecture and Transcriptional Profiles. *PLOS Genet.* **12**: e1006108.
- Catlett, N.L., Lee, B.-N., Yoder, O.C., and Turgeon, B.G. (2003) Split-Marker Recombination for Efficient Targeted Deletion of Fungal Genes. *Fungal Genet News* **50**: 9–11.
- Chan, J.F., Lau, S.K., Yuen, K.-Y., and Woo, P.C. (2016) *Talaromyces (Penicillium) marneffei* infection in non-HIV-infected patients. *Emerg. Microbes Infect.* **5**: e19.
- Chang, P.K., Cary, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Bennett, J.W., Linz, J.E., et al. (1993) Cloning of the *Aspergillus parasiticus* *apa-2* gene associated with the regulation of aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3273–3279.
- Chang, P.-K., Ehrlich, K.C., Yu, J., Bhatnagar, D., and Cleveland, T.E. (1995) Increased expression of *Aspergillus parasiticus* *aflR*, encoding a sequence-specific DNA-binding protein, relieves nitrate inhibition of aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2372–2377.
- Chen, C.-H., Ringelberg, C.S., Gross, R.H., Dunlap, J.C., and Loros, J.J. (2009) Genome-wide analysis of light-inducible responses reveals hierarchical light signalling in *Neurospora*. *EMBO J.* **28**: 1029–1042.
- Chen, H., Lee, M.-H., Daub, M.E., and Chung, K.-R. (2007) Molecular analysis of the cercosporin biosynthetic gene cluster in *Cercospora nicotianae*. *Mol. Microbiol.* **64**: 755–770.
- Chen, Y.-P., Yuan, G.-F., Hsieh, S.-Y., Lin, Y.-S., Wang, W.-Y., Liaw, L.-L., and Tseng, C.-P. (2010) Identification of the *mokH* Gene Encoding Transcription Factor for the Upregulation of Monacolin K Biosynthesis in *Monascus pilosus*. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 287–293.
- Cheng, X., Collins, R.E., and Zhang, X. (2005) Structural and Sequence Motifs of Protein (Histone) Methylation Enzymes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **34**: 267–294.
- Chiang, Y.-M., Szewczyk, E., Davidson, A.D., Entwistle, R., Keller, N.P., Wang, C.C.C., and Oakley, B.R. (2010) Characterization of the *Aspergillus nidulans* Monodictyphenone Gene Cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 2067–2074.
- Chiang, Y.-M., Szewczyk, E., Davidson, A.D., Keller, N., Oakley, B.R., and Wang, C.C.C. (2009) A Gene Cluster Containing Two Fungal Polyketide Synthases Encodes the Biosynthetic Pathway for a Polyketide, Asperfuranone, in *Aspergillus nidulans*. *J. Am. Chem. Soc.* **131**: 2965–2970.
- Chiou, C.-H., Miller, M., Wilson, D.L., Trail, F., and Linz, J.E. (2002) Chromosomal Location Plays a Role in Regulation of Aflatoxin Gene Expression in *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 306–315.
- Chivasa, S., Ndimba, B.K., Simon, W.J., Lindsey, K., and Slabas, A.R. (2005) Extracellular ATP Functions as an Endogenous External Metabolite Regulating Plant Cell Viability. *Plant Cell* **17**: 3019–3034.
- Choquer, M., Robin, G., Pêcheur, P.L., Giraud, C., Levis, C., and Viaud, M. (2008) Ku70 or Ku80 deficiencies in the fungus *Botrytis cinerea* facilitate targeting of genes that are hard to knock out in a wild-type context. *FEMS Microbiol. Lett.* **289**: 225–232.
- Chujo, T. and Scott, B. (2014) Histone H3K9 and H3K27 methylation regulates fungal alkaloid biosynthesis in a fungal endophyte-plant symbiosis: K9 and K27 methylation regulates symbiosis. *Mol. Microbiol.* **92**: 413–434.
- Cockell, M. and Gasser, S.M. (1999) Nuclear compartments and gene regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**: 199–205.
- Collado, I.G. and Viaud, M. (2016) Secondary Metabolism in *Botrytis cinerea*: Combining Genomic and Metabolomic Approaches. In, Fillinger, S. and Elad, Y. (eds), *Botrytis – the Fungus, the*

- Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer International Publishing, Cham, pp. 291–313.
- Collemare, J., Pianfetti, M., Houille, A.-E., Morin, D., Camborde, L., Gagey, M.-J., *et al.* (2008) *Magnaporthe grisea* avirulence gene *ACE1* belongs to an infection-specific gene cluster involved in secondary metabolism. *New Phytol.* **179**: 196–208.
- Connolly, L.R., Smith, K.M., and Freitag, M. (2013) The *Fusarium graminearum* Histone H3 K27 Methyltransferase KMT6 Regulates Development and Expression of Secondary Metabolite Gene Clusters. *PLoS Genet* **9**: e1003916.
- Crawford, J.M., Korman, T.P., Labonte, J.W., Vagstad, A.L., Hill, E.A., Kamari-Bidkorpeh, O., *et al.* (2009) Structural basis for biosynthetic programming of fungal aromatic polyketide cyclization. *Nature* **461**: 1139–1143.
- Cuesta Arenas, Y., Kalkman, E.R.I.C., Schouten, A., Dieho, M., Vredenburg, P., Uwumukiza, B., *et al.* (2010) Functional analysis and mode of action of phytotoxic Nep1-like proteins of *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **74**: 376–386.
- Dalmis, B., Schumacher, J., Moraga, J., Le Pêcheur, P., Tudzynski, B., Collado, I.G., and Viaud, M. (2011) The *Botrytis cinerea* phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial: Botcinic acid biosynthesis gene clusters. *Mol. Plant Pathol.* **12**: 564–579.
- Davis, E.M. and Croteau, R. (2000) Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. In, *Biosynthesis*. Springer, pp. 53–95.
- Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., *et al.* (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology: Top 10 fungal pathogens. *Mol. Plant Pathol.* **13**: 414–430.
- Deans, C. and Maggert, K.A. (2015) What Do You Mean, “Epigenetic”? *Genetics* **199**: 887–896.
- Dechassa, M.L., Zhang, B., Horowitz-Scherer, R., Persinger, J., Woodcock, C.L., Peterson, C.L., and Bartholomew, B. (2008) Architecture of the SWI/SNF-Nucleosome Complex. *Mol. Cell. Biol.* **28**: 6010–6021.
- Demain, A.L. and Martens, E. (2016) Production of valuable compounds by molds and yeasts. *J. Antibiot. (Tokyo)*.
- Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K., and Zhou, M.-M. (1999) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* **399**: 491–496.
- Dickman, M.B., Park, Y.K., Oltersdorf, T., Li, W., Clemente, T., and French, R. (2001) Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 6957–6962.
- Dictionary of Natural Products.
- Divon, H.H. and Fluhr, R. (2007) Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants. *FEMS Microbiol. Lett.* **266**: 65–74.
- Durán-Patrón, R., Hernández-Galán, R., Rebordinos, L.G., Cantoral, J.M., and Collado, I.G. (1999) Structure-activity relationships of new phytotoxic metabolites with the botryane skeleton from *Botrytis cinerea*. *Tetrahedron* **55**: 2389–2400.
- Ehrlich, K.C., Cary, J.W., and Montalbano, B.G. (1999) Characterization of the promoter for the gene encoding the aflatoxin biosynthetic pathway regulatory protein AFLR. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gene Struct. Expr.* **1444**: 412–417.
- Ehrlich, K.C., Montalbano, B.G., and Cary, J.W. (1999) Binding of the C6-zinc cluster protein, AFLR, to the promoters of aflatoxin pathway biosynthesis genes in *Aspergillus parasiticus*. *Gene* **230**: 249–257.
- Elad, Y. (2016) Cultural and Integrated Control of *Botrytis* spp. In, Fillinger, S. and Elad, Y. (eds), *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer International Publishing, pp. 149–164.
- Elad, Y., Pertot, I., Cotes Prado, A.M., and Stewart, A. (2016) Plant Hosts of *Botrytis* spp. In, Fillinger, S. and Elad, Y. (eds), *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer International Publishing, Cham, pp. 413–486.
- Ellenberger, T.E., Brandl, C.J., Struhl, K., and Harrison, S.C. (1992) The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted α Helices: Crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell* **71**: 1223–1237.

- Elliott, C.E., Callahan, D.L., Schwenk, D., Nett, M., Hoffmeister, D., and Howlett, B.J. (2013) A gene cluster responsible for biosynthesis of phomonoic acid in the plant pathogenic fungus, *Leptosphaeria maculans*. *Fungal Genet. Biol.* **53**: 50–58.
- Elliott, C.E., Gardiner, D.M., Thomas, G., Cozijnsen, A., Van De Wouw, A., and Howlett, B.J. (2007) Production of the toxin sirodesmin PL by *Leptosphaeria maculans* during infection of *Brassica napus*. *Mol. Plant Pathol.* **8**: 791–802.
- Fazzari, M.J. and Grealley, J.M. (2004) Epigenomics: beyond CpG islands. *Nat. Rev. Genet.* **5**: 446–455.
- Fehlhaber, H.-W., Geipel, R., Mercker, H.-J., Tschesche, R., Welmar, K., and Schönbeck, F. (1974) Botrydial, ein Sesquiterpen-Antibiotikum aus der Nährlösung des Pilzes *Botrytis cinerea*. *Chem. Ber.* **107**: 1720–1730.
- Felsenfeld, G. and Groudine, M. (2003) Controlling the double helix. *Nature* **421**: 448–453.
- Feng, B. and Marzluf, G.A. (1998) Interaction between major nitrogen regulatory protein NIT2 and pathway-specific regulatory factor NIT4 is required for their synergistic activation of gene expression in *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 3983–3990.
- Fernandes, M., Keller, N.P., and Adams, T.H. (1998) Sequence-specific binding by *Aspergillus nidulans* AfIR, a C6 zinc cluster protein regulating mycotoxin biosynthesis. *Mol. Microbiol.* **28**: 1355–1365.
- Ferreira, M.E. da S., Heinekamp, T., Härtl, A., Brakhage, A.A., Semighini, C.P., Harris, S.D., et al. (2007) Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* calcineurin. *Fungal Genet. Biol.* **44**: 219–230.
- Feschotte, C. (2008) Transposable elements and the evolution of regulatory networks. *Nat. Rev. Genet.* **9**: 397–405.
- Fillinger, S. and Walker, A.-S. (2016) Chemical Control and Resistance Management of *Botrytis* Diseases. In: Fillinger, S. and Elad, Y. (eds), *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer International Publishing, pp. 189–216.
- Fisch, K.M. (2013) Biosynthesis of natural products by microbial iterative hybrid PKS–NRPS. *RSC Adv.* **3**: 18228.
- Flaherty, J.E. and Woloshuk, C.P. (2004) Regulation of Fumonisin Biosynthesis in *Fusarium verticillioides* by a Zinc Binuclear Cluster-Type Gene, ZFR1. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 2653–2659.
- Fleetwood, D.J., Scott, B., Lane, G.A., Tanaka, A., and Johnson, R.D. (2007) A Complex Ergovaline Gene Cluster in *Epichloë* Endophytes of Grasses. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 2571–2579.
- Fleming, A. (1929) On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* **10**: 226.
- Fournier, E. and Giraud, T. (2007) Sympatric genetic differentiation of a generalist pathogenic fungus, *Botrytis cinerea*, on two different host plants, grapevine and bramble. *J. Evol. Biol.* **0**: 071119204355002–???
- Fournier, E., Gladioux, P., and Giraud, T. (2013) The “Dr Jekyll and Mr Hyde fungus”: noble rot versus gray mold symptoms of *Botrytis cinerea* on grapes. *Evol. Appl.* **6**: 960–969.
- Foss, H.M., Roberts, C.J., Claeys, K.M., and Selker, E.U. (1993) Abnormal chromosome behavior in *Neurospora* mutants defective in DNA methylation. *Science* **262**: 1737–1741.
- Fox, E.M., Gardiner, D.M., Keller, N.P., and Howlett, B.J. (2008) A Zn(II)₂Cys₆ DNA binding protein regulates the sirodesmin PL biosynthetic gene cluster in *Leptosphaeria maculans*. *Fungal Genet. Biol. FG B* **45**: 671–682.
- Fox, E.M. and Howlett, B.J. (2008) Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**: 481–487.
- Freitag, M. (2014) Fungal Chromatin and Its Role in Regulation of Gene Expression. In: Nowrousian, M. (ed), *Fungal Genomics*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 99–120.
- Freitag, M., Hickey, P.C., Khlafallah, T.K., Read, N.D., and Selker, E.U. (2004) HP1 is essential for DNA methylation in *Neurospora*. *Mol. Cell* **13**: 427–434.
- Frías, M., González, C., and Brito, N. (2011) BcSp11, a cerato-platanin family protein, contributes to *Botrytis cinerea* virulence and elicits the hypersensitive response in the host. *New Phytol.* **192**: 483–495.

- Friesen, T.L., Faris, J.D., Solomon, P.S., and Oliver, R.P. (2008) Host-specific toxins: effectors of necrotrophic pathogenicity. *Cell. Microbiol.* **10**: 1421–1428.
- Fu, Y.H. and Marzluf, G.A. (1987) Characterization of nit-2, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 1691–1696.
- Gacek-Matthews, A., Berger, H., Sasaki, T., Wittstein, K., Gruber, C., Lewis, Z.A., and Strauss, J. (2016) KdmB, a Jumonji Histone H3 Demethylase, Regulates Genome-Wide H3K4 Trimethylation and Is Required for Normal Induction of Secondary Metabolism in *Aspergillus nidulans*. *PLOS Genet.* **12**: e1006222.
- Gacek-Matthews, A., Noble, L.M., Gruber, C., Berger, H., Sulyok, M., Marcos, A.T., *et al.* (2015) KdmA, a histone H3 demethylase with bipartite function, differentially regulates primary and secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*: Histone H3K9 demethylase function in growth. *Mol. Microbiol.* **96**: 839–860.
- Galazka, J.M. and Freitag, M. (2014) Variability of chromosome structure in pathogenic fungi—of “ends and odds.” *Curr. Opin. Microbiol.* **20**: 19–26.
- Gao, F. and Zhang, C.-T. (2006) GC-Profile: a web-based tool for visualizing and analyzing the variation of GC content in genomic sequences. *Nucleic Acids Res.* **34**: W686–W691.
- Georgel, P.T. (2015) The danger of epigenetics misconceptions (epigenetics and stuff...). *Biochem. Cell Biol.* 1–4.
- Giesbert, S., Schumacher, J., Kupas, V., Espino, J., Segmüller, N., Haeuser-Hahn, I., *et al.* (2011) Identification of Pathogenesis-Associated Genes by T-DNA-Mediated Insertional Mutagenesis in *Botrytis cinerea*: A Type 2A Phosphoprotein Phosphatase and an SPT3 Transcription Factor Have Significant Impact on Virulence. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **25**: 481–495.
- Gijzen, M. and Nürnberger, T. (2006) Nep1-like proteins from plant pathogens: Recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. *Phytochemistry* **67**: 1800–1807.
- Gillet, R., Bobichon, H., and Trentesaux, C. (2002) Nuclear transcription factor GATA-1 is activated during aclacinomycin-induced erythroid differentiation. *Biol. Cell* **94**: 267–273.
- Gómez, D., Cubero, B., Cecchetto, G., and Scazzocchio, C. (2002) PrnA, a Zn2Cys6 activator with a unique DNA recognition mode, requires inducer for in vivo binding. *Mol. Microbiol.* **44**: 585–597.
- Govrin, E.M. and Levine, A. (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.* **10**: 751–757.
- Gutierrez, S.E. and Romero-Oliva, F.A. (2013) Epigenetic changes: a common theme in acute myelogenous leukemogenesis. *J. Hematol. Oncol.* **6**: 1.
- Haas, H. (2014) Fungal siderophore metabolism with a focus on *Aspergillus fumigatus*. *Nat. Prod. Rep.* **31**: 1266–1276.
- Haas, H. (2003) Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**: 316–330.
- Haas, H., Eisendle, M., and Turgeon, B.G. (2008) Siderophores in Fungal Physiology and Virulence. *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**: 149–187.
- Hacquard, S., Kracher, B., Hiruma, K., Münch, P.C., Garrido-Oter, R., Thon, M.R., *et al.* (2016) Survival trade-offs in plant roots during colonization by closely related beneficial and pathogenic fungi. *Nat. Commun.* **7**: 11362.
- Hahn, M., Viaud, M., and van Kan, J. (2014) The Genome of *Botrytis cinerea*, a Ubiquitous Broad Host Range Necrotroph. In, Dean, R.A., Lichens-Park, A., and Kole, C. (eds), *Genomics of Plant-Associated Fungi and Oomycetes: Dicot Pathogens*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 19–44.
- Hane, J.K. and Oliver, R.P. (2008) RIPCAL: a tool for alignment-based analysis of repeat-induced point mutations in fungal genomic sequences. *BMC Bioinformatics* **9**: 478.
- Have, A. ten, Mulder, W., Visser, J., and van Kan, J.A.L. (1998) The Endopolygalacturonase Gene Bcpg1 Is Required for Full Virulence of *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **11**: 1009–1016.
- Hawksworth, D.L. (2001) The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited*. *Mycol. Res.* **105**: 1422–1432.

- Hebbes, T.R., Clayton, A.L., Thorne, A.W., and Crane-Robinson, C. (1994) Core histone hyperacetylation co-maps with generalized DNase I sensitivity in the chicken beta-globin chromosomal domain. *EMBO J.* **13**: 1823.
- Heinekamp, T., Thywißen, A., Macheleidt, J., Keller, S., Valiante, V., and Brakhage, A.A. (2013) *Aspergillus fumigatus* melanins: interference with the host endocytosis pathway and impact on virulence. *Front. Microbiol.* **3**:
- Heller, J., Ruhnke, N., Espino, J.J., Massaroli, M., Collado, I.G., and Tudzynski, P. (2012) The Mitogen-Activated Protein Kinase BcSak1 of *Botrytis cinerea* Is Required for Pathogenic Development and Has Broad Regulatory Functions Beyond Stress Response. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **25**: 802–816.
- Heller, J. and Tudzynski, P. (2011) Reactive Oxygen Species in Phytopathogenic Fungi: Signaling, Development, and Disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **49**: 369–390.
- Henson, J.M., Butler, M.J., and Day, A.W. (1999) The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* **37**: 447–471.
- Hobert, O., Jallal, B., and Ullrich, A. (1996) Interaction of Vav with ENX-1, a putative transcriptional regulator of homeobox gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 3066–3073.
- Hoff, B., Kamerewerd, J., Sigl, C., Mitterbauer, R., Zadra, I., Kürnsteiner, H., and Kück, U. (2010) Two Components of a velvet-Like Complex Control Hyphal Morphogenesis, Conidiophore Development, and Penicillin Biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Eukaryot. Cell* **9**: 1236–1250.
- Hoffmeister, D. and Keller, N.P. (2007) Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Nat. Prod. Rep.* **24**: 393.
- Hong, L., Schroth, G.P., Matthews, H.R., Yau, P., and Bradbury, E.M. (1993) Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 “tail” to DNA. *J. Biol. Chem.* **268**: 305–314.
- Horwitz, B.A., Condon, B.J., and Turgeon, B.G. (2013) *Cochliobolus heterostrophus*: A Dothideomycete Pathogen of Maize. In, Horwitz, B.A., Mukherjee, P.K., Mukherjee, M., and Kubicek, C.P. (eds), *Genomics of Soil- and Plant-Associated Fungi*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 213–228.
- Howlett, B.J. (2006) Secondary metabolite toxins and nutrition of plant pathogenic fungi. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**: 371–375.
- Huang, X. and Li, H. (2009) Cloning and bioinformatic analysis of lovastatin biosynthesis regulatory gene lovE. *Chin. Med. J. (Engl.)* **122**: 1800–1805.
- Hurst, H.C. (1995) Transcription factors 1: bZIP proteins. *Protein Profile* **2**: 101–168.
- Jamieson, K., Rountree, M.R., Lewis, Z.A., Stajich, J.E., and Selker, E.U. (2013) Regional control of histone H3 lysine 27 methylation in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**: 6027–6032.
- Jamieson, K., Wiles, E.T., McNaught, K.J., Sidoli, S., Leggett, N., Shao, Y., et al. (2016) Loss of HP1 causes depletion of H3K27me3 from facultative heterochromatin and gain of H3K27me2 at constitutive heterochromatin. *Genome Res.* **26**: 97–107.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001) Translating the Histone Code. *Science* **293**: 1074–1080.
- Jenuwein, T., Laible, G., Dorn, R., and Reuter, G. (1998) SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **54**: 80–93.
- Jolly, C., Morimoto, R., Robert-Nicoud, M., and Vourc’h, C. (1997) HSF1 transcription factor concentrates in nuclear foci during heat shock: relationship with transcription sites. *J. Cell Sci.* **110**: 2935–2941.
- Jones, R.S. and Gelbart, W.M. (1993) The Drosophila Polycomb-group gene Enhancer of zeste contains a region with sequence similarity to trithorax. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 6357–6366.
- de Jong, J.C., McCormack, B.J., Smirnoff, N., and Talbot, N.J. (1997) Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* **389**: 244–244.
- van Kan, J.A.L. (2006) Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci.* **11**: 247–253.
- van Kan, J.A.L., Stassen, J.H.M., Mosbach, A., Van Der Lee, T.A.J., Faino, L., Farmer, A.D., et al. (2016) A gapless genome sequence of the fungus *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* *in press*:

- Kars, I., Krooshof, G.H., Wagemakers, L., Joosten, R., Benen, J.A.E., and Van Kan, J.A.L. (2005) Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*: Necrotizing activity of BcPGs. *Plant J.* **43**: 213–225.
- Kawamura, C., Tsujimoto, T., and Tsuge, T. (1999) Targeted Disruption of a Melanin Biosynthesis Gene Affects Conidial Development and UV Tolerance in the Japanese Pear Pathotype of *Alternaria alternata*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **12**: 59–63.
- Kazazian, H.H. (2004) Mobile elements: drivers of genome evolution. *science* **303**: 1626–1632.
- Keller, N.P. and Hohn, T.M. (1997) Metabolic Pathway Gene Clusters in Filamentous Fungi. *Fungal Genet. Biol.* **21**: 17–29.
- Keller, N.P., Turner, G., and Bennett, J.W. (2005) Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 937–947.
- Kelloniemi, J., Trouvelot, S., Héloir, M.-C., Simon, A., Dalmais, B., Frettinger, P., *et al.* (2015) Analysis of the Molecular Dialogue Between Gray Mold (*Botrytis cinerea*) and Grapevine (*Vitis vinifera*) Reveals a Clear Shift in Defense Mechanisms During Berry Ripening. *Mol. Plant. Microbe Interact.* MPMI-02-15-0039.
- Khalidi, N., Seifuddin, F.T., Turner, G., Haft, D., Nierman, W.C., Wolfe, K.H., and Fedorova, N.D. (2010) SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genet. Biol.* **47**: 736–741.
- Kim, J.-E., Jin, J., Kim, H., Kim, J.-C., Yun, S.-H., and Lee, Y.-W. (2006) GIP2, a Putative Transcription Factor That Regulates the Aurofusarin Biosynthetic Gene Cluster in *Gibberella zeae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 1645–1652.
- Kim, W., Park, J.-J., Gang, D.R., Peever, T.L., and Chen, W. (2015) A Novel Type Pathway-Specific Regulator and Dynamic Genome Environments of a Solanapyrone Biosynthesis Gene Cluster in the Fungus *Ascochyta rabiei*. *Eukaryot. Cell* **14**: 1102–1113.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Stalpers, J.A., and Ainsworth, G.C. (2008) Dictionary of the fungi CSIRO Pub., Collingwood, Vic.
- Knox, B.P. and Keller, N.P. (2015) Key Players in the Regulation of Fungal Secondary Metabolism. In, Zeilinger, S., Martín, J.-F., and García-Estrada, C. (eds), *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites, Volume 2*. Springer New York, New York, NY, pp. 13–28.
- Kolmer, J. (2013) Leaf Rust of Wheat: Pathogen Biology, Variation and Host Resistance. *Forests* **4**: 70–84.
- Kosalková, K., García-Estrada, C., Ullán, R.V., Godio, R.P., Feltrer, R., Teijeira, F., *et al.* (2009) The global regulator LaeA controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine C synthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Biochimie* **91**: 214–225.
- Kouzarides, T. (2007a) Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* **128**: 693–705.
- Kouzarides, T. (2007b) SnapShot: Histone-Modifying Enzymes. *Cell* **128**: 802.e1-802.e2.
- Kouzminova, E. and Selker, E.U. (2001) dim-2 encodes a DNA methyltransferase responsible for all known cytosine methylation in *Neurospora*. *EMBO J.* **20**: 4309–4323.
- Krajewski, W.A. and Becker, P.B. (1998) Reconstitution of hyperacetylated, DNase I-sensitive chromatin characterized by high conformational flexibility of nucleosomal DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 1540–1545.
- Kroken, S., Glass, N.L., Taylor, J.W., Yoder, O.C., and Turgeon, B.G. (2003) Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 15670–15675.
- Kwon, H.-R., Son, S.-W., Han, H.-R., Choi, G.-J., Jang, K.-S., and Choi, Y.-H. (2007) Nematicidal Activity of Bikaverin and Fusaric Acid Isolated from *Fusarium oxysporum* against Pine Wood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Plant Pathol. J.* **23**:
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., *et al.* (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860–921.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F., and McKnight, S.L. (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**: 1759–1764.
- Leroch, M., Kretschmer, M., and Hahn, M. (2011) Fungicide Resistance Phenotypes of *Botrytis cinerea* Isolates from Commercial Vineyards in South West Germany: Fungicide Resistance of *B. cinerea* Isolates from Vineyards. *J. Phytopathol.* **159**: 63–65.

- Lessing, F., Kniemeyer, O., Wozniok, I., Loeffler, J., Kurzai, O., Haertl, A., and Brakhage, A.A. (2007) The *Aspergillus fumigatus* Transcriptional Regulator AfYap1 Represents the Major Regulator for Defense against Reactive Oxygen Intermediates but Is Dispensable for Pathogenicity in an Intranasal Mouse Infection Model. *Eukaryot. Cell* **6**: 2290–2302.
- Lev, S., Hadar, R., Amedeo, P., Baker, S.E., Yoder, O.C., and Horwitz, B.A. (2005) Activation of an AP1-Like Transcription Factor of the Maize Pathogen *Cochliobolus heterostrophus* in Response to Oxidative Stress and Plant Signals. *Eukaryot. Cell* **4**: 443–454.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., and Lamb, C. (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**: 583–593.
- Levine, M. and Tjian, R. (2003) Transcription regulation and animal diversity. *Nature* **424**: 147–151.
- Levis, C., Fortini, D., and Brygoo, Y. (1997) Transformation of *Botrytis cinerea* with the nitrate reductase gene (*niaD*) shows a high frequency of homologous recombination. *Curr. Genet.* **32**: 157–162.
- Lewis, Z.A., Honda, S., Khlafallah, T.K., Jeffress, J.K., Freitag, M., Mohn, F., *et al.* (2009) Relics of repeat-induced point mutation direct heterochromatin formation in *Neurospora crassa*. *Genome Res.* **19**: 427–437.
- Liang, S.-H., Wu, T.-S., Lee, R., Chu, F.S., and Linz, J.E. (1997) Analysis of mechanisms regulating expression of the *ver-1* gene, involved in aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1058–1065.
- Liu, Y., Liu, N., Yin, Y., Chen, Y., Jiang, J., and Ma, Z. (2015) Histone H3K4 methylation regulates hyphal growth, secondary metabolism, and multiple stress responses in *Fusarium graminearum*. *Environ. Microbiol.* n/a-n/a.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **25**: 402–408.
- Llorca, C.M., Potschin, M., and Zentgraf, U. (2014) bZIPs and WRKYs: two large transcription factor families executing two different functional strategies. *Plant Syst. Synth. Biol.* **5**: 169.
- Losada, L., Ajayi, O., Frisvad, J.C., Yu, J., and Nierman, W.C. (2009) Effect of competition on the production and activity of secondary metabolites in *Aspergillus* species. *Med. Mycol.* **47**: S88–S96.
- Lynch, M. and Conery, J.S. (2000) The Evolutionary Fate and Consequences of Duplicate Genes. *Science* **290**: 1151–1155.
- Lyu, X., Shen, C., Fu, Y., Xie, J., Jiang, D., Li, G., and Cheng, J. (2016) A Small Secreted Virulence-Related Protein Is Essential for the Necrotrophic Interactions of *Sclerotinia sclerotiorum* with Its Host Plants. *PLOS Pathog* **12**: e1005435.
- MacPherson, S., Larochelle, M., and Turcotte, B. (2006) A Fungal Family of Transcriptional Regulators: the Zinc Cluster Proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**: 583–604.
- Malmierca, M.G., Izquierdo-Bueno, I., McCormick, S.P., Cardoza, R.E., Alexander, N.J., Moraga, J., *et al.* (2016) Botrydial and botcinins produced by *Botrytis cinerea* regulate expression of *Trichoderma arundinaceum* genes involved in trichothecene biosynthesis: Fungal metabolites cross-regulation. *Mol. Plant Pathol.*
- Manzoni, M. and Rollini, M. (2002) Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**: 555–564.
- Margueron, R. and Reinberg, D. (2011) The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* **469**: 343–349.
- Martin, J.F. and Liras, P. (1989) Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**: 173–206.
- Masloff, S., Pöggeler, S., and Kück, U. (1999) The *pro1+* gene from *Sordaria macrospora* encodes a C6 zinc finger transcription factor required for fruiting body development. *Genetics* **152**: 191–199.
- Massari, M.E. and Murre, C. (2000) Helix-Loop-Helix Proteins: Regulators of Transcription in Eucaryotic Organisms. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 429–440.
- Massaroli, M., Moraga, J., Bastos Borges, K., Ramírez-Fernández, J., Viaud, M., González Collado, I., *et al.* (2013) A Shared Biosynthetic Pathway for Botcinins and Botrylactones Revealed through Gene Deletions. *ChemBioChem* **14**: 132–136.

- Matzanke, B.F., Bill, E., Trautwein, A.X., and Winkelmann, G. (1987) Role of siderophores in iron storage in spores of *Neurospora crassa* and *Aspergillus ochraceus*. *J. Bacteriol.* **169**: 5873–5876.
- Meeley, R.B. and Walton, J.D. (1991) Enzymatic Detoxification of HC-toxin, the Host-Selective Cyclic Peptide from *Cochliobolus carbonum* 1. *Plant Physiol.* **97**: 1080–1086.
- Mendgen, K. and Hahn, M. (2002) Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends Plant Sci.* **7**: 352–356.
- Michielse, C.B., Becker, M., Heller, J., Moraga, J., Collado, I.G., and Tudzynski, P. (2011) The *Botrytis cinerea* Reg1 Protein, a Putative Transcriptional Regulator, Is Required for Pathogenicity, Conidiogenesis, and the Production of Secondary Metabolites. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **24**: 1074–1085.
- Mihlan, M., Homann, V., Liu, T.-W.D., and Tudzynski, B. (2003) AREA directly mediates nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, but its activity is not affected by NMR. *Mol. Microbiol.* **47**: 975–991.
- Miller, J.D. and McMullin, D.R. (2014) Fungal secondary metabolites as harmful indoor air contaminants: 10 years on. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 9953–9966.
- Miller, S.B.M., Mogk, A., and Bukau, B. (2015) Spatially Organized Aggregation of Misfolded Proteins as Cellular Stress Defense Strategy. *J. Mol. Biol.* **427**: 1564–1574.
- Nathan, C. and Cars, O. (2014) Antibiotic Resistance — Problems, Progress, and Prospects. *N. Engl. J. Med.* **371**: 1761–1763.
- Neilands, J.B. (1995) Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *J. Biol. Chem.* **270**: 26723–26726.
- Nicot, P.C., Stewart, A., Bardin, M., and Elad, Y. (2016) Biological Control and Biopesticide Suppression of *Botrytis*-Incited Diseases. In, Fillinger, S. and Elad, Y. (eds), *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer International Publishing, pp. 165–187.
- Nielsen, P.R., Nietlispach, D., Mott, H.R., Callaghan, J., Bannister, A., Kouzarides, T., *et al.* (2002) Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. *Nature* **416**: 103–107.
- Nutzmann, H.-W., Reyes-Dominguez, Y., Scherlach, K., Schroeckh, V., Horn, F., Gacek, A., *et al.* (2011) Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans* requires Saga/Ada-mediated histone acetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 14282–14287.
- Ohm, R.A., Feau, N., Henrissat, B., Schoch, C.L., Horwitz, B.A., Barry, K.W., *et al.* (2012) Diverse Lifestyles and Strategies of Plant Pathogenesis Encoded in the Genomes of Eighteen Dothideomycetes Fungi. *PLOS Pathog* **8**: e1003037.
- Oide, S., Moeder, W., Krasnoff, S., Gibson, D., Haas, H., Yoshioka, K., and Turgeon, B.G. (2006) NPS6, Encoding a Nonribosomal Peptide Synthetase Involved in Siderophore-Mediated Iron Metabolism, Is a Conserved Virulence Determinant of Plant Pathogenic Ascomycetes. *Plant Cell* **18**: 2836–2853.
- Oliver, R.P. and Solomon, P.S. (2008) Recent fungal diseases of crop plants: is lateral gene transfer a common theme? *Mol. Plant. Microbe Interact.* **21**: 287–293.
- Olufemi, L. and Bartholomew, B. (2013) Nucleosome Remodelling. In, *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. Elsevier, pp. 136–138.
- Palmer, J.M., Bok, J.W., Lee, S., Dagenais, T.R.T., Andes, D.R., Kontoyiannis, D.P., and Keller, N.P. (2013) Loss of CclA, required for histone 3 lysine 4 methylation, decreases growth but increases secondary metabolite production in *Aspergillus fumigatus*. *PeerJ* **1**:
- Palmer, J.M. and Keller, N.P. (2010) Secondary metabolism in fungi: does chromosomal location matter? *Curr. Opin. Microbiol.* **13**: 431–436.
- Palmer, J.M., Mallareddy, S., Perry, D.W., Sanchez, J.F., Theisen, J.M., Szewczyk, E., *et al.* (2010) Telomere position effect is regulated by heterochromatin-associated proteins and NkuA in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **156**: 3522–3531.
- Pan, H., Feng, B., and Marzluf, G.A. (1997) Two distinct protein–protein interactions between the NIT2 and NMR regulatory proteins are required to establish nitrogen metabolite repression in *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.* **26**: 721–729.

- Pan, T. and Coleman, J.E. (1990) DNA binding domain of GAL4 forms a binuclear metal ion complex. *Biochemistry (Mosc.)* **29**: 3023–3029.
- Payne, G.A., Nystrom, G.J., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., and Woloshuk, C.P. (1993) Cloning of the afl-2 gene involved in aflatoxin biosynthesis from *Aspergillus flavus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 156–162.
- Peleg, Y., Addison, R., Aramayo, R., and Metzenberg, R.L. (1996) Translocation of *Neurospora crassa* Transcription Factor NUC-1 into the Nucleus Is Induced by Phosphorus Limitation. *Fungal Genet. Biol.* **20**: 185–191.
- Pérez-Jiménez, R.M. (2006) A review of the biology and pathogenicity of *Rosellinia necatrix*—the cause of white root rot disease of fruit trees and other plants. *J. Phytopathol.* **154**: 257–266.
- Perrin, R.M., Fedorova, N.D., Bok, J.W., Cramer, R.A., Wortman, J.R., Kim, H.S., *et al.* (2007) Transcriptional Regulation of Chemical Diversity in *Aspergillus fumigatus* by LaeA. *PLoS Pathog.* **3**: e50.
- Ponts, N., Harris, E.Y., Prudhomme, J., Wick, I., Eckhardt-Ludka, C., Hicks, G.R., *et al.* (2010) Nucleosome landscape and control of transcription in the human malaria parasite. *Genome Res.* **20**: 228–238.
- Porquier, A., Morgant, G., Moraga, J., Dalmais, B., Luyten, I., Simon, A., *et al.* (2016a) The botrydial biosynthetic gene cluster of *Botrytis cinerea* displays a bipartite genomic structure and is positively regulated by the putative Zn(II)2Cys6 transcription factor BcBot6. *Fungal Genet. Biol.* **96**: 33–46.
- Porquier, A., Morgant, G., Moraga, J., Dalmais, B., Luyten, I., Simon, A., *et al.* (2016b) The botrydial biosynthetic gene cluster of *Botrytis cinerea* displays a bipartite genomic structure and is positively regulated by the putative Zn(II)2Cys6 transcription factor BcBot6. *Fungal Genet. Biol.*
- Pray-Grant, M.G., Daniel, J.A., Schieltz, D., Yates, J.R., and Grant, P.A. (2005) Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature* **433**: 434–438.
- Price, M.S., Yu, J., Nierman, W.C., Kim, H.S., Pritchard, B., Jacobus, C.A., *et al.* (2006) The aflatoxin pathway regulator AfIR induces gene transcription inside and outside of the aflatoxin biosynthetic cluster. *FEMS Microbiol. Lett.* **255**: 275–279.
- Quidde, T., Osbourn, A., and Tudzynski, P. (1998) Detoxification of α -tomatine by *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **52**: 151–165.
- Rasmussen, T.B., Skindersoe, M.E., Bjarnsholt, T., Phipps, R.K., Christensen, K.B., Jensen, P.O., *et al.* (2005) Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology* **151**: 1325–1340.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O’Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.-W., Schmid, M., *et al.* (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**: 593–599.
- Reyes-Dominguez, Y., Boedi, S., Sulyok, M., Wiesenberger, G., Stoppacher, N., Krska, R., and Strauss, J. (2012) Heterochromatin influences the secondary metabolite profile in the plant pathogen *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet. Biol.* **49**: 39–47.
- Reyes-Dominguez, Y., Bok, J.W., Berger, H., Shwab, E.K., Basheer, A., Gallmetzer, A., *et al.* (2010) Heterochromatic marks are associated with the repression of secondary metabolism clusters in *Aspergillus nidulans*: Heterochromatin regulation of secondary metabolism. *Mol. Microbiol.* **76**: 1376–1386.
- Rice, J.C. and Allis, C.D. (2001) Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**: 263–273.
- Richmond, T.J. and Davey, C.A. (2003) The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* **423**: 145–150.
- Riley, P.A. (1997) Melanin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**: 1235–1239.
- Robinson, K.A., Koepke, J.I., Kharodawala, M., and Lopes, J.M. (2000) A network of yeast basic helix–loop–helix interactions. *Nucleic Acids Res.* **28**: 4460–4466.
- Rohlf, M., Albert, M., Keller, N.P., and Kempken, F. (2007) Secondary chemicals protect mould from fungivory. *Biol. Lett.* **3**: 523–525.
- Rossi, F.R., Gárriz, A., Marina, M., Romero, F.M., Gonzalez, M.E., Collado, I.G., and Pieckenstein, F.L. (2011) The Sesquiterpene Botrydial Produced by *Botrytis cinerea* Induces the

- Hypersensitive Response on Plant Tissues and Its Action Is Modulated by Salicylic Acid and Jasmonic Acid Signaling. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **24**: 888–896.
- Rountree, M.R. and Selker, E.U. (2010) DNA methylation and the formation of heterochromatin in *Neurospora crassa*. *Heredity* **105**: 38–44.
- Rouxel, T. and Balesdent, M.H. (2005) The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era. *Mol. Plant Pathol.* **6**: 225–241.
- Rouxel, T., Grandaubert, J., Hane, J.K., Hoede, C., van de Wouw, A.P., Couloux, A., *et al.* (2011) Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by Repeat-Induced Point mutations. *Nat. Commun.* **2**: 202.
- Ruvkun, G. and Hobert, O. (1998) The taxonomy of developmental control in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **282**: 2033–2041.
- Scherlach, K. and Hertweck, C. (2006) Discovery of aspoquinolones A–D, prenylated quinoline-2-one alkaloids from *Aspergillus nidulans*, motivated by genome mining. *Org. Biomol. Chem.* **4**: 3517–3520.
- Schjerling, P. and Holmberg, S. (1996) Comparative amino acid sequence analysis of the C6 zinc cluster family of transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res.* **24**: 4599–4607.
- Schmaler-Ripcke, J., Sugareva, V., Gebhardt, P., Winkler, R., Kniemeyer, O., Heinekamp, T., and Brakhage, A.A. (2009) Production of Pyomelanin, a Second Type of Melanin, via the Tyrosine Degradation Pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 493–503.
- Schotanus, K., Soyer, J.L., Connolly, L.R., Grandaubert, J., Happel, P., Smith, K.M., *et al.* (2015) Histone modifications rather than the novel regional centromeres of *Zymoseptoria tritici* distinguish core and accessory chromosomes. *Epigenetics Chromatin* **8**: 41.
- Schroeckh, V., Scherlach, K., Nützmann, H.-W., Shelest, E., Schmidt-Heck, W., Schuemann, J., *et al.* (2009) Intimate bacterial–fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 14558–14563.
- Schumacher, J. (2008a) Calcineurin-Responsive Zinc Finger Transcription Factor CRZ1 of *Botrytis cinerea* Is Required for Growth, Development, and Full Virulence on Bean Plants. *Eukaryot. Cell* **7**: 584–601.
- Schumacher, J. (2016a) DHN melanin biosynthesis in the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea* is based on two developmentally regulated key enzyme (PKS)-encoding genes: DHN melanogenesis in *Botrytis cinerea*. *Mol. Microbiol.* **99**: 729–748.
- Schumacher, J. (2016b) Signal Transduction Cascades Regulating Differentiation and Virulence in *Botrytis cinerea*. In: Fillinger, S. and Elad, Y. (eds), *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer International Publishing, pp. 247–267.
- Schumacher, J. (2008b) The Ga subunit BCG1, the phospholipase C (BcPLC1) and the calcineurin phosphatase co-ordinately regulate gene expression in the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *Mol. Microbiol.* **67**: 1027–1050.
- Schumacher, J. (2012) Tools for *Botrytis cinerea*: New expression vectors make the gray mold fungus more accessible to cell biology approaches. *Fungal Genet. Biol.* **49**: 483–497.
- Schumacher, J., Gautier, A., Morgant, G., Studt, L., Ducrot, P.-H., Le Pêcheur, P., *et al.* (2013) A Functional Bikaverin Biosynthesis Gene Cluster in Rare Strains of *Botrytis cinerea* Is Positively Controlled by VELVET. *PLoS ONE* **8**:
- Schumacher, J., Pradier, J.-M., Simon, A., Traeger, S., Moraga, J., Collado, I.G., *et al.* (2012) Natural Variation in the VELVET Gene *bcvell1* Affects Virulence and Light-Dependent Differentiation in *Botrytis cinerea*. *PLoS ONE* **7**: e47840.
- Schumacher, J., Simon, A., Cohrs, K.C., Traeger, S., Porquier, A., Dalmais, B., *et al.* (2015) The VELVET complex in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*: impact of BcLAE1 on differentiation, secondary metabolism and virulence. *Mol. Plant. Microbe Interact.*
- Schumacher, J., Simon, A., Cohrs, K.C., Traeger, S., Porquier, A., Dalmais, B., *et al.* (2015) The VELVET Complex in the Gray Mold Fungus *Botrytis cinerea*: Impact of BcLAE1 on Differentiation, Secondary Metabolism, and Virulence. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **28**: 659–674.

- Segmuller, N., Ellendorf, U., Tudzynski, B., and Tudzynski, P. (2007) BcSAK1, a Stress-Activated Mitogen-Activated Protein Kinase, Is Involved in Vegetative Differentiation and Pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Eukaryot. Cell* **6**: 211–221.
- Shaaban, M., Palmer, J.M., EL-Naggar, W.A., EL-Sokkary, M.A., Habib, E.-S.E., and Keller, N.P. (2010) Involvement of transposon-like elements in penicillin gene cluster regulation. *Fungal Genet. Biol.* **47**: 423–432.
- Shaaban, M.I., Bok, J.W., Lauer, C., and Keller, N.P. (2010) Suppressor Mutagenesis Identifies a Velvet Complex Remediator of *Aspergillus nidulans* Secondary Metabolism. *Eukaryot. Cell* **9**: 1816–1824.
- Shaver, S., Casas-Mollano, J.A., Cerny, R.L., and Cerutti, H. (2010) Origin of the polycomb repressive complex 2 and gene silencing by an E(z) homolog in the unicellular alga *Chlamydomonas*. *Epigenetics* **5**: 301–312.
- Shaw, M.W., Emmanuel, C.J., Emilda, D., Terhem, R.B., Shafia, A., Tsamaidi, D., *et al.* (2016) Analysis of Cryptic, Systemic *Botrytis* Infections in Symptomless Hosts. *Front. Plant Sci.* **7**.
- Shelest, E. (2008) Transcription factors in fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* **286**: 145–151.
- Shimizu, T., Kinoshita, H., and Nihira, T. (2007) Identification and In Vivo Functional Analysis by Gene Disruption of *ctnA*, an Activator Gene Involved in Citrinin Biosynthesis in *Monascus purpureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 5097–5103.
- Shwab, E.K., Bok, J.W., Tribus, M., Galehr, J., Graessle, S., and Keller, N.P. (2007) Histone Deacetylase Activity Regulates Chemical Diversity in *Aspergillus*. *Eukaryot. Cell* **6**: 1656–1664.
- Siewers, V., Viaud, M., Jimenez-Teja, D., Collado, I.G., Gronover, C.S., Pradier, J.-M., *et al.* (2005) Functional Analysis of the Cytochrome P450 Monooxygenase Gene *bcbot1* of *Botrytis cinerea* Indicates That Botrydial Is a Strain-Specific Virulence Factor. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **18**: 602–612.
- Silar, P., Dairou, J., Cocaig, A., Busi, F., Rodrigues-Lima, F., and Dupret, J.-M. (2011) Fungi as a promising tool for bioremediation of soils contaminated with aromatic amines, a major class of pollutants. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**: 477–477.
- Simon, A., Dalmais, B., Morgant, G., and Viaud, M. (2013) Screening of a *Botrytis cinerea* one-hybrid library reveals a Cys2His2 transcription factor involved in the regulation of secondary metabolism gene clusters. *Fungal Genet. Biol.* **52**: 9–19.
- Simon, J.A. and Kingston, R.E. (2009) Mechanisms of Polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Smale, S.T. and Kadonaga, J.T. (2003) The RNA Polymerase II Core Promoter. *Annu. Rev. Biochem.* **72**: 449–479.
- Smith, K.M., Galazka, J.M., Phatale, P.A., Connolly, L.R., and Freitag, M. (2012) Centromeres of filamentous fungi. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* **20**: 635–656.
- Smith, K.M., Phatale, P.A., Sullivan, C.M., Pomraning, K.R., and Freitag, M. (2011) Heterochromatin Is Required for Normal Distribution of *Neurospora crassa* CenH3. *Mol. Cell. Biol.* **31**: 2528–2542.
- Son, S. w., Kim, H. y., Choi, G. j., Lim, H. k., Jang, K. s., Lee, S. o., *et al.* (2008) Bikaverin and fusaric acid from *Fusarium oxysporum* show antioomycete activity against *Phytophthora infestans*. *J. Appl. Microbiol.* **104**: 692–698.
- Song, Z., Baker, W., Marshall, J.W., Yakasai, A.A., Khalid, R.M., Collemare, J., *et al.* (2015) Heterologous expression of the avirulence gene ACE1 from the fungal rice pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Chem. Sci.* **6**: 4837–4845.
- Soukup, A.A., Chiang, Y.-M., Bok, J.W., Reyes-Dominguez, Y., Oakley, B.R., Wang, C.C.C., *et al.* (2012) Overexpression of the *Aspergillus nidulans* histone 4 acetyltransferase EsaA increases activation of secondary metabolite production: H4K12 acetylation indicates SM production potential. *Mol. Microbiol.* **86**: 314–330.
- Soyer, J.L., El Ghalid, M., Glaser, N., Ollivier, B., Linglin, J., Grandaubert, J., *et al.* (2014) Epigenetic Control of Effector Gene Expression in the Plant Pathogenic Fungus *Leptosphaeria maculans*. *PLoS Genet.* **10**: e1004227.

- Spanu, P.D. (2012) The Genomics of Obligate (and Nonobligate) Biotrophs. *Annu. Rev. Phytopathol.* **50**: 91–109.
- Spitz, F. and Furlong, E.E.M. (2012) Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nat. Rev. Genet.* **13**: 613–626.
- Staats, M. and van Kan, J.A.L. (2012) Genome Update of *Botrytis cinerea* Strains B05.10 and T4. *Eukaryot. Cell* **11**: 1413–1414.
- Stammers, D.K., Ren, J., Leslie, K., Nichols, C.E., Lamb, H.K., Cocklin, S., *et al.* (2001) The structure of the negative transcriptional regulator NmrA reveals a structural superfamily which includes the short-chain dehydrogenase/reductases. *EMBO J.* **20**: 6619–6626.
- Stassen, M.J., Bailey, D., Nelson, S., Chinwalla, V., and Harte, P.J. (1995) The *Drosophila trithorax* proteins contain a novel variant of the nuclear receptor type DNA binding domain and an ancient conserved motif found in other chromosomal proteins. *Mech. Dev.* **52**: 209–223.
- Steinbach, W.J., Cramer, R.A., Perfect, B.Z., Asfaw, Y.G., Sauer, T.C., Najvar, L.K., *et al.* (2006) Calcineurin Controls Growth, Morphology, and Pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* **5**: 1091–1103.
- Stergiopoulos, I., Collemare, J., Mehrabi, R., and De Wit, P.J.G.M. (2013) Phytotoxic secondary metabolites and peptides produced by plant pathogenic *Dothideomycete* fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**: 67–93.
- Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**: 41–45.
- Studt, L., Janevska, S., Niehaus, E.-M., Burkhardt, I., Arndt, B., Sieber, C.M.K., *et al.* (2016) Two separate key enzymes and two pathway-specific transcription factors are involved in fusaric acid biosynthesis in *Fusarium fujikuroi*. *Environ. Microbiol.* **18**: 936–956.
- Studt, L., Rösler, S.M., Burkhardt, I., Arndt, B., Freitag, M., Humpf, H.-U., *et al.* (2016) Knock-down of the methyltransferase Kmt6 relieves H3K27me3 and results in induction of cryptic and otherwise silent secondary metabolite gene clusters in *Fusarium fujikuroi*. *Environ. Microbiol.* n/a-n/a.
- Studt, L., Schmidt, F.J., Jahn, L., Sieber, C.M.K., Connolly, L.R., Niehaus, E.-M., *et al.* (2013) Two Histone Deacetylases, FfHda1 and FfHda2, Are Important for *Fusarium fujikuroi* Secondary Metabolism and Virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 7719–7734.
- Taddei, A. and Gasser, S.M. (2012) Structure and Function in the Budding Yeast Nucleus. *Genetics* **192**: 107–129.
- Talbert, P.B. and Henikoff, S. (2010) Histone variants — ancient wrap artists of the epigenome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**: 264–275.
- Talbot, N.J. (2003) On the Trail of a Cereal Killer: Exploring the Biology of *Magnaporthe grisea*. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**: 177–202.
- Tamaru, H. and Selker, E.U. (2001) A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* **414**: 277–283.
- Tamaru, H. and Selker, E.U. (2003) Synthesis of Signals for De Novo DNA Methylation in *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 2379–2394.
- Tanaka, A., Tapper, B.A., Popay, A., Parker, E.J., and Scott, B. (2005) A symbiosis expressed non-ribosomal peptide synthetase from a mutualistic fungal endophyte of perennial ryegrass confers protection to the symbiotum from insect herbivory. *Mol. Microbiol.* **57**: 1036–1050.
- Tanaka, A. and Tsuge, T. (2000) Structural and Functional Complexity of the Genomic Region Controlling AK-Toxin Biosynthesis and Pathogenicity in the Japanese Pear Pathotype of *Alternaria alternata*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **13**: 975–986.
- Tani, H., Koshino, H., Sakuno, E., and Nakajima, H. (2005) Botcinins A, B, C, and D, Metabolites Produced by *Botrytis cinerea*, and Their Antifungal Activity against *Magnaporthe grisea*, a Pathogen of Rice Blast Disease. *J. Nat. Prod.* **68**: 1768–1772.
- Tautenhahn, R., Patti, G.J., Rinehart, D., and Siuzdak, G. (2012) XCMS Online: A Web-Based Platform to Process Untargeted Metabolomic Data. *Anal. Chem.* **84**: 5035–5039.
- Taylor, J.W. and Berbee, M.L. (2006) Dating divergences in the Fungal Tree of Life: review and new analyses. *Mycologia* **98**: 838–849.
- Taylor, J.W., Spatafora, J., O'Donnell, K., Lutzoni, F., James, T., Hibbett, D.S., *et al.* (2004) The Fungi. In, *Assembling the Three of Life*.

- Temme, N., Oeser, B., Massaroli, M., Heller, J., Simon, A., González Collado, I., *et al.* (2012) BcAtf1, a global regulator, controls various differentiation processes and phytotoxin production in *Botrytis cinerea*: BcAtf1-a global regulator in *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* **13**: 704–718.
- Thomas, M.C. and Chiang, C.-M. (2006) The General Transcription Machinery and General Cofactors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**: 105–178.
- Todd, R.B., Andrianopoulos, A., Davis, M.A., and Hynes, M.J. (1998) FacB, the *Aspergillus nidulans* activator of acetate utilization genes, binds dissimilar DNA sequences. *EMBO J.* **17**: 2042–2054.
- Tschiersch, B., Hofmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G., and Reuter, G. (1994) The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene Su(var)3-9 combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO J.* **13**: 3822–3831.
- Tudzynski, B. (2014) Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. *Front. Microbiol.* **5**: 656.
- Tudzynski, P., Hölter, K., Correia, T., Arntz, C., Grammel, N., and Keller, U. (1999) Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. *Mol. Gen. Genet. MGG* **261**: 133–141.
- Tüncher, A., Reinke, H., Martic, G., Caruso, M.L., and Brakhage, A.A. (2004) A basic-region helix–loop–helix protein-encoding gene (*devR*) involved in the development of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **52**: 227–241.
- Turgeon, B.G. and Baker, S.E. (2007) Genetic and genomic dissection of the *Cochliobolus heterostrophus* Tox1 locus controlling biosynthesis of the polyketide virulence factor T-toxin. *Adv. Genet.* **57**: 219–261.
- Valette-Collet, O., Cimerman, A., Reignault, P., Levis, C., and Boccara, M. (2003) Disruption of *Botrytis cinerea* Pectin Methylesterase Gene Bcpme1 Reduces Virulence on Several Host Plants. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **16**: 360–367.
- Van der Vlugt-Bergmans, C.J.B., Wagemakers, C.A.M., and Van Kan, J.A.L. (1997) Cloning and expression of the cutinase A gene of *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **10**: 21–29.
- Vashee, S., Xu, H., Johnston, S.A., and Kodadek, T. (1993) How do “Zn²⁺ cys⁶” proteins distinguish between similar upstream activation sites? Comparison of the DNA-binding specificity of the GAL4 protein in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **268**: 24699–24706.
- Verdaasdonk, J.S. and Bloom, K. (2011) Centromeres: unique chromatin structures that drive chromosome segregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**: 320–332.
- Vey, A., Hoagland, R.E., and Butt, T.M. (2001) Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In, Butt, T.M., Jackson, C., and Magan, N. (eds), *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. CABI, Wallingford, pp. 311–346.
- Viaud, M., Schumacher, J., Porquier, A., and Simon, A. (2016) Regulation of Secondary Metabolism in the Gray Mold Fungus *Botrytis cinerea*. *Host-Pathog. Interact. Microb. Metab. Pathog. Antiinfectives* 201–216.
- Viaud, M.C., Balhadère, P.V., and Talbot, N.J. (2002) A *Magnaporthe grisea* Cyclophilin Acts as a Virulence Determinant during Plant Infection. *Plant Cell* **14**: 917–930.
- Vinale, F., Nigro, M., Sivasithamparam, K., Flematti, G., Ghisalberti, E.L., Ruocco, M., *et al.* (2013) Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol. Lett.* n/a–n/a.
- Waddington, C.H. (2012) The Epigenotype. *Int. J. Epidemiol.* **41**: 10–13.
- Wagner, D., Schmeinck, A., Mos, M., Morozov, I.Y., Caddick, M.X., and Tudzynski, B. (2010) The bZIP Transcription Factor MeaB Mediates Nitrogen Metabolite Repression at Specific Loci. *Eukaryot. Cell* **9**: 1588–1601.
- Walton, J.D. (1996) Host-selective toxins: agents of compatibility. *Plant Cell* **8**: 1723–1733.
- Wang, M., Weiberg, A., and Jin, H. (2015) Pathogen small RNAs: a new class of effectors for pathogen attacks: Pathogen small RNAs at attack. *Mol. Plant Pathol.* **16**: 219–223.
- Weber, T., Blin, K., Duddela, S., Krug, D., Kim, H.U., Brucoleri, R., *et al.* (2015) antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res.* gkv437.

- Weiberg, A., Wang, M., Bellinger, M., and Jin, H. (2014) Small RNAs: A New Paradigm in Plant-Microbe Interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **52**: 495–516.
- Weiberg, A., Wang, M., Lin, F.-M., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., *et al.* (2013) Fungal Small RNAs Suppress Plant Immunity by Hijacking Host RNA Interference Pathways. *Science* **342**: 118–123.
- Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J.L., Capy, P., Chalhoub, B., *et al.* (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat. Rev. Genet.* **8**: 973–982.
- Wiemann, P., Brown, D.W., Kleigrewe, K., Bok, J.W., Keller, N.P., Humpf, H.-U., and Tudzynski, B. (2010) FfVel1 and FfLae1, components of a velvet-like complex in *Fusarium fujikuroi*, affect differentiation, secondary metabolism and virulence. *Mol. Microbiol.* **77**: 972–994.
- Wiemann, P., Guo, C.-J., Palmer, J.M., Sekonyela, R., Wang, C.C.C., and Keller, N.P. (2013) Prototype of an intertwined secondary-metabolite supercluster. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**: 17065–17070.
- Wiemann, P., Willmann, A., Straeten, M., Kleigrewe, K., Beyer, M., Humpf, H.-U., and Tudzynski, B. (2009) Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation. *Mol. Microbiol.* **72**: 931–946.
- Wight, W.D., Kim, K.-H., Lawrence, C.B., and Walton, J.D. (2009) Biosynthesis and Role in Virulence of the Histone Deacetylase Inhibitor Depudecin from *Alternaria brassicicola*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **22**: 1258–1267.
- Williams, R.B., Henrikson, J.C., Hoover, A.R., Lee, A.E., and Cichewicz, R.H. (2008) Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. *Org. Biomol. Chem.* **6**: 1895.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., and Van Kan, J.A.L. (2007) *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol. Plant Pathol.* **8**: 561–580.
- Woloshuk, C.P., Foutz, K.R., Brewer, J.F., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., and Payne, G.A. (1994) Molecular characterization of aflR, a regulatory locus for aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2408–2414.
- Wong, K.H., Hynes, M.J., and Davis, M.A. (2008) Recent Advances in Nitrogen Regulation: a Comparison between *Saccharomyces cerevisiae* and Filamentous Fungi. *Eukaryot. Cell* **7**: 917–925.
- Wong, K.H., Hynes, M.J., Todd, R.B., and Davis, M.A. (2007) Transcriptional control of nmrA by the bZIP transcription factor MeaB reveals a new level of nitrogen regulation in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **66**: 534–551.
- Wu, D., Oide, S., Zhang, N., Choi, M.Y., and Turgeon, B.G. (2012) ChLae1 and ChVel1 Regulate T-toxin Production, Virulence, Oxidative Stress Response, and Development of the Maize Pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. *PLoS Pathog.* **8**: e1002542.
- Wyrick, J.J. and Young, R.A. (2002) Deciphering gene expression regulatory networks. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**: 130–136.
- Xiao, X., Fu, Y.-H., and Marzluf, G.A. (1995) The negative-acting NMR regulatory protein of *Neurospora crassa* binds to and inhibits the DNA-binding activity of the positive-acting nitrogen regulatory protein NIT2. *Biochemistry (Mosc.)* **34**: 8861–8868.
- Yamamoto, K. and Sonoda, M. (2003) Self-interaction of heterochromatin protein 1 is required for direct binding to histone methyltransferase, SUV39H1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**: 287–292.
- Yang, L., Takuno, S., Waters, E.R., and Gaut, B.S. (2011) Lowly Expressed Genes in Arabidopsis thaliana Bear the Signature of Possible Pseudogenization by Promoter Degradation. *Mol. Biol. Evol.* **28**: 1193–1203.
- Young, C.A., Felitti, S., Shields, K., Spangenberg, G., Johnson, R.D., Bryan, G.T., *et al.* (2006) A complex gene cluster for indole-diterpene biosynthesis in the grass endophyte *Neotyphodium lolii*. *Fungal Genet. Biol.* **43**: 679–693.
- Zhang, X., Liu, X., Zhao, Y., Cheng, J., Xie, J., Fu, Y., *et al.* (2016) Histone H3 Lysine 9 Methyltransferase DIM5 Is Required for the Development and Virulence of *Botrytis cinerea*. *Front. Microbiol.* **7**.
- Zhang, Z., Henderson, C., Perfect, E., Carver, T.L.W., Thomas, B.J., Skamnioti, P., and Gurr, S.J. (2005) Of genes and genomes, needles and haystacks: Blumeria graminis and functionality. *Mol. Plant Pathol.* **6**: 561–575.

Zhang, Z.D., Frankish, A., Hunt, T., Harrow, J., and Gerstein, M. (2010) Identification and analysis of unitary pseudogenes: historic and contemporary gene losses in humans and other primates. *Genome Biol.* **11**: R26.

Annexes

Tableau Annexe 1. Liste des amorces utilisées pour les différentes études.

Nom	Séquence	Utilisation
AC-HphF-verif2	GTCCGAGGGCAAAGGAATAG	vérifications diverses
Ac-PKS6qF	CAGCAATCGTTGTCCTGAAATC	qPCR <i>Bcboa6</i>
Ac-PKS6qR	GTTTATCGCGTTCTTCACCTGTTA	qPCR <i>Bcboa6</i>
AP100_pboa13 5 F	TACCGCGGCCGCACTATACACATCAGGAAT	clonage pBcboa13 T5
AP101_pboa13 5 R	TAGACCTAGGGGAAAATATTACTATCCG	clonage pBcboa13 T5
AP103_ppks7 1 F	TACCGCGCCGCTCGCCTCATAGATACATA	clonage pBcpcs7 T1
AP104_ppks7 1 R	TAGACCTAGGCCAAAGTTATGGTGTGCC	clonage pBcpcs7 T1
AP105.1_ppks7 2 F	TACCGCGGCCGCCACCTGCGCTGAATATCA	clonage pBcpcs7 T2
AP105.2_ppks7 2 R	TAGACCTAGGGTAAAAATGAAAAGGTA	clonage pBcpcs7 T2
AP106_ppks7 3 F	TACCGCGCCGCTCTTTCTGTTACTATATGC	clonage pBcpcs7 T3
AP107_ppks7 3 R	TAGACCTAGGCACAGTTATCCCTTATCT	clonage pBcpcs7 T3
AP108_ppks7 4 F	TACCGCGCCGCCAATTCAAATTCAGGTTT	clonage pBcpcs7 T4
AP109_ppks7 4 R	TAGACCTAGGATCCATTCTAGTATCTAT	clonage pBcpcs7 T4
AP11.2	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGCTGACAGATTCCAAACCACAGG	Génération / vérification délétion <i>Bchp1</i>
AP110_ppks7 5 F	TACCGCGCCGCATTCATCCAGATAGATT	clonage pBcpcs7 T5
AP111_ppks7 5 R	TAGACCTAGGTAAAGCAATATGTAGCAT	clonage pBcpcs7 T5
AP12.2	CTCCTTCAATATCATCTTCTGTCTCCGACTGTTGCGACTGAGCTTTAAATATG	Génération / vérification délétion <i>Bchp1</i>
AP121_verif insertion 5' boa1	GCACGGGCATTGTTTTG	Génération / vérification délétion <i>Bcboa1</i>
AP122_5'F boa15	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGAACTCTTTGGATTGCTTTACACC	Génération / vérification délétion <i>Bcboa15</i>
AP123_5'R boa15	GAGCATGCCCTGCCCTGAGCCCCTCCCGCCATTTAGAT	Génération / vérification délétion <i>Bcboa15</i>
AP124_3'F boa15	AATGCTCCTTCAATATCACTCATGCGTAAGGAGTCAGC	Génération / vérification délétion <i>Bcboa15</i>
AP125_3'R boa15	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTTTAAATTC AAGGCCGATGGTG	Génération / vérification délétion <i>Bcboa15</i>
AP127_verif 3'	GATATAGGTCTTCCCCGAGTTCC	Génération / vérification délétion <i>Bcboa15</i>
AP128_boa15 Stop	TCATCCACGCTGTGCTCTTCC	Génération / vérification délétion <i>Bcboa15</i>
AP129_boa15 Start	ATGCAGGCCTTCTATCTTGACTC	Génération / vérification délétion <i>Bcboa15</i>
AP13	ATCCACTTAACGTTACTGAAATCTCCAACCTTTTTCTTTGATTGGCACCTAA	Génération / vérification délétion <i>Bchp1</i>
AP132_pbot6 1F	TACCGCGCCGCTTACGCCCCACTACAGAG	clonage pBcbot6 T1
AP133_pbot6 1R	TAGAACTAGTTACCTGGCCGATTTTGAA	clonage pBcbot6 T1
AP134_pbot6 2F	TACCGCGCCGCGGGTTCAACAAAATATTA	clonage pBcbot6 T2

AP62	GATGCAGCCGGGTGATATAAG	qPCR <i>Bcboa13</i>
AP63	TGCAACCCCTCTTCGATACC	qPCR <i>Bcboa13</i>
AP64	CTAAGCTCCGGATCCGTGTATC	qPCR <i>Bcboa1</i>
AP65	TTGAGGCCATCTTCTACCGTAAG	qPCR <i>Bcboa1</i>
AP66	CGATGGTGAAGCAATCAAA	qPCR <i>Bcboa12</i>
AP67	GCAAATTATCCACCAGCTTGGT	qPCR <i>Bcboa12</i>
AP68	GTGGACTCGAAGGGTCACAAG	qPCR <i>Bcboa16</i>
AP69	GCTAGATTGGCGGCACGTA	qPCR <i>Bcboa16</i>
AP70	AGGTGTCTATCCCGAGCAAGATT	qPCR <i>Bcboa17</i>
AP71	GAAGGCGTAAAGGAGGCTCTTT	qPCR <i>Bcboa17</i>
AP72	ACACCATTATGAAGGCAAAGG	qPCR Bcin01g00170
AP73	TTCGATTAATGCGGGAGTATCA	qPCR Bcin01g00170
AP74	TTGCGCATCGATTGGATACA	qPCR Bcin01g00180
AP75	CACTCTCTACCACCTCTCCATTCC	qPCR Bcin01g00180
AP76	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGGGTGCGGTCTGGCTTGAA	Génération / vérification délétion <i>Bcdim-5</i>
AP77	AATGCTCCTTCAATATCACTCTGAGAGGGATGAGTTAGTGGTTG	Génération / vérification délétion <i>Bcdim-5</i>
AP78	GAGCATGCCCTGCCCTGAGTTATGGGCATAAACGATTA	Génération / vérification délétion <i>Bcdim-5</i>
AP79	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTCTTTAAAGGCTTGAAGTGT	Génération / vérification délétion <i>Bcdim-5</i>
AP80	TAGAACTAGTTGGCAGGAACCATGAGCT	clonage pBcboa9 T4
AP81	TAGAACTAGTGAGGAAACAAAGCAACTG	clonage pBcboa9 T5
AP82	TGGCCATGGTGGTCAGAGTGGCAGTCG	Génération / vérification délétion <i>Bcboa1</i>
AP83	AACGGATCCCTAGCTAGAGGAAGCACT	Génération / vérification délétion <i>Bcboa1</i>
AP83bis_5f queue	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGAACCCGATCTCAATCTTATCATA	Génération / vérification délétion <i>Bckmt6</i>
AP84_5r queue	ATCCACTTAACGTTACTGAAATCTCCAACCTCGAATGCGATTTGCTTCAAA	Génération / vérification délétion <i>Bckmt6</i>
AP85_3f queue	CTCCTTCAATATCATCTTCTGTCTCCGACAGGAGGAAGCAAGAATTTGTATT	Génération / vérification délétion <i>Bckmt6</i>
AP86_3r queue	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCGTTATTAGATGATCGAATGTTAT	Génération / vérification délétion <i>Bckmt6</i>
AP88_verif 3'	AAGGCGCAGGACATTTACCA	Génération / vérification délétion <i>Bckmt6</i>
AP89_verif pureté	ACCGCAGAGCCGTCATAAGA	Génération / vérification délétion <i>Bckmt6</i>
AP9	ACAATTTCAAAATGCAACATCAAC	Génération / vérification délétion <i>Bcdim-5</i>
AP92_pboa13 1 F	TACCGCGCCGCATGGCATTCTAGTGTGAA	clonage pBcboa13 T1
AP93_pboa13 1 R	TAGACCTAGGCGCAACTCAATTCATTTA	clonage pBcboa13 T1
AP94_pboa13 2 F	TACCGCGCCGCACTGTGTCTACAAGTGG	clonage pBcboa13 T2

AP95_pboa13 2 R	TAGACCTAGGGGCATTAATAATGAGCAT	clonage pBcboa13 T2
AP96_pboa13 3 F	TACCGCGGCCGCACCTTATTGTTTGAATC	clonage pBcboa13 T3
AP97_pboa13 3 R	TAGACCTAGGTTCAATCATACCTGTCAA	clonage pBcboa13 T3
AP98_pboa13 4 F	TACCGCGGCCGCTAACCCCTAAATTCTGGGG	clonage pBcboa13 T4
AP99_pboa13 4 R	TAGACCTAGGGAATCGTAGATCTCACCG	clonage pBcboa13 T4
APq1	CTTGATGCTGTTGGTATGATGACA	qPCR <i>Bcpts7</i>
APq2	CCTCGATAGCCTCTTCTAATACGT	qPCR <i>Bcpts7</i>
AS889	TGGACATGTTGTCACCACCACAAAAC	clonage DBD BcBoa13 / BcBoa13
AS890	TTCGGATCCTGACGTCCGCGTTTGCCA	clonage DBD BcBoa13
Bc-Act1_Fwd	CCGTGCTCCAGAAGCTTTGT	qPCR <i>BcactA</i>
Bc-Act1_Rev	GTGGATACCACCGCTCTCAAG	qPCR <i>BcactA</i>
BD17	TTACTGTTGAATGATGTTTTGTCTT	qPCR <i>Bcbot2</i>
BD5	CAGGTTATCCCTTTCATGAGTAGT	qPCR <i>Bcbot2</i>
hphF	GTCGGAGACAGAAGATGATATTGAAGGAGC	amplification cassette <i>PtrpC::hph</i>
hphR	GTTGGAGATTTCAAGCTTAAGTGGAT	amplification cassette <i>PtrpC::hph</i>
HS-3F-bcboa13	CTCCTTCAATATCATCTTCTGTCTCCGACCTGTCTTCGCGTATCAATCC	Génération / vérification délétion <i>Bcboa13</i>
HS-3R-bcboa13	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCCACGACTTACCATCACTGGA	Génération / vérification délétion <i>Bcboa13</i>
HS-5F-bcboa13	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGGAGACTCCGACATGCATGTA	Génération / vérification délétion <i>Bcboa13</i>
HS-5R-bcboa13	ATCCACTTAACGTTACTGAAATCTCCAACCTTGATAATCGGTCTTCGG	Génération / vérification délétion <i>Bcboa13</i>
HS-boa13 comp F	GCCCCAAAAATGCTCCTTCAATATCGGAGACTCCGACATGCATGTA	Génération / vérification délétion $^{\circ}\Delta Bcboa13$
HS-boa13 comp R	CATACATCTTATCTACATACGGCGAAGACAGATATGACTAG	Génération / vérification délétion $^{\circ}\Delta Bcboa13$
HS-motif1boa9F	GCCCCAAAAATGCTCCTTCAATATCAGAGACGATGCTCCCCACA	amplification pBcboa9 C système rapporteur
HS-motif2boa9F	GCCCCAAAAATGCTCCTTCAATATCAAAGCTGCCCGTGCTCTCGA	amplification pBcboa9 B système rapporteur
HS-promboa13verifF	CCGCTCGTTTTAAGATTGGG	Génération / vérification délétion <i>Bcboa13</i>
hygrodebutR	CCGAGGGCAAAGGAATAGAG	vérifications diverses
hygrofinU	TCCACTAGCTCCAGCCAAGC	vérifications diverses
K7 Nat1-Rev	TGCAGGCCGCTCAGGGGCAGGG	amplification sonde nouséothricine
Nat1R-verif2	AGGACCGCAAGCTAGAATGA	Génération / vérification délétion <i>Bcboa1</i>
Nourseo-ATG	ATCCATATGACCACTTTGACGACAC	amplification sonde nouséothricine
pb_pks7_3f	CTCCTTCAATATCATCTTCTGTCTCCGACTTTTTGCCTATGCCACCACT	Génération / vérification délétion <i>Bcpts7</i>
pb_pks7_3r	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTCCGGTATTTGTCCTTGCTC	Génération / vérification délétion <i>Bcpts7</i>
pb_pks7_5f	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGCCGGGTTGAGTTCTAGTGA	Génération / vérification délétion <i>Bcpts7</i>

pb_pks7_5r	ATCCACTTAACGTTACTGAAATCTCCAACGAACGGGCAAGTTTATTGGA	Génération / vérification délétion <i>Bcps7</i>
pb_puretéps7_f	TTGATAGGCTGCGCAAAAAT	Génération / vérification délétion <i>Bcps7</i>
pb_puretéps7_r	GATAATCCATGGGGCATCTG	Génération / vérification délétion <i>Bcps7</i>
pBcboa6 F	GCCCCAAAAATGCTCCTTCAATATCGACTGAGATTGCAAAACGAG	clonage pBcboa6 T1
pBcboa6 R	CTTACCTCACCCCTTGAAACCATGATGCAACGATTAACACAACGC	clonage pBcboa6 T1
PoliCR	TTGGATCGATTGTGATGTGATGG	Génération / vérification délétion <i>OE:Bcps7</i>
primer forward promoteur bcboa9	GCCCCAAAAATGCTCCTTCAATATCATAGACACAATTAACACCAGG	amplification pBcboa9 A système rapporteur
primer reverse promoteur bcboa9	CTTACCTCACCCCTTGAAACCATGGTTATGATAATTGCAATAG	amplification pBcboa9 système rapporteur

Bilan d'activités

1.1. Liste des publications

Porquier, A., Morgant, G., Moraga, J., Dalmais, B., Luyten, I., Simon, A., et al. (2016) The botrydial biosynthetic gene cluster of *Botrytis cinerea* displays a bipartite genomic structure and is positively regulated by the putative Zn(II)2Cys6 transcription factor BcBot6. *Fungal Genet. Biol.* 96: 33–46.

Viaud, M., Schumacher, J., **Porquier, A.**, and Simon, A. (2016) Regulation of Secondary Metabolism in the Gray Mold Fungus *Botrytis cinerea*. *Host-Pathog. Interact. Microb. Metab. Pathog. Antiinfectives* 201–216.

Schumacher, J., Simon, A., Cohrs, K.C., Traeger, S., **Porquier, A.**, Dalmais, B., et al. (2015) The VELVET Complex in the Gray Mold Fungus *Botrytis cinerea*: Impact of BcLAE1 on Differentiation, Secondary Metabolism, and Virulence. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 28: 659–674.

1.2. Communications orales en congrès

- **10^{èmes} journée Jean Chevaugnon** (Société Française de Phytopathologie), du 27 au 31 janvier 2014 à Aussois, « BOA13, un facteur de transcription qui régule la synthèse d'acide botcinique et d'autres fonctions impliquées dans la nécrotrophie », A. Porquier, B. Dalmais, H. Sghyer, A. Simon, G. Morgant, P. Le Pecheur, M. Viaud.

- **Congrès des doctorants SPE**, du 3 au 5 juin 2014 à Bordeaux, « Métabolisme secondaire et nécrotrophie chez *Botrytis cinerea* : rôle du facteur de transcription Boa13 », A. Porquier, B. Dalmais, H. Sghyer, A. Simon, G. Morgant, P. Le Pecheur, M. Viaud.

- **ECFG13** (13th European Conference of Fungal Genetics), du 3 au 6 avril 2016 à Paris, “Specific regulation of Botrydial and Botcinic acid gene clusters in *Botrytis cinerea*.”, A. Porquier, G. Morgant, B. Dalmais, A. Simon, M. Viaud.

- **11^{èmes} journée Jean Chevaugnon** (Société Française de Phytopathologie), du 25 au 29 janvier 2016 à Aussois, « Régulation spécifique des clusters botrydial et acide botcinique chez *Botrytis cinerea* », A. Porquier, B. Dalmais, A. Simon, G. Morgant, M. Viaud.

1.3. Communications orales additionnelles

- **Comité de thèse n°1**, le 23 juin 2014 à Thiverval-Grignon, avec I. Fudal, S. Mann, T. Guillemette et M. Viaud

- **Colloque Epiagro 2015**, les 19 et 20 mai 2015 à Rennes, « Métabolisme secondaire et nécrotrophie chez *Botrytis cinerea* : Régulation par des mécanismes épigénétiques? ».

- **Comité de thèse n°2**, le 7 septembre 2015 à Thiverval-Grignon, avec I. Fudal, S. Mann, T. Guillemette et M. Viaud

- **Séminaire de l'unité BIOGER**, le 2 octobre 2015 à Thiverval-Grignon, « Régulation du métabolisme secondaire chez *Botrytis cinerea* »

- **Axe transversal processus infectieux (BIOGER)**, le 5 novembre 2015 à Thiverval-Grignon, « Recherche de FTs impliqués dans la régulation du MS chez *Botrytis cinerea* par une approche simple hybride »
- **Collaboration avec l'équipe de Paul Tudzynski de l'Université de Münster** (Allemagne), le 9 août 2016 à Münster, « Regulation of secondary metabolism in the polyphagous fungus *Botrytis cinerea* »

1.4. Enseignement

- **Cours pour les M2 du parcours Mycologie de l'Université Paris Descartes**, le 25 septembre 2014 à Thiverval-Grignon, « Métabolisme secondaire et nécrotrophie chez *Botrytis cinerea* : rôle du facteur de transcription BOA13 »
- **Cours pour les M2 du parcours Sciences Du Végétal de l'Université Paris Sud**, le 7 novembre 2014 à Thiverval-Grignon, « Métabolisme secondaire et nécrotrophie chez *Botrytis cinerea* »
- **Cours pour les M2 du parcours Mycologie de l'Université Paris Descartes**, le 6 octobre 2015 à Thiverval-Grignon, « Rôle du métabolisme secondaire dans la pathogénie : exemple de *Botrytis cinerea* »
- **Cours pour les M2 du parcours Sciences Du Végétal de l'Université Paris Sud**, le 10 novembre 2015 à Thiverval-Grignon, « Régulation du métabolisme secondaire chez *Botrytis cinerea* »

1.5. Présentation de posters

- **EPSR6** (6th European Plant Science Retreat), congrès de doctorants Européens, du 1^{er} au 4 juillet 2014 à Amsterdam (Pays-Bas), « Secondary metabolism and necrotrophy in *Botrytis cinerea* : role of the BOA13 transcription factor” (*poster 1*)
- **28th Fungal Genetics Conference**, du 17 au 22 mars 2015 à Asilomar (Etats-Unis), “Secondary metabolism and necrotrophy in *Botrytis cinerea* : Role of the BOA13 transcription factor”. (*poster 2*)

1.6. Formations

1.6.1. Congrès

- **10^{èmes} journée Jean Chevaugnon** (Société Française de Phytopathologie), du 27 au 31 janvier 2014 à Aussois
- **Congrès des doctorants SPE**, du 3 au 5 juin 2014 à Bordeaux
- **EPSR6** (6th European Plant Science Retreat), congrès de doctorants Européens, du 1^{er} au 4 juillet 2014 à Amsterdam (Pays-Bas)
- **28th Fungal Genetics Conference**, du 17 au 22 mars 2015 à Asilomar (Etats-Unis)
- **11^{èmes} journée Jean Chevaugnon** (Société Française de Phytopathologie), du 25 au 29 janvier 2016 à Aussois
- **ECFG13** (13th European Conference of Fungal Genetics), du 3 au 6 avril 2016 à Paris

1.6.2. Autres formations

- Formation analyse de données : génomes & transcriptomes (CATI BBRIC), les 24 et 25 avril 2014
- Traiter la littérature scientifique : lecture efficace et prise de notes, du 16 au 19 mai 2014
- Les principes de réalisation d'un diaporama pédagogique, 20 juin 2014
- Rédiger sa thèse : du chaos des idées au texte structuré, du 22 au 24 octobre 2014
- Writing a scientific paper, du 18 au 22 juin 2015

Article annexe

The VELVET Complex in the Gray Mold Fungus *Botrytis cinerea*: Impact of BcLAE1 on Differentiation, Secondary Metabolism, and Virulence.

Schumacher, J., Simon, A., Cohrs, K.C., Traeger, S., **Porquier, A.**, Dalmais, B., Viaud M. et Tudzynski B.

The VELVET Complex in the Gray Mold Fungus *Botrytis cinerea*: Impact of BcLAE1 on Differentiation, Secondary Metabolism, and Virulence

Julia Schumacher,¹ Adeline Simon,² Kim C. Cohrs,¹ Stefanie Traeger,¹ Antoine Porquier,^{2,3} Bérengère Dalmais,² Muriel Viaud,² and Bettina Tudzynski¹

¹IBBP, WWU Münster, Schlossplatz 8, 48143 Münster, Germany; ²BIOGER, INRA, Avenue Lucien Brétignières, 78850 Grignon, France; ³Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France

Submitted 24 December 2014. Accepted 21 January 2015.

Botrytis cinerea, the gray mold fungus, is an important plant pathogen. Field populations are characterized by variability with regard to morphology, the mode of reproduction (conidiation or sclerotia formation), the spectrum of secondary metabolites (SM), and virulence. Natural variation in *bcvel1* encoding the ortholog of *Aspergillus nidulans* VeA, a member of the VELVET complex, was previously shown to affect light-dependent differentiation, the formation of oxalic acid (OA), and virulence. To gain broader insight into the *B. cinerea* VELVET complex, an ortholog of *A. nidulans* LaeA, BcLAE1, a putative interaction partner of BcVEL1, was studied. BcVEL1 but not its truncated versions interacts with BcLAE1 and BcVEL2 (VelB ortholog). In accordance with the expected common as well as specific functions of BcVEL1 and BcLAE1, the deletions of both genes result in similar though not identical phenotypes. Both mutants lost the ability to produce OA, to colonize the host tissue, and to form sclerotia. However, mutants differ with regard to aerial hyphae and conidia formation. Genome-wide expression analyses revealed that BcVEL1 and BcLAE1 have common and distinct target genes. Some of the genes that are underexpressed in both mutants, e.g., those encoding SM-related enzymes, proteases, and carbohydrate-active enzymes, may account for their reduced virulence.

Secondary metabolites (SM) are small molecules that, unlike primary metabolites, are not directly required for growth of the producing organism. Fungal SM biosynthetic genes are typically located adjacent to each other and exhibit similar patterns of expression (coregulation). These clusters usually include a gene encoding the key enzyme (KE) responsible for synthesis of the raw product and genes encoding enzymes for further modifications and for the export of the compound. The regulation of SM gene clusters occurs at several levels, i.e., by pathway-specific transcription factors (TF) that are usually encoded by a cluster gene, by broad domain TF that integrate

environmental signals, and by global regulators that affect gene expression via chromatin remodeling (Brakhage 2013; Hoffmeister and Keller 2007; Wiemann and Keller 2014).

LaeA (loss of aflR expression), a putative methyltransferase, was first identified in *Aspergillus nidulans* as a regulator of SM gene clusters (Bok and Keller 2004; Bok et al. 2005). Later, LaeA was shown to form a protein (VELVET) complex with the fungal regulatory proteins VeA and VelB that coordinates development and secondary metabolism in response to light (Bayram et al. 2008). In the meantime, VeA and LaeA orthologs in other species, including *Penicillium chrysogenum* (Hoff et al. 2010), *Fusarium fujikuroi* (Wiemann et al. 2010), and *Cochliobolus heterostrophus* (Wu et al. 2012), have been characterized, demonstrating that their general functions are conserved among ascomycetes (Bayram and Braus 2012).

Botrytis cinerea is the causal agent of gray mold diseases in numerous dicotyledonous plant species including high-value crops such as grapevine, strawberry, raspberry, and ornamental flowers. Wide ranges of symptoms are provoked by *B. cinerea*, from brown spots to full-scale soft rotting, the latter accompanied by the appearance of gray masses of conidia (van Kan 2006; Williamson et al. 2007). SM may be connected to the life cycle of *B. cinerea* in different ways. They may contribute to virulence by killing plant cells, allowing for subsequent colonization of the dead tissue by the fungus, they may help to compete with other organisms, and they may protect the reproductive structures, i.e., conidia, sclerotia, and apothecia from abiotic and biotic stresses such as UV light and mycoparasitism.

The genome of *B. cinerea* comprises 44 genes encoding SM KE including 21 polyketide synthases (PKS), nine non-ribosomal peptide synthetases (NRPS), six sesquiterpene cyclases, one chalcone synthase, two dimethylallyl tryptophan synthases (DMATS), and five diterpene cyclases (Amselem et al. 2011). To date, only a small number of SM have been identified and linked to specific gene clusters in the genome of *B. cinerea*. i) Botrydial (BOT) is a sesquiterpenoid (Collado et al. 2007) that triggers plant cell death via induction of the hypersensitive response (Rossi et al. 2011). Its biosynthesis relies on a cluster of five coregulated genes, including the KE-encoding gene *bcbot2/bcstc1* (Pinedo et al. 2008; Siewers et al. 2005). ii) Botcinic acid (BOA) and its derivatives (botcinins) are combined phytotoxic polyketides (Tani et al. 2005, 2006) whose biosynthesis depends on two PKS, BcBOA6 and BcBOA9, which belong to two clusters of coregulated genes (Dalmais et al. 2011; Massaroli et al. 2013). iii) Abscisic acid (ABA) is a plant hormone and belongs to the group of

Current address for S. Traeger: RUB, Universitätsstr. 150, 44801 Bochum, Germany

Corresponding authors: J. Schumacher; E-mail: julia.schumacher@wwu.de; M. Viaud; E-mail: viaud@versailles.inra.fr

*The e-Xtra logo stands for “electronic extra” and indicates that two supplementary figures and two supplementary tables are published online.

sesquiterpenoids (Ortani and Kiyota 2003). While, in higher plants, ABA biosynthesis is mediated via the carotenoid pathway, *B. cinerea* synthesizes ABA directly from farnesyl diphosphate via different oxidative steps. A cluster of four involved genes was described (Siewers et al. 2004, 2006). iv) Oxalic acid (OA) is a compound that is produced via the oxaloacetate acetylhydrolase in *B. cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. Loss of OA formation results in avirulent mutants in *S. sclerotiorum* (Godoy et al. 1990; Liang et al. 2014), but *bcoahA* mutants are still able to colonize the host tissue (Han et al. 2007; Stefanato et al. 2008). v) Bikaverin (BIK) is a red polyketide pigment found in some *Fusarium* species, e.g., *F. fujikuroi*, in which the BIK biosynthesis and the involved genes have been intensively investigated (Wiemann et al. 2009). Recent studies revealed that an ancestor of *B. cinerea* acquired the gene cluster via horizontal gene transfer from *Fusarium* spp. (Campbell et al. 2012; Schumacher et al. 2013). vi) 1,8-Dihydroxynaphthalene (DHN)-melanin is a polyketide derivative accumulating in the conidiophores, conidia, and sclerotia of *B. cinerea*, giving them their characteristic dark color (Doss et al. 2003; Zeun and Buchenauer 1985). In contrast to other DHN-melanin forming fungi, *B. cinerea* possesses two highly similar KE-encoding genes (*bcpks12*, *bcpks13*), while single copies are present for the other melanogenic genes (Kroken et al. 2003; Schumacher et al. 2014). vii) Carotenoids (CAR) are tetraterpenoids that are produced by plants and fungi to protect cells from free radicals and singlet oxygen (Gao and Garcia-Pichel 2011). A cluster of four light-induced genes was recently identified in *B. cinerea* that shares similarity with the studied CAR gene cluster in *F. fujikuroi* (Schumacher et al. 2014).

Importantly, the property to produce the mentioned SM varies among *B. cinerea* wild-type strains. ABA and BIK are only formed by a few strains (Schumacher et al. 2013; Siewers et al. 2004), and not all wild-type strains produce OA, BOT, and BOA (Reino et al. 2004; Schumacher et al. 2012). As with the production of SM, the ability to differentiate the reproductive structures (conidia, sclerotia) also varies among *B. cinerea* wild-type strains. In the majority of strains, the mode of (asexual) reproduction is determined by light conditions; conidia are formed in the light, sclerotia in the dark (Williamson et al. 2007). However, in a number of strains, the light-dependent regulation of differentiation is abolished; they produce either conidia, sclerotia, or sterile hyphae in any light condition (Canessa et al. 2013; Paul 1929; Stewart and Long 1987). Recently, single nucleotide polymorphisms (SNP) resulting in truncated BcVEL1 (VeA) proteins of 184 amino acids (aa) and 100 aa, compared with the 575-aa protein found in the light-responsive wild-type strain B05.10, were identified by map-based cloning approaches as the genetic basis for persistent conidiation, loss of sclerotia formation, reduced virulence, and loss of OA formation of wild-type strains T4 and 1750 (Schumacher et al. 2012, 2013). The characterization of *bcvell1* deletion mutants in the B05.10 background, furthermore, revealed the impact of BcVEL1 on DHN-melanin formation, the response to oxidative stress, nitrate assimilation, and the regulation of genes encoding proteases, transporters, and glycoside hydrolases (Schumacher et al. 2012). Similar phenotypes regarding conidiation, melanin biosynthesis, hypersensitivity to oxidative stress, and virulence have been reported for *bcvell1* and *bcvell2* (VeIB ortholog) mutants in the strain 38B1 (Yang et al. 2013). However, this study is based on incorrect gene models of both VELVET proteins (VeA, 294 instead of 575 aa; VeIB, 345 instead of 451 aa).

In this work, we studied the functions of BcLAE1, another putative member of the VELVET complex, in regulation of differentiation, virulence, and SM formation. We demonstrate that full-length BcVEL1, indeed, interacts with

BcLAE1 and BcVEL2, forming a VELVET-like complex. Our data demonstrate that BcLAE1 is dispensable for growth under standard conditions but is required for OA formation, for tolerance of oxidative stress, and for full virulence on French bean, as shown previously for BcVEL1. Both gene deletions decoupled the differentiation programs from light control; however, the deletion of *bclae1* caused a milder phenotype. Genome-wide expression analyses revealed sets of common and unique target genes of BcVEL1 and BcLAE1 that are enriched for genes encoding SM-related enzymes, (secreted) carbohydrate-active enzymes, and proteases. In sum, this study demonstrates that both proteins are global regulators of differentiation and secondary metabolism in the gray mold fungus and highlights the role of the *B. cinerea* VELVET complex in virulence, possibly due to the regulation of a wide range of enzymes involved in SM and plant cell degradation.

RESULTS

Identification of the LaeA ortholog in *B. cinerea*.

Several candidates were identified in the *B. cinerea* B05.10 genome database (Broad Institute) by BlastP analyses using the sequence of *A. nidulans* LaeA (GenBank accession number AAQ95166; Bok and Keller 2004) as query. Best hits were the annotated proteins BC1G_15168 and BC1G_15169 from the first sequencing approach by Syngenta (Amselem et al. 2011) and B0510_1382 from the resequencing approach by Staats and van Kan (2012), which cover the same genomic locus. As both automatic gene predictions were incorrect (Supplementary Fig. S1), the annotation was revised by cDNA sequencing (GenBank accession number KP099423). Based on this sequence, the open reading frame (ORF) of *bclae1* comprises 1,572 bp and is interrupted by six introns of 181, 65, 73, 57, 64, and 148 bp and encodes a protein of 327 aa. Phylogenetic analysis indicated that BcLAE1 more closely relates with the ortholog of the dothideomycete *C. heterostrophus* (54% identity, 65% positives) than with orthologs from the eurotiomycetes, e.g., *A. nidulans* (42% identity, 61% positives), and the sordariomycetes, e.g., *Trichoderma reesei* (40% identity, 59% positives) (National Center for Biotechnology Information [NCBI] BlastP Align). The methyltransferase domain including the conserved binding sites for S-adenosylmethionine comprises the amino acids 85 to 177 of BcLAE1.

BcLAE1, BcVEL1, and BcVEL2 form a complex in some but not all *B. cinerea* strains.

In *A. nidulans*, LaeA forms a stable complex with the VELVET proteins VeA and VeIB in the nucleus, whereby VeA functions as a bridging factor by interacting with VeIB (via the N-terminal region) and LaeA (via the C-terminal region) (Bayram et al. 2008). To ascertain analogous protein-protein interactions of the *B. cinerea* orthologs (BcLAE1 [327 aa], BcVEL1 [575 aa], and BcVEL2 [451 aa]), a direct yeast two-hybrid approach was performed. The full-length proteins were fused to the GAL4 binding and activation domains, and yeast cells expressing the different protein combinations were inspected for *HIS3* and *LacZ* reporter gene activities. The assays indicated that BcVEL1 interacts with BcLAE1 as well as with BcVEL2 (Fig. 1A). To consider the natural mutations of *bcvell1* in *B. cinerea* wild-type strains generating at least two further alleles, *bcvell1*^{T4} and *bcvell1*¹⁷⁵⁰, the respective proteins of 184 and 100 aa were included in the yeast two-hybrid assay. The truncated proteins failed to interact with both BcLAE1 and BcVEL2, suggesting that no trimeric complex is formed in wild-type strains expressing these alleles. The fact that the

corresponding C-termini of BcVEL1 (186 to 575 aa, 102 to 575 aa) still interact with BcLAE1 but not with BcVEL2 could imply that the N-terminal VELVET domain (23 to 220 aa) that is disrupted in all truncated BcVEL1 versions is essential for interaction with BcVEL2 but dispensable for interaction with BcLAE1. In sum, our data suggest that a heterotrimeric VELVET complex exists in *B. cinerea* strains that express a full-length BcVEL1, such as the commonly used wild-type strain B05.10.

Subcellular localizations of BcVEL1 and BcLAE1 are not interdependent.

Previously, it was demonstrated that the full-length BcVEL1 fused to green fluorescent protein (GFP) is predominantly localized in the nuclei, while the BcVEL1^{T4}-GFP fusion protein is predominantly localized to the cytosol (Schumacher et al. 2012). To determine the distribution of BcVEL2 and BcLAE1, the other components of the proposed complex, corresponding GFP fusion proteins under the control of the constitutive *oliC* promoter of *A. nidulans* were expressed in different genetic backgrounds (discussed below) (Table 1). The subcellular localization of the three GFP fusion proteins indicated that BcVEL1^{B05.10} and BcLAE1 predominantly and independently accumulate in the nuclei, while BcVEL2 is present in the cytosol and the nuclei (Fig. 1B). Based on these observations, it appears likely that the three proteins interact in the nuclei of *B. cinerea* B05.10.

BcLAE1 is dispensable under standard growth conditions.

To gain further insight into the signaling processes and downstream events of the VELVET complex in *B. cinerea*, deletion and overexpression mutants were functionally characterized. The generation of respective mutants for *bcvell1* has been reported previously (Schumacher et al. 2012) (Table 1). The approach to replace *bclae1* by a nourseothricin resistance cassette yielded two independent deletion mutants ($\Delta bclae1$ -T3, $\Delta bclae1$ -T5). Complementation of the deletion mutant ($\Delta bclae1$ -T3) was accomplished by reintroduction of *bclae1* into the native gene locus yielding strains $\Delta bclae1$ ^{CL} (T1, T3). Expression of *bclae1* under control of a constitutive promoter (*A. nidulans* *PoliC*) in the wild-type background resulted in three overexpressing mutants (OE::*bclae1*-T6, OE::*bclae1*-T7, OE::*bclae1*-T8). As the independent mutants exhibited identical phenotypes, the data for one arbitrarily chosen strain per mutation are presented (discussed below) (Table 1). Absence of the specific transcripts in $\Delta bcvell1$ and $\Delta bclae1$ mutants and the overexpression of the genes in OE::*bcvell1* and OE::*bclae1* mutants were confirmed by Northern blot analyses (Fig. 2A). Furthermore, these studies revealed that the expression levels of *bcvell2* and *bcvell4* (ortholog of *A. nidulans* *velC*) were elevated in the $\Delta bcvell1$ mutant and that *bcvell2* was slightly up-regulated in OE::*bcvell1* and $\Delta bclae1$ mutants.

Radial growth rates of the mutants and wild-type B05.10 on solid standard media, i.e., on Czapek-Dox (CD) as defined minimal medium and on complete medium (CM) under

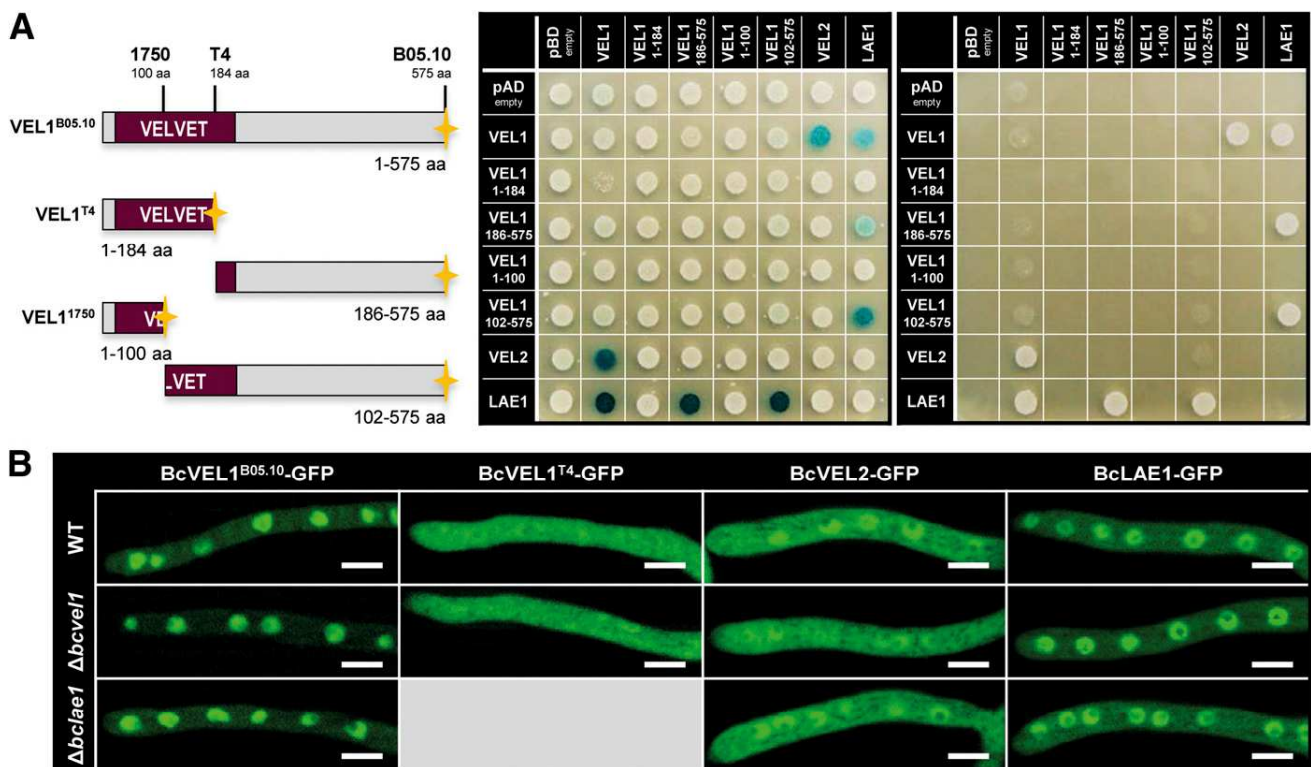


Fig. 1. BcVEL1, BcVEL2, and BcLAE1 form a complex in some but not all *Botrytis cinerea* strains. **A**, BcVEL1^{B05.10} but not the truncated proteins from T4 and 1750 interact with BcVEL2 and BcLAE1 in a yeast two-hybrid approach. The full-length proteins of BcVEL1, BcVEL2, and BcLAE1 found in strain B05.10, the truncated versions of BcVEL1 found in T4 and 1750 as well as the remaining C-terminal regions were fused to the GAL4 activation and GAL4 binding domains for yeast two-hybrid analysis. Cell suspensions of *Saccharomyces cerevisiae* strains (derivatives of PJ69-4A) containing the indicated vectors were dropped onto selective media. On the left: synthetic defined (SD) medium without leucine and tryptophan supplemented with X-Gal (SD-LW+X-Gal) was used to demonstrate the presence of both vectors and *LacZ* reporter gene activity (displayed by blue staining). On the right: SD without leucine, tryptophan, and histidine supplemented with 11 mM 3-amino-1,2,4-triazole (SD-LWH+3-AT) was used to detect *HIS3* reporter gene activity (displayed by colony growth). **B**, Members of the VELVET complex are localized in the nuclei. Green fluorescent fusion proteins were expressed from the constitutive *Aspergillus nidulans* *oliC* promoter in different genetic backgrounds, i.e., in wild-type B05.10, $\Delta bcvell1$ and $\Delta bclae1$. Conidia were incubated on microscope slides for 14 h in darkness, followed by 6 h in light. Scale bars, 5 μ m.

different light conditions (12-h light and 12-h dark photoperiod [LD] or constant darkness [DD]) were comparable (Table 2), demonstrating that the mutations of *bclae1* and *bcvell* did not impair growth under these conditions. To monitor whether the *Δbclae1* mutants exhibit increased nitrate reductase activities under noninducing or repressing conditions, as previously reported for *Δbcvell* mutants (Schumacher et al. 2012), the strains were cultivated on solid CM supplemented with KClO₃ (Table 2). While radial growth rates of the wild type were not significantly affected (91% of control), indicating low expression levels of *bcniaD*, growth rates of both deletion mutants were decreased to a similar extent (approximately 75% of control), suggesting increased expression levels of *bcniaD*, leading to the more efficient conversion of chlorate to the toxic metabolite chlorite.

BcLAE1 regulates OA formation and is required to cope with oxidative stress.

Optimal growth rates for *B. cinerea* are achieved under acidic conditions (pH 4 to 5). Under neutral or alkaline conditions, the fungus first acidifies the culture medium by producing significant amounts of OA (Han et al. 2007) and, only then, it starts to colonize the medium. Growth rates of the mutant strains were not affected on standard media at pH values of 5. However, changing the initial pH of the medium impaired the radial growth rates of the mutants. At pH 3, growth rates of *Δbclae1*, OE::*bclae1*, and *Δbcvell* mutants were affected; at pH 7 and pH 9, those of *Δbclae1*, *Δbcvell*, and OE::*bcvell* mutants were affected (Fig. 2B). Reduced growth rates of the two deletion mutants under neutral or alkaline conditions was accompanied by the inability of the mutants to acidify the culture medium (Fig. 2C) and correlated with the absence of the expression of *bcoaH* encoding the OA-forming enzyme (Fig. 2A).

To assess whether either BcLAE1, BcVEL1, or both are also essential to cope with other kinds of stresses, growth rates of the mutants were quantified on media supplemented with stressors inducing osmotic stress (0.7 M NaCl, 1.4 M sorbitol) or oxidative stress (5.0 or 7.5 mM H₂O₂, 500 μM menadione) (Table 2). Under osmotic stress conditions all mutants showed comparable growth rates. However, the mutants had problems coping with oxidative stress conditions, especially during incubation in the light (LD). Hence, the addition of menadione (artificial source of superoxide radicals) decreased the growth rates of *bclae1* and *bcvell* mutants. The addition of H₂O₂ along

with the exposure to light had an even more pronounced effect on some mutants. Thus, *Δbclae1* mutants failed to grow on medium with 7.5 mM H₂O₂ in LD and DD, while the *Δbcvell* and OE::*bcvell* mutants were able to grow on the same medium in DD but not in LD conditions.

Taken together, BcLAE1 and BcVEL1 are required for the production of OA and, thereby, for facilitating growth under alkaline conditions. Moreover, BcLAE1 and, to a lesser extent, BcVEL1 contribute to oxidative stress resistance.

Deletion of *bclae1* decouples differentiation programs from light control.

In the majority of *B. cinerea* isolates, including B05.10, the mode of asexual reproduction is controlled by the light condition (Canessa et al. 2013; Epton and Richmond 1980). (Macro)conidia, the primary source of inoculum for host infections, are formed during exposure to light, while sclerotia, which serve as resting structures (asexual) and the female parent in sexual reproduction, are only produced in the absence of light. Time course experiments were performed to follow the onset of conidiation in the generated mutants under different illumination conditions (Fig. 3A). Both *Δbclae1* and *Δbcvell* mutants initiated conidiation earlier in LD and constant light (LL) conditions, relative to the wild type, and produced conidia even in DD conditions. In LL, growth and conidiation of *Δbclae1*, *Δbcvell*, and OE::*bcvell* was further accompanied by increased production of the dark pigment DHN-melanin. On the other hand, the onset of conidiation was slightly delayed in OE::*bclae1* mutants.

The formation of sclerotia requires a longer period than conidiation. Usually nonpigmented initials are visible after 1 week in DD. After 2 weeks, the sclerotia are fully developed and pigmented (Fig. 3B). While OE::*bclae1* mutants formed sclerotia as the wild type, *Δbclae1* and *Δbcvell* mutants failed to form any sclerotia and the OE::*bcvell* mutant produced significant numbers of both conidia and sclerotia in DD. Though both *Δbclae1* and *Δbcvell* mutants underwent conidiation in DD, their colony appearances were different. While *Δbcvell* mutants sparingly developed aerial hyphae accompanied by high numbers of conidia, the *Δbclae1* mutants exhibited excessive aerial hyphae formation, giving the colonies a 'cotton candy'-like appearance (data not shown), and produced only small numbers of conidia (Fig. 3B).

Due to the lack of sclerotia formation, both deletion mutants were female sterile. However, *Δbclae1* mutants produced

Table 1. *Botrytis cinerea* strains used in this study

Strain	Genotype	Reference
WT:B05.10	Isolate from grapevine, MAT1-1	Quidde et al. 1998
WT:SAS405	Isolate from grapevine, MAT1-2	Faretra et al. 1988
<i>Δbcvell</i>	B05.10, <i>Δbcvell::hph</i> ; homokaryon	Schumacher et al. 2012
OE:: <i>bcvell</i>	B05.10, <i>PoliC::bcvell-gfp::nat1</i> in <i>bcniiA</i> ; heterokaryon	Schumacher et al. 2012
<i>Δbclae1</i>	B05.10, <i>Δbclae1::nat1</i> ; homokaryon	This study
OE:: <i>bclae1</i>	B05.10, <i>PoliC::bclae1::hph</i> in <i>bcniaD</i> ; heterokaryon	This study
<i>Δbclae1</i> ^{CIL}	B05.10, <i>Δbclae1::nat1, bclae1::hph</i> in <i>loco</i> ; heterokaryon	This study
WT::VEL1 ^{B05.10} -GFP	B05.10, <i>PoliC::bcvell^{B05.10}-gfp::nat1</i> in <i>bcniiA</i> ; heterokaryon	Schumacher et al. 2012
WT::VEL1 ^{T4} -GFP	B05.10, <i>PoliC::bcvell^{T4}-gfp::nat1</i> in <i>bcniiA</i> ; heterokaryon	Schumacher et al. 2012
WT::VEL2-GFP	B05.10, <i>PoliC::bcvel2-gfp::hph</i> in <i>bcniiA</i> ; heterokaryon	This study
WT::LAE1-GFP	B05.10, <i>PoliC::bclae1-gfp::hph</i> in <i>bcniiA</i> ; heterokaryon	This study
<i>Δbcvell</i> ::VEL1 ^{B05.10} -GFP	B05.10, <i>Δbcvell::hph, PoliC::bcvell^{B05.10}-gfp::nat1</i> in <i>bcniiA</i> ; heterokaryon	Schumacher et al. 2012
<i>Δbcvell</i> ::VEL1 ^{T4} -GFP	B05.10, <i>Δbcvell::hph, PoliC::bcvell^{T4}-gfp::nat1</i> in <i>bcniiA</i> ; heterokaryon	Schumacher et al. 2012
<i>Δbcvell</i> ::VEL2-GFP	B05.10, <i>Δbcvell::hph, PoliC::bcvel2-gfp::hph</i> in <i>bcniiA</i> ; heterokaryon	This study
<i>Δbcvell</i> ::LAE1-GFP	B05.10, <i>Δbcvell::hph, PoliC::bclae1-gfp::nat1</i> in <i>bcniiA</i> ; heterokaryon	This study
<i>Δbclae1</i> ::VEL1 ^{B05.10} -GFP	B05.10, <i>Δbclae1::nat1, PoliC::bcvell^{B05.10}-gfp::hph</i> in <i>bcniiA</i> ; heterokaryon	This study
<i>Δbclae1</i> ::VEL1 ^{T4} -GFP	B05.10, <i>Δbclae1::nat1, PoliC::bcvell^{T4}-gfp::hph</i> in <i>bcniiA</i> ; heterokaryon	This study
<i>Δbclae1</i> ::LAE1-GFP	B05.10, <i>Δbclae1::nat1, PoliC::bclae1-gfp::hph</i> in <i>bcniiA</i> ; heterokaryon	This study
<i>Δbcwcl1</i>	B05.10, <i>Δbcwcl1::hph</i> ; homokaryon	Canessa et al. 2013
<i>ΔbcfluG</i>	B05.10, <i>ΔbcfluG::hph</i> ; homokaryon	This study
OE:: <i>bcfluG</i>	B05.10, <i>PoliC::bcfluG::nat1</i> in <i>bcniaD</i> ; heterokaryon	This study

microconidia as the wild type (data not shown) and, consequently, the $\Delta bclae1$ microconidia were used to fertilize sclerotia of the reference strain SAS405, carrying the opposite mating type. As previously reported for the cross SAS405^{sclerotia} × $\Delta bcvel1$ ^{microconidia} (Schumacher et al. 2012), the cross SAS405^{sclerotia} × $\Delta bclae1$ ^{microconidia} yielded regularly shaped apothecia (fruiting bodies) with fertile ascospores. Of 47 ascospores tested, 24 yielded nourseothricin-sensitive colonies with the wild-type phenotype (sclerotia in DD) and 23 yielded nourseothricin-resistant colonies exhibiting the $\Delta bclae1$ phenotype (no sclerotia but conidia in DD) (data not shown), demonstrating that $\Delta bclae1$ mutants were male fertile.

Bclae1 and bcvel1 deletion mutants still respond to light on the transcriptional level.

Bcvel1 and *bclae1* deletion mutants do not appropriately respond to environmental light conditions as the asexual differentiation programs are deregulated. Recently, genome-wide expression analyses in strain B05.10 revealed a number of genes whose expression levels are up- or down-regulated in response to white light (Schumacher et al. 2014). Two TF were described to be important for appropriate light signaling: the ortholog of WHITE COLLAR-1, BcWCL1 (Canessa et al. 2013), and the light-responsive transcription factor BcLTF1 (Schumacher et al. 2014).

To gain insight into the role of the VELVET complex in the light signaling network, Northern blot analyses were performed to detect the expression levels of several known light-responsive genes encoding TF (*bcwcl1*, *bcwcl2*, *bcltf1*, *bcltf2*, *bcltf3*) and photoreceptors (*bcry1*, *bcry2*, *bop1*, *bcphy2*). For this, wild type, $\Delta bcvel1$, $\Delta bclae1$, as well as the partially ‘blind’ $\Delta bcwcl1$ mutant (Canessa et al. 2013) were cultivated for 2 days on solid CM with cellophane overlays in DD or LL. Moreover, DD-grown cultures were exposed to white light for 15, 60, and 300 min (Fig. 4). Surprisingly, the expression levels of the tested genes increased similarly to the wild type in response to light in the $\Delta bcvel1$ and $\Delta bclae1$ mutants, while induction of gene expression in the $\Delta bcwcl1$ mutant did not occur or was less evident. Nevertheless, minor effects were observed for some genes in the mutant backgrounds. Hence, *bcry2*, encoding one of the near-UV and blue light-sensing cryptochromes, was more strongly up-regulated in $\Delta bcvel1$ and $\Delta bclae1$ mutants. Furthermore, *bcltf1* and *bcltf2* were already expressed in $\Delta bcvel1$ mutants in the dark and were more strongly induced, compared with the wild type, upon 15 min of light exposure. In conclusion, $\Delta bcvel1$ and $\Delta bclae1$ mutants still respond to light signals with altered gene expression patterns, though the conidiation program no longer depends on light.

The FluG ortholog has no obvious functions in *B. cinerea*.

Gene expression studies revealed that the expression levels of the gene *BC1G_01105/B0510_5527* (hereafter called *bcfluG*), encoding the ortholog of the *A. nidulans* conidiation-related protein FluG (Lee and Adams 1994), were significantly up-regulated in mutants exhibiting a hyper-conidiation phenotype, such as in $\Delta bcltf1$ mutants (Schumacher et al. 2014) and in $\Delta bcvel1$ and $\Delta bclae1$ mutants (Fig. 4). Considering the possibility that the FluG ortholog is involved in conidiation in *B. cinerea* as well, *bcfluG* deletion and overexpressing mutants were generated (discussed below) and were characterized with regard to conidiation as well as to sclerotia formation, mating, apothecial development, and virulence (Supplementary Fig. S2) (data not shown). However, in all these assays the *bcfluG* mutants exhibited the same phenotype as the wild type.

BcLAE1 is essential for colonizing the host tissue.

B. cinerea is able to enter intact plant tissues by using two different kinds of penetration structures, conidia that form short

germ tubes that penetrate immediately and hyphae that differentiate highly branched infection cushions (Choquer et al. 2007). As mutants may be affected in either one or both modes of infection, primary leaves of French bean (*Phaseolus vulgaris*) plants were inoculated with conidial suspensions (Fig. 5A) and undifferentiated mycelia of wild-type and mutant strains (data not shown). Infections by the overexpression mutants proceeded in a wild type-like fashion when conidial suspensions were used as inoculum. However, when mycelium of the OE::

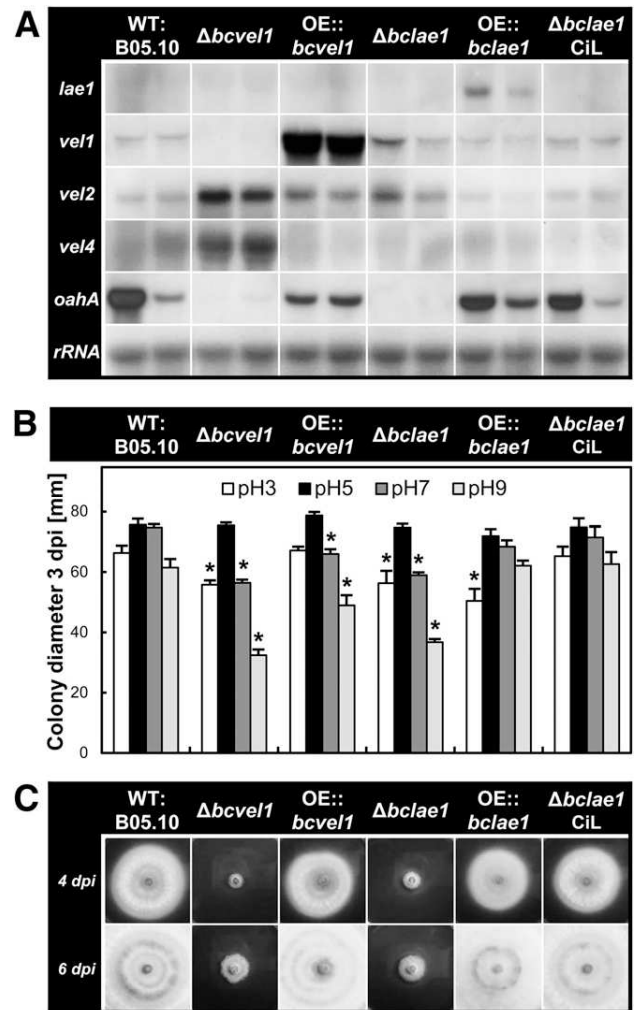


Fig. 2. BcVEL1 and BcLAE1 are required for production of oxalic acid (OA) and, thereby, for facilitating growth under neutral and alkaline conditions. **A**, Northern blot analyses confirm the deletion and overexpression of *bcvel1* and *bclae1* in respective mutants. Indicated strains were cultivated for 2 (left lanes) and 3 days (right lanes) on solid complete medium (CM) (pH 5) covered with cellophane overlays in a 12-h light and 12-h dark (LD) photoperiod. The blot was hybridized with probes of *bclae1*, *bcvel1* to *bvel4* (no expression was detectable for *bvel3*), and *bcoahA* encoding the OA-forming enzyme oxaloacetate hydrolase. The 28S rRNA is shown as loading control. **B**, Mutations of BcVEL1 and BcLAE1 impair the ability to tolerate extreme pH values. Strains were incubated for 3 days on solid CM adjusted to the indicated pH values. Mean values and standard deviations were calculated from three colonies per strain and condition. Asterisks indicate significant differences compared with WT:B05.10 in each condition ($P < 0.001$). **C**, *Bcvel1* and *bclae1* deletion mutants fail to acidify the culture medium. For monitoring the acidification of the medium, solid CM, pH 8, was supplemented with the pH indicator bromothymolblue. Strains were cultivated for 6 days in a LD photoperiod. The bright color indicates acidification (pH < 6.0).

bclae1 strain was used, infections were irregular, which was likely caused by reduced penetration efficiencies rather than by impaired invasive growth rates (data not shown). Penetration and the establishment of primary lesions by $\Delta bclae1$ and $\Delta bcvel1$ were similar to the wild type, but then, infection proceeded differentially. Both mutants were impaired in their capabilities to colonize the surrounding host tissue. However, while conidia-derived infections did not spread at all, infections starting from mycelial plugs spread slowly and finally stopped in the stage of spreading (data not shown). In any case, the deletion mutants failed to colonize the whole leaf and to produce conidia, indicating that both BcLAE1 and BcVEL1 are required for full virulence. Similar defects in colonization and in planta conidiation were observed when ripe grape berries (*Vitis vinifera*) were inoculated with conidial suspensions (Fig. 5B). While 92% of berries were fully colonized by the wild-type strain at 10 days postinoculation, only 71 and 54% of the berries infected with the $\Delta bclae1$ and $\Delta bcvel1$ mutants, respectively, were similarly colonized.

BcLAE1 and BcVEL1 have common and unique target genes.

To gain broader insight into the functions of BcLAE1 and BcVEL1 and their interrelationship, a genome-wide approach was initiated to compare gene expression profiles of wild-type B05.10 and $\Delta bcvel1$ and $\Delta bclae1$ mutants. Conidia of the strains were cultivated for 48 h on solid grape juice medium covered with cellophane overlays. Total RNA from four biological replicates was extracted, labeled, and hybridized to NimbleGen microarrays containing oligonucleotides representing all predicted genes of *B. cinerea* (Amselem et al. 2011). Statistical tests led to the identification of 1,438 distinct genes whose expression levels were significantly altered in one or both $\Delta bclae1$ and $\Delta bcvel1$ mutants (fold change [FC] > 2, *P* value < 0.05) (discussed below). These differentially expressed (DE) genes were assigned to eight expression profiles (Fig. 6A; Supplementary Table S2). 36.5% (525) of the DE genes show the same expression pattern in both mutants, with 14% (202) being overexpressed (profile 1) and 22.5% (323) being underexpressed (profile 4). A total of 29.2% (420) are overexpressed in only one mutant, 13.4% (193) in $\Delta bcvel1$ (profile 2) and 15.8% (227) in $\Delta bclae1$ (profile 3). A total of

32.1% (462) are underexpressed in only one mutant, 10.1% (146) in $\Delta bcvel1$ (profile 5) and 22% (316) in $\Delta bclae1$ (profile 6). Only 2.2% (31 genes) exhibit opposing expression patterns in the two mutant backgrounds (profiles 7 and 8).

Functional enrichment analyses using the GSEA (gene set enrichment analyses) method with defined sets of annotated genes were performed to reveal biological processes that are affected by the absence of one or both BcVEL1 and BcLAE1 (Table 3). These analyses revealed that the groups of underexpressed genes in both deletion mutants were enriched for genes belonging to SM clusters as well as for genes encoding secreted proteins, proteases, and carbohydrate-active enzymes. Furthermore, the group of underexpressed genes in $\Delta bclae1$ was enriched for genes encoding enzymes involved in oxidative stress response (OSR), and the group of overexpressed genes in $\Delta bclae1$ was enriched for genes encoding transporters for various substrates.

Taken together, the microarray analyses demonstrated that BcVEL1 and BcLAE1 regulate a set of common target genes but that the majority of DE genes (63.5%) is differently affected by the absence of BcVEL1 and BcLAE1. Nevertheless, both components of the VELVET complex are required for the appropriate expression of genes involved in SM and cell-wall degradation.

Absence of one or both BcLAE1 and BcVEL1 affects SM-related gene expression.

The transcriptomic approach revealed that 16 of the 44 genes encoding SM KE were differentially expressed relative to wild type in either $\Delta bcvel1$, $\Delta bclae1$, or both mutants (Fig. 6B). Only one KE-encoding gene (*bcstc4*) was significantly overexpressed in both mutants (FC of 4.6 and 4.1), and two others (*bcpks5*, encoding a hybrid PKS-NRPS, and *bcnrps7*) were significantly overexpressed in the $\Delta bcvel1$ mutant (FC of 3 and 3.5) and to a lesser extent in the $\Delta bclae1$ mutant (FC of 1.9 and 1.5). *Bcpks5* and *bcnrps7* are colocalized in the genome together with other genes that were overexpressed in $\Delta bcvel1$, suggesting that the two KE-encoding genes belong to the same gene cluster (*B0510_10357/bcnrps7* to *B0510_10348/bcpks5*).

Ten KE-encoding genes were underexpressed in both mutants to similar extents (profile 4). Only *bcpks19* and *bcdmat2*,

Table 2. Radial growth rates of wild type B05.10 and mutant strains^a

Medium/light condition		WT:B05.10	$\Delta bcvel1$	OE:: <i>bcvel1</i>	$\Delta bclae1$	OE:: <i>bclae1</i>	$\Delta bclae1$ ^{CIL}
CD-NO3	LD	52.8 ± 3.7 (70%)	42.3 ± 0.8 (56%)	n/a	45.2 ± 3.0 (60%)	n/a	50.0 ± 3.5 (67%)
pH5	DD	54.2 ± 2.6 (70%)	43.3 ± 1.0 (57%)	n/a	49.8 ± 1.0 (66%)	n/a	56.0 ± 1.3 (73%)
CD-NH4	LD	45.2 ± 2.4 (60%)	46.5 ± 4.8 (62%)	53.2 ± 2.6 (68%)	49.0 ± 2.0 (66%)	36.3 ± 4.1 (50%)	39.8 ± 2.2 (53%)
pH5	DD	50.0 ± 1.7 (65%)	48.7 ± 1.6 (64%)	55.0 ± 2.4 (70%)	52.5 ± 1.2 (70%)	43.5 ± 4.7 (58%)	50.3 ± 1.9 (66%)
CM pH5	LD	75.7 ± 1.9 (100%)	75.4 ± 1.0 (100%)	78.7 ± 1.2 (100%)	74.8 ± 1.2 (100%)	72.0 ± 2.3 (100%)	74.9 ± 2.8 (100%)
Control	DD	77.1 ± 2.8 (100%)	75.8 ± 1.1 (100%)	78.2 ± 1.4 (100%)	75.2 ± 1.5 (100%)	74.5 ± 1.5 (100%)	76.5 ± 3.3 (100%)
CM +	LD	43.3 ± 3.6 (57%)	42.8 ± 0.8 (57%)	36.8 ± 2.3 (47%)	41.5 ± 0.5 (56%)	42.3 ± 3.4 (59%)	45.7 ± 1.2 (61%)
0.7 M NaCl	DD	45.2 ± 0.8 (59%)	40.8 ± 1.6 (54%)	35.7 ± 0.5 (46%)	39.0 ± 1.8 (52%)	40.3 ± 2.3 (54%)	45.0 ± 1.4 (59%)
CM+	LD	65.2 ± 0.8 (86%)	64.0 ± 0.6 (85%)	62.5 ± 1.2 (79%)	57.3 ± 0.5 (77%)	65.0 ± 0.6 (90%)	65.8 ± 0.8 (88%)
1.4 M sorbitol	DD	60.8 ± 1.5 (79%)	60.5 ± 1.4 (80%)	60.2 ± 0.4 (77%)	57.3 ± 2.1 (76%)	58.8 ± 1.2 (79%)	62.8 ± 1.3 (82%)
CM+	LD	69.7 ± 1.9 (92%)	58.0 ± 1.5 (77%)	n/a	56.0 ± 1.7 (75%)	n/a	61.2 ± 5.7 (82%)
0.4 M KClO ₃	DD	70.2 ± 1.7 (91%)	54.3 ± 1.0 (72%)	n/a	56.5 ± 0.5 (75%)	n/a	65.5 ± 1.6 (86%)
CM+	LD	45.0 ± 4.3 (59%)	15.5 ± 12.5 (20%)	36.0 ± 12.3 (48%)	8.0 ± 6.4 (11%)	45.7 ± 3.5 (63%)	49.3 ± 2.7 (66%)
5.0 mM H ₂ O ₂	DD	51.5 ± 0.8 (67%)	38.5 ± 3.6 (49%)	43.3 ± 1.9 (57%)	32.7 ± 6.1 (43%)	46.2 ± 3.8 (62%)	53.2 ± 0.4 (69%)
CM+	LD	40.1 ± 4.5 (53%)	0.0 ± 0.0 (0%)	4.5 ± 7.0 (6%)	0.0 ± 0.0 (0%)	36.8 ± 2.9 (51%)	40.5 ± 6.9 (54%)
7.5 mM H ₂ O ₂	DD	40.5 ± 2.4 (53%)	31.2 ± 7.5 (41%)	34.0 ± 2.5 (43%)	0.0 ± 0.0 (0%)	37.2 ± 0.8 (50%)	40.8 ± 0.8 (53%)
CM + 500 μM menadione	LD	52.8 ± 0.8 (70%)	38.7 ± 1.0 (51%)	42.0 ± 0.6 (53%)	42.2 ± 0.8 (56%)	40.5 ± 3.9 (56%)	50.2 ± 0.4 (67%)
	DD	52.3 ± 1.5 (68%)	32.3 ± 1.0 (43%)	45.8 ± 0.8 (59%)	42.7 ± 2.1 (57%)	50.2 ± 0.8 (67%)	51.0 ± 2.4 (67%)

^a Strains were cultivated for three days on minimal medium (CD) containing nitrate (NO₃) or ammonium (NH₄) as the nitrogen source or complete medium (CM) supplemented with stressors as indicated. Cultures were incubated in a 12-h light and 12-h dark (LD) photoperiod and in constant darkness (DD). Mean values and standard deviations were calculated from three colonies per strain and condition, with two measurements per colony. Relative growth to control (CM, pH 5) is indicated in brackets; n/a = not analyzed. Respective mutants are affected in nitrate assimilation due to targeted integration of the overexpression (OE) constructs at *bcniiA* (OE::*bcvel1*) and *bcniiD* (OE::*bclae1*), respectively.

putatively encoding a PKS and a DMATS, respectively, seem to be less affected in the absence of *bclae1* (FC of -2.9 and -2.4) than by the absence of *bcvel1* (FC of -7.2 and -7.7). *bcpax1*, which is possibly responsible for the biosynthesis of an indole-diterpene such as paxilline, belongs to the KE-encoding genes that were underexpressed in both mutants in a similar fashion (FC of -3.9 and -3.1). Notably, the surrounding genes (*B0510_1781* to *B0510_1785*) that are also orthologous to those in the paxilline biosynthetic gene cluster in other fungi (Saikia et al. 2008) exhibit the same expression pattern. The PKS-encoding genes *bcboa6* and *bcboa9* that are involved in BOA biosynthesis (Dalmais et al. 2011) were also underexpressed in both mutants. All BOA cluster genes except *bcboa14* to *bcboa17* showed the same expression pattern as the two KE. Furthermore, the KE-encoding genes *bcpks4* and *bcnrps8* were underexpressed in both mutants together with their adjacent genes, indicating that they belong to a yet-undescribed cluster

(*B0510_7880* to *B0510_7886*). Finally, three other independent PKS-encoding genes, including the putative melanogenic gene *bcpks12* (Schumacher et al. 2014), were less expressed in the absence of either BcVEL1 or BcLAE1.

In contrast, *bcpks7*, encoding a hybrid PKS-NRPS, and the adjacent genes (*B0510_5671*, *B0510_5672*) were significantly underexpressed in the $\Delta bcvel1$ mutant only (FC -3.6) and not affected by the deletion of *bclae1*. In contrast, *bcbot1* and four adjacent genes (*bcbot2-5*) involved in the biosynthesis of BOT (Pinedo et al. 2008; Siewers et al. 2005) as well as *bcnrps1* and three adjacent genes (*B0510_8343*, *B0510_8342*, and *B0510_8340*) were severely affected by the deletion of *bclae1* but not significantly by $\Delta bcvel1$.

To investigate whether the overexpression of *bcvel1* and *bclae1* affects the expression levels of chosen SM-related genes belonging to profiles 1 (*bcstc4*), 4 (*bcboa6*), 5 (*bcpks7*), and 6 (*bcbot2*), wild type and deletion and overexpressing mutants for

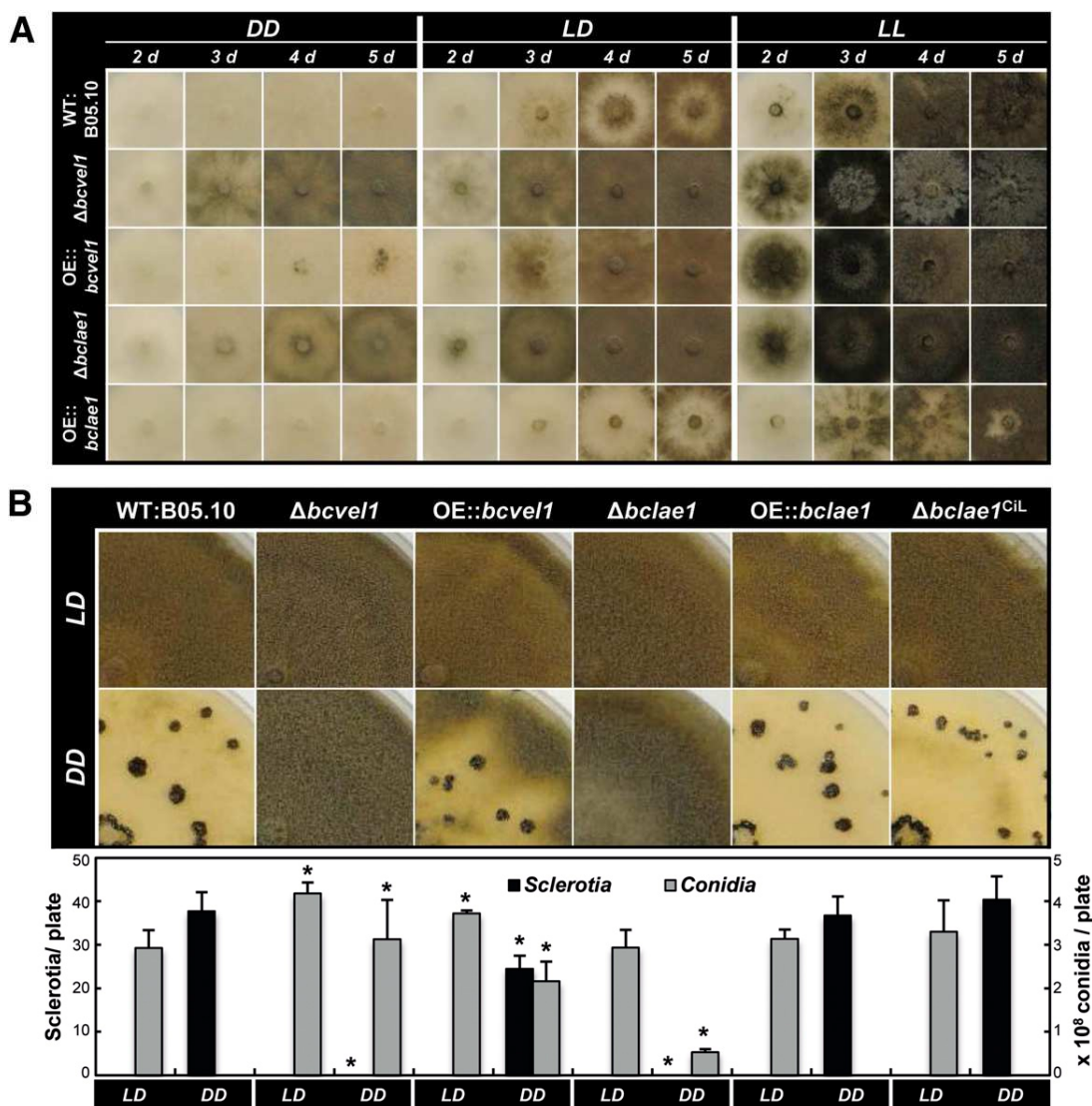


Fig. 3. Deletions of *bcvel1* and *bclae1* decouple differentiation programs from light control. **A**, Conidiation starts earlier in $\Delta bcvel1$ and $\Delta bclae1$ mutants than in the wild type and occurs in constant darkness. Indicated strains were cultivated on solid complete medium (CM) (petri dishes with a diameter of 45 mm) in continuous darkness (DD), in a 12-h light and 12-h dark (LD) photoperiod, or continuous light (LL). Plates were inoculated with plugs of undifferentiated mycelia on consecutive days; pictures were taken after 5 days of incubation. **B**, Light-independent conidiation of $\Delta bcvel1$ and $\Delta bclae1$ mutants is accompanied by the loss of sclerotia formation. Strains were incubated for 14 days on solid CM (petri dishes with a diameter of 90 mm) in DD or LD conditions. The numbers of formed sclerotia and conidia were determined from three cultures per strain and light condition. Asterisks indicate significant differences compared with WT: B05.10 in each condition ($P < 0.001$).

bcvell and *bclae1* were cultivated on solid grape juice medium as described above. Isolated RNA was used for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analyses that confirmed the expression patterns obtained for the deletion mutants in the microarray approach, except for *bcbot2*, whose reduced expression levels in $\Delta bcvell$ is significant in the quantitative (q)PCR data while it was not in the microarray data (Fig. 6C). However, the overexpression of *bcvell* and *bclae1* did not or only marginally affected the expression levels of the chosen genes.

In sum, the expression studies provide evidence that BcVEL1 and BcLAE1 are important regulators of SM-related gene expression in *B. cinerea*. Thereby, the coregulation patterns of known clusters (BOA, BOT) were confirmed and five cryptic new gene clusters (*bcpks5/bcnrps7*, *bcpks4*, *bcpax1*, *bcpks7*, and *bcnrps1*) were identified, based on the coregulation of the KE-flanking genes by one or both BcVEL1 and BcLAE1.

DISCUSSION

Recently, we identified genetic variation in *bcvell*, the ortholog of *A. nidulans veA*, as the genetic basis for reduced virulence, loss of OA formation, and the hyper-coniadiation phenotype of wild-type strain T4 (Schumacher et al. 2012). *Bcvell*^{T4} contains a SNP (compared with strain B05.10) leading to a truncated protein of 184 aa. Consequently, replacement of this allele by *bcvell*^{B05.10} rescued virulence, sclerotia formation, and OA secretion in the T4 genetic background. A second SNP resulting in a truncated protein of 100 aa was identified in the BIK-producing strain 1750 (Schumacher et al. 2013). As both strains still exhibit regular pigmentation in contrast to the generated deletion mutants lacking the whole gene, we suggest that the first 100 aa of BcVEL1 are sufficient for proper regulation of pigment formation but not for

regulation of differentiation, OA formation, and virulence. The full-length protein (BcVEL1^{B05.10}) accumulates in the nuclei, whereas the truncated protein (BcVEL^{T4}) predominantly localizes to the cytosol. Therefore, we concluded that the C-terminus and its putative interaction partners are essential to regulate the phenotypic traits virulence, differentiation, and OA formation.

To further characterize the regulatory networks of BcVEL1, we studied the role of its putative interaction partner, the putative methyltransferase BcLAE1. Yeast two-hybrid analyses confirmed that the *B. cinerea* orthologs (BcVEL1, BcLAE1, BcVEL2) interact and likely form a complex analogous to the situation found in eurotiomycetes and sordariomycetes (Bayram et al. 2008; Hoff et al. 2010; Wiemann et al. 2010). Thereby, BcVEL1^{B05.10}—unlike BcVEL1^{T4} and BcVEL1¹⁷⁵⁰—interacts with BcLAE1 and BcVEL2. The interaction with BcLAE1 is mediated via the C-terminal region (186 to 575 aa), while interaction with BcVEL2 probably requires the intact N-terminal VELVET domain. This hypothesis is corroborated by the data of Yang et al. (2013), who demonstrated by a yeast-two hybrid approach that the truncated BcVEL1 protein comprising the first 294 aa, and thereby, the whole VELVET domain (aa 23 to 220), interacts with BcVEL2 (truncated protein containing aa 107 to 451). The latter finding differs from the situation in *A. nidulans*, in which the first 29 aa of VeA facilitate the interaction with VelB, whereas the VELVET domain itself is dispensable (Bayram et al. 2008; Palmer et al. 2013). The first 36 aa of VeA also determine the subcellular localization of the protein (Stinnett et al. 2007). In contrast to VeA, BcVEL1 lacks an obvious nuclear localization signal (NLS), though the full-length protein localizes to the nucleus in the wild type as well as in the $\Delta bclae1$ mutant, indicating that BcLAE1 is not required for nuclear localization of full-length BcVEL1. Furthermore, absence of BcVEL1 does not alter the subcellular localization

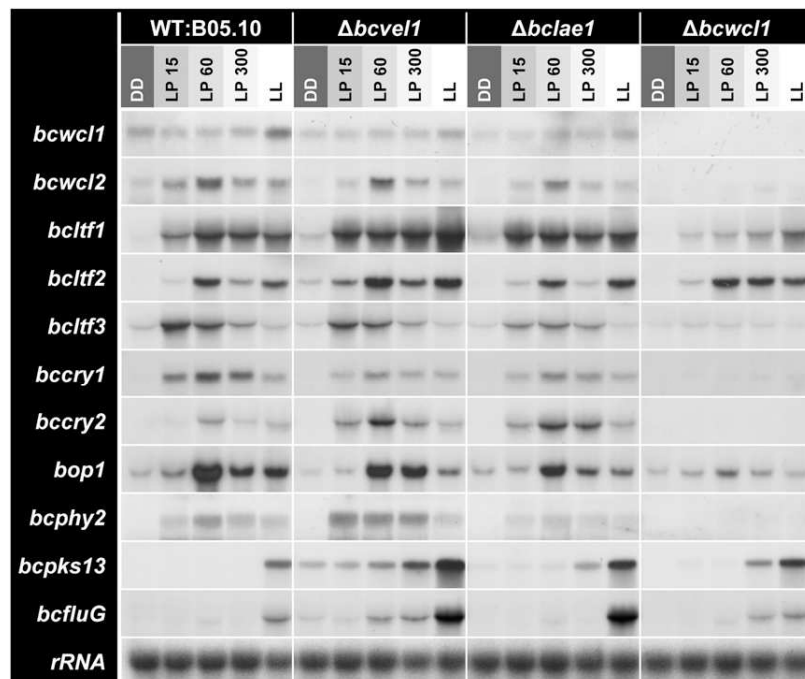


Fig. 4. $\Delta bcvell$ and $\Delta bclae1$ mutants still respond to light on the transcriptional level. Wild-type B05.10 and indicated mutants were incubated on solid complete medium for 50 h in continuous darkness (DD) or continuous light (LL) conditions. DD-grown cultures were then exposed to white light for the indicated periods (light pulses [LP] of 15, 60, and 300 min) or were kept for an additional 60 min in DD before harvest. The Northern blot was hybridized with the following probes: *bcwcl1*, *bcwcl2* (transcription factors forming the WHITE COLLAR complex), *bcltf1* to *bcltf3* (light-responsive transcription factors), *bccry1*, *bccry2* (putative UV light-sensing cryptochromes), *bop1* (opsin-like protein), *bcphy2* (putative red light-sensing phytochrome), *bcpks13* (polyketide synthase, putatively involved in melanin biosynthesis), and *bcfluG* (ortholog of *Aspergillus nidulans* FluG). The 28S rRNA is shown as loading control.

patterns of BcLAE1 (without NLS) and BcVEL2 (with NLS) that are predominantly found in the nucleus and in the cytosol and nucleus, respectively. However, the complex likely comprises further proteins that may determine the nuclear localization of BcVEL1 and BcLAE1, as demonstrated in *A. nidulans* (Bayram et al. 2008; Park et al. 2014; Purschwitz et al. 2008). Additional interaction partners in this system include VosA (interacting with VeA and LaeA), VeIC (interacting with VosA), and the phytochrome FphA, that interacts also with the blue light-sensing WHITE COLLAR complex (LreA/LreB). The observation that *bcvel4*, encoding the VeIC ortholog, is overexpressed in the $\Delta bcvel1$ background in a similar fashion as *bcvel2* and *bclae1* may indicate an interrelationship with the BcVEL1-BcLAE1 complex. However, *bcvel3*, encoding the VosA ortholog that was recently shown to function as a TF of developmental regulatory genes (Ahmed et al. 2013), was not expressed in any of the studied conditions (data not shown).

The physical interactions of BcVEL1-BcVEL2 and BcVEL1-BcLAE1 suggest that the proteins are functionally interdependent and that the lack of any component prevents the formation of the complex and subsequent signaling while the single overexpression of a complex member is not sufficient to

amplify the signaling responses, as OE::*bcvel1* and OE::*bclae1* mutants did not exhibit opposing phenotypes relative to their respective deletion strains. Remarkably, the overexpression of *bcvel1* resulted in an intermediate phenotype that is more similar to those of the deletion mutants than to that of the wild type, suggesting the possibility that the stability of the protein-protein complex is affected in order to avoid inadequate signaling. In agreement with the expected functional interdependency of the complex members, the deletions of *bcvel1* and *bcvel2* in strain 38B1 resulted in similar phenotypes (Yang et al. 2013), and deletions of *bcvel1* and *bclae1* in the B05.10 background (this study) resulted in similar, though not identical, phenotypes, i.e., similarly reduced virulence on French bean and grape, loss of OA accumulation, and decoupling of the differentiation programs from light control. Further mutants have been described that exhibit the 'blind' phenotype characterized by persistent conidiation. Among them are two mutants lacking the TF involved in light sensing and signal transduction, BcWCL1 as a blue-light sensor (Canessa et al. 2013), and BcLTF1 as a light-responsive TF that modulates the expression levels of other light-responsive genes (Schumacher et al. 2014). However, unlike the $\Delta bcwcl1$ mutant, $\Delta bcvel1$ and $\Delta bclae1$ mutants are still able to

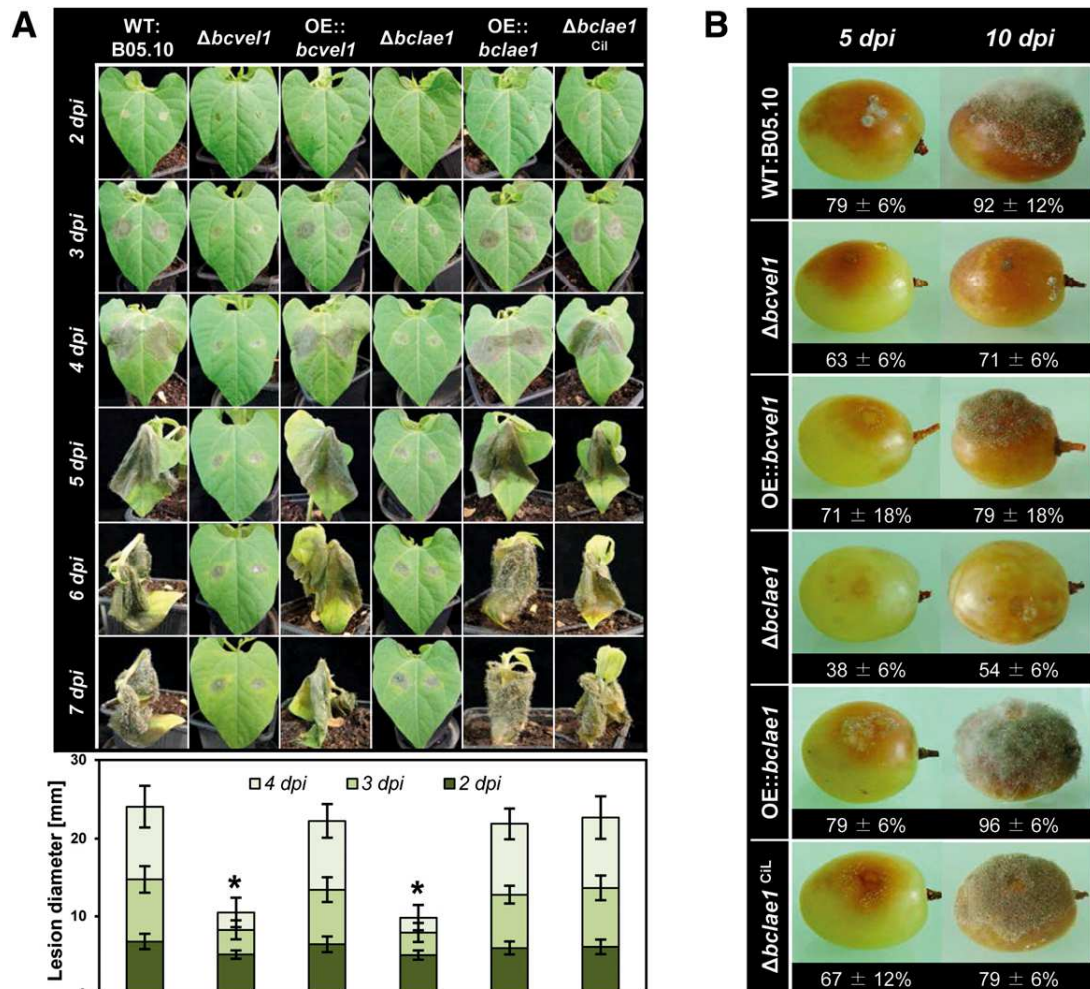


Fig. 5. BcVEL1 and BcLAE1 are essential for necrotrophic growth. **A**, *Bcvel1* and *bclae1* deletion mutants are impaired in colonization of French bean leaves. Primary leaves of living *Phaseolus vulgaris* plants were inoculated with conidial suspensions and incubated in a 12-h light and 12-h dark (LD) photoperiod. Mean values and standard deviation were calculated from 24 lesions per strain with two measurements per lesion. Asterisks indicate significant differences compared with WT:B05.10 in each condition ($P < 0.001$). **B**, *Bcvel1* and *bclae1* deletion mutants are impaired in colonization of grape berries. Berries were inoculated with conidial suspensions and incubated in LD conditions. The most representative berries for each strain are shown, while the numbers below indicate the percentage of colonized berries from two independent assays with 12 berries per strain.

sense light and to turn on light-responsive gene expression. Hence, it appears likely that BcVEL1 and BcLAE1 in addition to BcWCL1 and BcLTF1 act as repressors of conidiation by affecting a yet-unknown TF responsible for switching on the particular differentiation program. This role is fulfilled by the light-responsive TF, i.e., BrlA in *A. nidulans* (Adams et al. 1988; Ruger-Herreros et al. 2011) and by Fl ('fluffy') in *Neurospora crassa* (Bailey and Ebbole 1998; Olmedo et al. 2010). The

genome of *B. cinerea*, however, lacks orthologs of either BrlA or Fl (Amselem et al. 2011). Approaches are currently in progress to identify the TF accomplishing the initiation of conidiation in *B. cinerea*.

BcfluG encoding a glutamine synthetase (GS)-like protein and the ortholog of *A. nidulans* FluG was identified as an overexpressed gene in $\Delta bclt1$ (Schumacher et al. 2014). Its expression pattern mirrors that of *bcpks13*, encoding the PKS

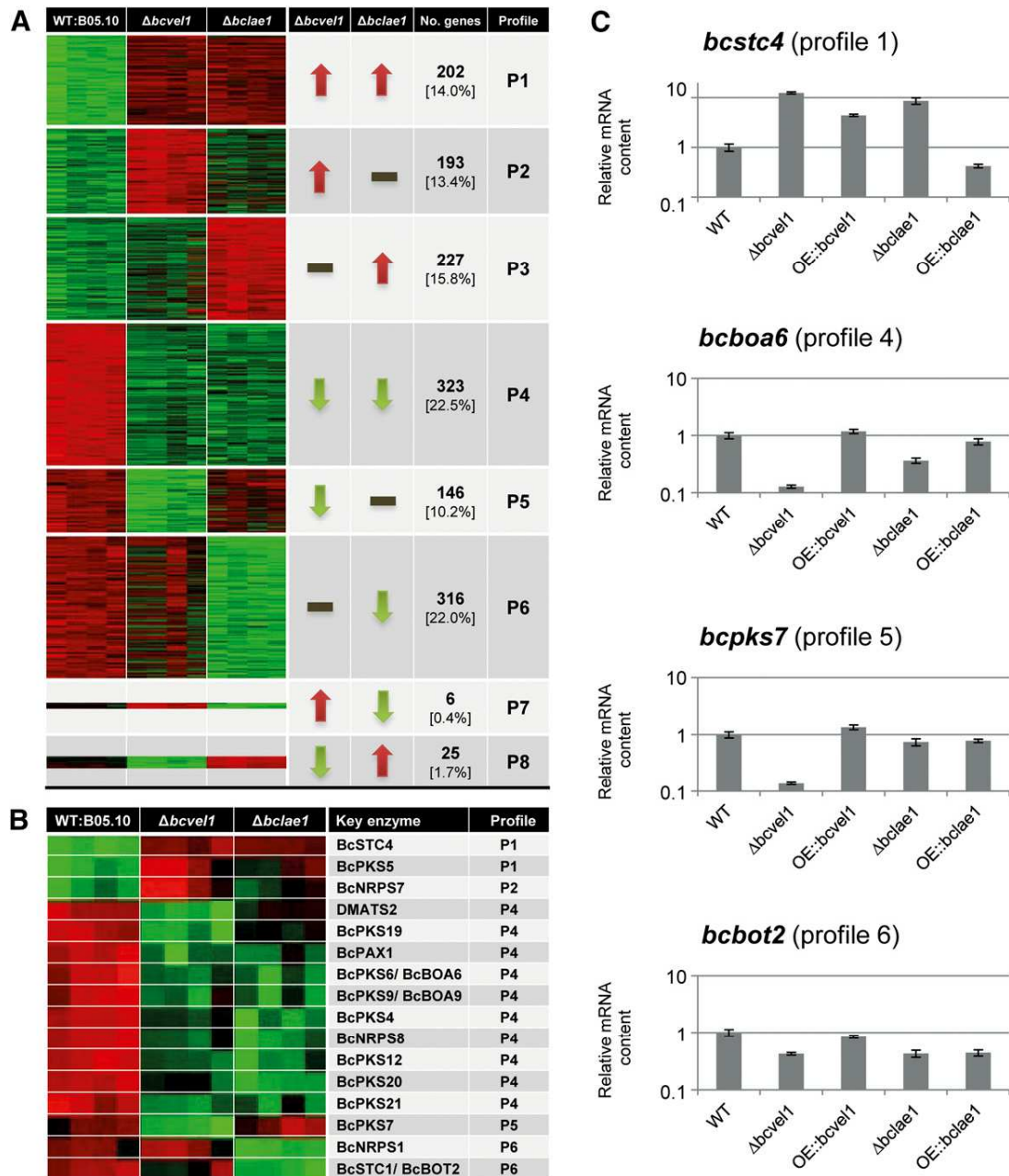


Fig. 6. Deletions of *bcvel1* and *bclae1* affect the expression levels of 1,438 genes. Conidial suspensions of wild-type B05.10 and mutant strains $\Delta bcvel1$ and $\Delta bclae1$ were spread onto solid grape juice medium with cellophane overlays and were incubated for 48 h. RNA from four biological replicates was isolated, labeled, and hybridized to microarrays containing all predicted genes of *Botrytis cinerea*. **A** and **B**, Relative expression values of the genes (i.e., log₂-normalized intensities scaled by gene) in the three strains (twelve hybridizations) were clustered and depicted by color scale, in which shades of green and red represent under- and overexpressed genes, respectively. **A**, Profiles of the differentially expressed genes. Statistical analysis revealed 1,438 genes whose expression levels are affected in either $\Delta bcvel1$ (profiles P2, P5), $\Delta bclae1$ (profiles P3, P6) or in both mutants (profiles P1, P4, P7, P8). **B**, Sixteen of 44 secondary metabolite key enzyme (KE)-encoding genes are differentially expressed in one or both $\Delta bcvel1$ or $\Delta bclae1$. **C**, Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction results confirm the expression patterns of four chosen KE-encoding genes in either $\Delta bcvel1$, $\Delta bclae1$, or both and indicate that these genes do not show opposite expression patterns in the overexpression mutants (OE::*bcvel1* and OE::*bclae1*). Gene expression levels were calculated following the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method using constitutively expressed *bcact1* (actin) as a reference and the wild-type strain B05.10 as a control.

likely involved in melanin biosynthesis and with the onset of conidiation in the wild type and the $\Delta bcvel1$ mutant in this study. Therefore, we assumed a role of *bcfluG* in regulation of conidiation according to the model in *A. nidulans*, in which FluG forms a small, secreted molecule that triggers conidiation once it has been sensed by a membrane-spanning receptor. Accordingly, loss-of-function mutants do not form conidia ('fluffy') (D'Souza et al. 2001; Lee and Adams 1994; Yager et al. 1998). Furthermore, a role of FluG in negative regulation of sclerotial development has been reported in *A. flavus*. In this system, no diffusible SM was detected; however, the authors demonstrated that FluG interacts via the GS domain with VelB and LaeA and suggested that FluG may exercise control of conidiation and sclerotia formation via the VELVET complex (Chang et al. 2012, 2013). However, the FluG ortholog does not exert obvious functions in *B. cinerea*, as neither deletion nor overexpression of *bcfluG* affects light-dependent differentiation programs (formation of conidia, sclerotia, apothecia), virulence, or stress responses.

BcLAE1 and, to a lesser extent, BcVEL1 are involved in the oxidative stress response. Hence, deletion mutants are more sensitive to H₂O₂ and menadione and the growth defects become more evident during cultivation in the light. In recent studies, the additive effect of light and H₂O₂ treatment on oxidative stress levels has been described in *B. cinerea* (Schumacher et al. 2014). In these studies, $\Delta bcftf1$ mutants lost the ability to tolerate light or oxidative stress (in darkness). As light tolerance is restored by antioxidants (Schumacher et al. 2014), it was concluded that light provokes oxidative stress and that, accordingly, the OSR system, including genes for detoxification of ROS, is required during exposure to light. In accordance with the more pronounced effect of H₂O₂ on radial growth rates of $\Delta bc1ae1$ mutants compared with those of the $\Delta bcvel1$ mutants, the group of underexpressed genes in $\Delta bc1ae1$ is enriched for genes encoding OSR enzymes. Nevertheless, light (LD) alone does not impair growth of $\Delta bcvel1$ and $\Delta bc1ae1$ mutants on nutrient-poor or -rich media. Increased sensitivity of deletion mutants to oxidative stress has been reported in other fungal systems as well, e.g., for *C. heterostrophus*, $\Delta vel1$ and $\Delta lae1$ (Wu et al. 2012), for *M. oryzae*, ΔveA and $\Delta velB$ (Kim et al. 2014), and *T. atroviride*, $\Delta lae1$ mutants (Aghcheh et al. 2013).

BcVEL1 and BcLAE1 are essential for virulence by facilitating the colonization of the plant tissue. Notably, the penetration via germ tubes or infection cushions is not affected in the deletion mutants, leading to the establishment of primary infections that are indistinguishable from those provoked by the wild type. However, lesions of the mutants do not spread, suggesting that the mutants are not able to kill surrounding host cells. The reason for this effect is difficult to predict, and it appears unlikely that just one factor is responsible. Hence, OA,

BOT, BOA, unknown SM, and a number of secreted enzymes (proteases and glycosyl hydrolases) may contribute to virulence. Especially striking were the significantly decreased expression levels of the latter genes in both mutants, usually highly expressed during the fungus-host interaction. Similarly, the loss of mycoparasitic activity of *T. atroviride* $\Delta lae1$ mutants correlates with the underexpression of several genes normally induced during the mycoparasitic interaction, e.g., proteases, glucanases, and small secreted proteins (Aghcheh et al. 2013).

The transcriptomics approach for comparing BcVEL1- and BcLAE1-dependent gene expression pattern was performed by using young, conidia-derived cultures of the wild type and the deletion mutants. The growth medium made from concentrated grape juice was previously shown to be well-suited to induce SM-related genes, such as the BOA and BOT genes, and also genes for which usually no or very low expression levels were found under axenic conditions (Simon et al. 2013) (data not shown). The comparative approach revealed that BcVEL1 and BcLAE1 have common and distinct target genes. Sixteen genes encoding SM-KE were differentially affected in at least one deletion mutant. To date, only two gene clusters (BOA, BOT) have been linked to the corresponding metabolites. The concomitant reduced production of these two toxins under some growth conditions (here grape juice medium) could contribute to the reduced virulence of the *bc1ae1* and *bcvel1* mutants, as it is the case for the previously characterized *bcbot2/bcboa6* double mutants (Dalmais et al. 2011). Another KE-encoding gene underexpressed in both mutants is *bcpk12*, which was recently considered as a candidate gene for melanin synthesis during sclerotial development (Schumacher et al. 2014). De-regulation of this gene could be linked to the fact that the mutants do not form sclerotia. The expression of the alternative melanogenic gene, *bcpk13*, that is likely responsible for conidial pigmentation was not affected in the mutants, but this is probably due to growth conditions. Indeed, the 48-h-old mycelia grown on grape juice medium was almost white. In contrast, during growth on solid CM medium in constant light, BcVEL1 and BcLAE1 repress *bcpk13* expression as previously described for BcVEL1 (Schumacher et al. 2012, 2013).

Furthermore, the microarray approach allowed for identifying the borders of further clusters of coregulated genes. Most of these new *B. cinerea* gene clusters (*bcpk5/bcnrps7*, *bcpk4/bcnrps8*, *bcpk7*) or isolated KE-encoding genes (*bcstc4*, *bcpk19*, *bcpk20*) are not present in the genome of *S. sclerotiorum* nor in other fungal species, suggesting that *B. cinerea* produces many specific compounds that remain to be identified. Some of the gene clusters dependent on one or both BcVEL1 and BcLAE1 (BOA, *bcpk5/bcnrps7*, *bcnrps1*, *bcpk12*) include a TF-encoding gene that may contribute to the specific regulation of the adjacent genes. Moreover, under the

Table 3. Gene set enrichment analysis (GSEA) of $\Delta bcvel1$ - and $\Delta bc1ae1$ -dependent genes^a

Name of gene set (size)	Normalized enrichment score		
	$\Delta bcvel1$	$\Delta bc1ae1$	
	Underexpressed	Underexpressed	Overexpressed
Secondary metabolism gene clusters (289)	1.90 (<10 ⁻³)	2.02 (<10 ⁻³)	n/s
Secondary metabolism key enzymes (44)	1.66 (<10 ⁻³)	1.65 (<10 ⁻³)	n/s
Early secretome (227)	1.85 (<10 ⁻³)	1.97 (<10 ⁻³)	n/s
Carbohydrate-active enzymes (388)	1.61 (<10 ⁻³)	1.63 (<10 ⁻³)	n/s
Proteases (377)	1.59 (<10 ⁻³)	1.41 (<10 ⁻³)	n/s
Oxidative stress response (OSR) (103)	n/s	1.84 (<10 ⁻³)	n/s
Transporters (393)	n/s	n/s	1.56 (<10 ⁻³)

^a Gene sets were previously defined by Amselem et al. (2011), Espino et al. (2010), and Schumacher et al. (2014). The GSEA toolkit was used to determine whether gene sets show statistically significant concordant differences due to deletion of either *bcvel1* or *bc1ae1*. Normalized enrichment score and *P* values (in brackets) are indicated for cases where *P* values < 0.05; n/s = not specified, *P* value > 0.05.

same growth conditions (grape juice medium), several of the clusters were also shown to be dependent on one or both BcLTF1 (data not shown) and BcYOH1, a C2H2-TF that acts as a global transcriptional regulator (Simon et al. 2013). Therefore, metabolite production by *B. cinerea* depends, as in other fungal systems (Brakhage 2013), on several global regulatory proteins, including those of the VELVET complex and globally active TF, and pathway-specific TF.

In conclusion, this study provides evidence for overlapping and distinct roles of BcVEL1 and BcLAE1 in light-dependent differentiation and virulence of the gray mold fungus. The loss of both genes decouples conidiation from light control that is accompanied by the absence of sclerotial development. Due to the lack of sclerotia that act as female-parent in sexual reproduction, both deletion mutants are female-sterile, but they are able to reproduce sexually via acting as the male parent. Both BcVEL1 and BcLAE1 have a strong impact on the expression of SM-related genes including those involved in phytotoxin biosynthesis and on secreted enzymes and are therefore required for necrotrophic development.

MATERIALS AND METHODS

Cultivation of *B. cinerea* strains.

Strain B05.10 of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. is an isolate from *Vitis vinifera*, its genome sequence is available (Broad Institute database) (Amselem et al. 2011; Staats and van Kan 2012) and is used in this study as the recipient strain for genetic modifications (Table 1). Strains were cultivated in petri dishes containing solid synthetic CM (Pontecorvo et al. 1953) or modified CD as minimal medium (2% sucrose, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% KCl, 0.05% MgSO₄·7H₂O, pH 5.0) containing either 0.3% NaNO₃ (CD-NO3) or 0.1% (NH₄)₂SO₄ (CD-NH4) as nitrogen source. Acidification of the culture medium (solid CM, pH 8) was monitored using the pH indicator bromothymol blue (0.1%) (Sigma-Aldrich). Cultures were incubated at 20°C under white light (LD or LL) for conidiation, and in continuous darkness for induction of sclerotial formation. White light (9000 lx at culture level) was generated by using a set of Sylvania Standard F18W/29-530 'warm white' and F36W/33-640 'cool white' fluorescent bulbs. Crosses using SAS405 (*MAT1-2*) as reference strain were performed according to Faretra and Antonacci (1987). For DNA and RNA isolation, mycelia were grown on solid CM medium with cellophane overlays.

Standard molecular methods.

Fungal genomic DNA was prepared according to Cenis (1992). Total RNA was isolated, making use of the TRIzol reagent (Invitrogen). For Northern blot analyses, samples (25 µg) of total RNA were transferred to Hybond-N+ membranes after electrophoresis on a 1% (wt/vol) agarose gel containing formaldehyde, according to the method of Sambrook et al. (1989). For Southern blot analysis, fungal genomic DNA was digested with restriction enzymes (Fermentas), was separated on 1% (wt/vol) agarose gels, and was transferred to Amersham Hybond-N+ filters (GE Healthcare Ltd.). Blot hybridizations with random-primed α-³²P-dCTP-labeled probes were performed as described previously (Siewers et al. 2004). PCR reactions were performed using the high-fidelity DNA polymerase Phusion (Finnzymes) for cloning purposes and the BioTherm Taq DNA Polymerase (GeneCraft) for diagnostic applications. All primers that have been used in this study for cloning, diagnostic PCR analyses, sequencing, and qRT-PCR analyses are listed in Supplementary Table S1. Replacement fragments and expression vectors were assembled in *Saccharomyces cerevisiae* by exploiting its homologous recombination machinery (Colot et al. 2006; Schumacher 2012). Sequencing of DNA fragments was performed with the

Big Dye Terminator v3.1 sequencing kit (Applied Biosystems) in an ABI Prism capillary sequencer (model 3730; Applied Biosystems). For sequence analysis, the software package DNASTar was used. Protocols for protoplast formation and transformation of *B. cinerea* were described previously (Schumacher 2012). Resistant colonies were transferred to solid CM supplemented with hygromycin B (Invitrogen) or nourseothricin (Werner-Bioagents) in a concentration of 70 µg/ml.

Construction of *bclae1* mutants.

For generation of a *bclae1* replacement fragment, the 5' (0.845 kb) and 3' noncoding regions (1.017 kb) of *bclae1* were amplified using primers *bclae1*-5F and *bclae1*-5R and *bclae1*-3F and *bclae1*-3R and were assembled with a nourseothricin resistance (*natR*) cassette (*P_{trpC}::nat1*, amplified with primers *hph*-F and *hphR-trpC*-T2, using pZPnat1 as template) by yeast recombinational cloning, yielding plasmid pΔ*bclae1*-*natR*. The replacement fragment (2.974 kb) was amplified with primers *bclae1*-5F and *bclae1*-3R and was transformed into *B. cinerea* B05.10. Homologous integration events in nourseothricin-resistant transformants were detected by diagnostic PCR using the primers *nat1*-hiF and *trpC*-P binding in the *natR* cassette, and the primers *bclae1*-HI-F and *bclae1*-HI-R binding upstream and downstream of the *bclae1*-flanking regions, respectively. Single spore isolates were screened for the absence of *bclae1* alleles using primers *bclae1*-F2 and *bclae1*-R2, matching the substituted coding region. For Southern blot analysis, genomic DNA of the mutants (Δ*bclae1*-T3 and Δ*bclae1*-T5) and the recipient strain B05.10 was digested with *EcoRV*, and the blot was hybridized with the 5' flank of the replacement fragment. The loss of a restriction site within *bclae1* results in larger hybridizing fragments in the replacement mutants (4.4 kb) than in the wild type (1.6 kb). Complementation of the deletion mutant Δ*bclae1*-T3 was accomplished by targeted integration of *bclae1* at the native gene locus, resulting in the replacement of the *natR* cassette. The vector pΔ*bclae1*^{CIL}-*hygR* was generated in yeast by cotransformation of pRS426/*EcoRI*+*XhoI*, the 5'-flank + *bclae1* (primers *bclae1*-5F and *bclae1*-T*gluc*-R), T*gluc* (primers T*gluc*-F2 and T*gluc*-*natR*), the hygromycin resistance cassette (*P_{trpC}::hph*) from pCSN44 (primers *hph*-F and *hph*-R), and the *bclae1* 3'-flank (primers *bclae1*-3F and *bclae1*-3R). Targeted integration of the construct and, thereby, the restoration of the 5' region of *bclae1* was verified in two hygromycin-resistant transformants (Δ*bclae1*^{CIL}-T1, Δ*bclae1*^{CIL}-T3) by using primer combinations *bclae1*-hi5F and *bclae1*-R4 and *bclae1*-hi3R and *hph*-hiR (data not shown). For overexpressing *bclae1*, the ORF was amplified with primers *bclae1*-PoliC-F and *bclae1*-T*gluc*-R and was assembled with the *NcoI*+*NotI*-digested plasmid pNDH-OGG (Schumacher 2012) in yeast, yielding pNDH-PoliC::*bclae1*. The vector contains sequences for targeted integration at *bcn1aD* (locus of the nitrate reductase), a *hygR* cassette, and the expression cassette with *bclae1* under control of the constitutive *oliC* promoter from *A. nidulans*. The construct was transformed into B05.10. Targeted integration at *bcn1aD*-5' was detected in hygromycin-resistant transformants OE::*bclae1*-T6, OE::*bclae1*-T7, and OE::*bclae1*-T8 by diagnostic PCR using primers *bcn1aD*-hi5F and T*gluc*-hiF (data not shown). Overexpression of *bclae1* in the respective transformants was confirmed by Northern blot analyses (Fig. 2A) (data not shown).

Localization studies.

To determine the subcellular localization of BcVEL1, BcVEL2, and BcLAE1, the genes were fused to *gfp* and were expressed in different genomic backgrounds, i.e., in WT: B05.10, Δ*bcvel1*-T22, and Δ*bclae1*-T3 (Table 1). For vector

construction, the genes were amplified using primers with overlaps to *PoliC* and *Tgluc*, and amplicons were assembled with *NcoI*-digested plasmids pNAH-OGG or pNAN-OGG (Schumacher 2012) containing a *hygR* and a *natR* cassette, respectively. Targeted integration of the constructs at *bcniiA* was confirmed by diagnostic PCR, using primer combinations *bcniiA*-hi5F and *Tgluc*-hiF, *bcniiA*-hi3R and *hph*-hiF, or *bcniiA*-hi3R and *nat1*-hiF (data not shown). For microscopy, conidia of two transformants per fusion construct were suspended in Gamborg B5 solution supplemented with 2% glucose and 0.02% ammonium phosphate and were incubated overnight on microscope slides. Nuclei were stained using the fluorescent dye Hoechst 33342 as described previously (Schumacher 2012). Fluorescence and light microscopy was performed with a Zeiss AxioImager.M1 microscope equipped with the ApoTome.2 technology for optical sectioning with structured illumination. Differential interference microscopy was used for bright-field images. Specimens stained by Hoechst 33342 were examined using the filter set 49 4',6-diamidino-2-phenylindole shift free (excitation G 365, beam splitter FT 395, emission BP 445/50) and GFP fluorescence using filter set 38 (excitation BP 470/40, beam splitter FT 495, emission BP 525/50). Images were captured with an AxioCam MRm camera and were analyzed using the Axiovision Rel 4.8 software package (Zeiss). GFP signals in the generated mutants colocalized with the Hoechst staining patterns, indicating that BcVEL1^{B05.10}, BcVEL2, and BcLAE1 accumulated in the nuclei in the different genetic backgrounds, i.e., in wild-type B05.10, *Δbcvell*, and *Δbclae1* (data not shown). Expression of BcLAE1-GFP in the *Δbclae1* background restored the formation of sclerotia in the dark and the acidification of the culture medium (data not shown), demonstrating the functionality of the BcLAE1-GFP fusion protein.

Construction of *bcfluG* mutants.

The replacement construct *ΔbcfluG*-*hygR* was generated by integrating the 5' (1.425 kb) and 3' noncoding (0.357 kb) regions of *bcfluG* and the *hygR* cassette from pCSN44 (*PtpC*::*hph*) in pRS426. The replacement fragment (3.218 kb) was amplified by PCR, using primers *bcfluG*-5F and *bcfluG*-3R, and were transformed in B05.10, yielding 10 hygromycin-resistant transformants. Two transformants that have undergone homologous integration (detected by diagnostic PCR as described above) were purified by two consecutive rounds of single-spore isolation. Homokaryotic mutants (*ΔbcfluG*-T1, *ΔbcfluG*-T8) were subjected to Southern blot analysis to rule out further ectopic integration events. For that, genomic DNA was digested with *SacI* and was blotted and hybridized with the 5' flank of *bcfluG*. As expected, single hybridizing fragments were obtained in all strains. The shift of the fragment sizes is due to the loss of *SacI* restriction sites in the replacement mutants. For generation of mutants overexpressing *bcfluG*, the ORF was amplified with primers *bcfluG*-*PoliC*-F and *bcfluG*-*Tgluc*-R and was assembled with the *NcoI*+*NotI*-digested plasmid pNDN-OGG (Schumacher 2012), yielding pNDN-*PoliC*::*bcfluG*. The construct was transformed into B05.10 yielding eight nourseothricin-resistant transformants. Targeted integration at *bcniaD* was detected in transformants OE::*bcfluG*-T2, OE::*bcfluG*-T6, and OE::*bcfluG*-T8 by diagnostic PCR, using primers *bcniaD*-hi5F and *Tgluc*-hiF and *bcniaD*-hi3R and *nat1*-hiF (data not shown). Overexpression of *bcfluG* in the respective transformants was confirmed by Northern blot analyses (data not shown).

Protein-protein interaction studies.

Protein-protein interaction assays were performed according to the standard yeast two-hybrid method established by Fields

and Song (1989). Proteins of interest were fused to Gal4-activation and DNA-binding domains in vectors pAD-GAL4-2.1 and pBD-GAL4-Cam (Stratagene Corp.), respectively, and were expressed in *Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4A (James et al. 1996). For vector cloning, genes of interest were amplified with primers containing overlaps with the Gal4-activation domain (AD-F, AD-R) or the Gal4-binding domain (BD-F, BD-R), using cDNA as template. Amplicons were cotransformed with *SallI*-digested plasmids pAD-GAL4-2.1 (selection for leucine prototrophy) or pBD-GAL4-Cam (selection for tryptophan prototrophy) in yeast strain PJ69-4A. Assembled vectors were isolated and transformed into *Escherichia coli* for amplification and sequencing. For interaction assays, *Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4A was cotransformed with pAD-GAL4-2.1 and pBD-GAL4-Cam vectors according to a modified protocol of the lithium acetate method (Gietz et al. 1995). Selection took place on synthetic defined medium without leucine and tryptophan (SD-LW) for obtaining strains with both vectors. For drop tests, the strains were grown overnight in 5 ml of liquid SD-LW and were adjusted to an optical density at 600 nm of 1. Cells were starved in 1 M sorbitol for 5 h at 30°C and dilutions of 1:10 were prepared. Ten-microliter droplets were spotted on solid SD-LW+X-Gal and SD-LWH+3-AT (3-amino-1,2,4-triazole) media. Petri dishes were incubated for 3 days at 30°C.

Virulence assays.

For infection assays on French bean (*Phaseolus vulgaris* cv. 90598), primary leaves of living plants were inoculated with 7.5- μ l droplets of conidial suspensions (2×10^5 conidia per milliliter of Gamborg B5 + 2% glucose) or undifferentiated mycelia (plugs from 3-day-old cultures on solid CM). Infected plants were incubated in plastic boxes at 22°C under natural illumination (daylight/night) conditions. Grape berries (*Vitis vinifera*) were inoculated with 10- μ l droplets of conidial suspensions (5×10^5 conidia per milliliter of potato dextrose broth). Infected berries were incubated in plastic boxes at 16°C under natural illumination conditions.

Microarrays analyses.

Conidial suspensions from wild-type B05.10 and mutant strains *Δbcvell* and *Δbclae1* were spread onto solid grape juice medium (pH adjusted to 4; 3×10^6 conidia/plate) with cellophane overlays as described by Simon et al. (2013). The plates were incubated for 48 h at 23°C with an alternation of 10 h of white light (fluorescent tubes OSRAM L 36W/640) and 14 h of darkness in an environmental chamber (Sanyo MLR-350H). RNA from four biological replicates was extracted according to the total RNA isolation protocol described by Reid et al. (2006) but with 10 M rather than 8 M LiCl and was resuspended in RNase/DNase-free water. The total RNA was then treated with the DNA-free kit (Ambion and Applied Biosystems) to remove any trace of DNA. Synthesis of double-stranded cDNA, Cy3-labeling, and hybridization of microarrays were done at PartnerChip (Evry, France), using the procedures established by NimbleGen (Roche) and reagents from Invitrogen (Life technologies). To study the complete transcriptome of *B. cinerea*, NimbleGen 4-plex arrays with 62,478 60 mer-specific probes covering all the 20,885 predicted gene models and nonmapping expressed sequence tags (EST) of *B. cinerea* (Amselem et al. 2011) were used. The arrays also include 9,559 random probes as negative controls. Data processing, quality controls, and differential expression analysis were performed using ANAIS methods (Simon and Biot 2010). Genes whose intensity is over the threshold (1.5×95 th percentile of random probes) in at least one hybridization were considered expressed and were kept for further analyses. Genes with a corrected *P* value < 0.05 and more than a twofold change in transcript level (either in

Δbcv11 or *Δbclae1* compared with the wild type) were considered as significantly DE. BlastN analyses for the 20,885 spotted genes (Amselem et al. 2011) (URGI database) were performed to identify the matching gene models derived from the resequencing approaches by Staats and van Kan (2012) (Broad Institute). By this, the number of DE genes was reduced, because incorrect gene models derived from discontinuous sequences were revised and, furthermore, previously non-matching EST could be mapped. Cluster analyses were performed to highlight expression profiles for the DE genes. For this purpose, the log₂-normalized intensities scaled by gene across the 12 hybridizations were clustered using Genesis tools (Sturn et al. 2002). Gene enrichment analyses were further performed with the GSEA toolkit (Mootha et al. 2003; Subramanian et al. 2005, 2007) to highlight significantly enriched functions in DE genes compared with the complete list of functionally annotated *B. cinerea* genes (Amselem et al. 2011). Details on the experiments, raw, and normalized values are available at NCBI Gene Expression Omnibus (accession number GSE63021). Furthermore, lists of DE genes are available in the URGI database.

qRT-PCR analyses.

Triplicate cultures of wild-type B05.10 and *Δbclae1*, OE:: *bclae1*, *Δbcv11*, and OE:: *bcv11* mutants and the corresponding DNA-free RNA preparations were conducted as described for the microarray analysis. cDNA were obtained from 1,100 ng of total RNA by a retrotranscription step realized with M-MLV (Invitrogen) reverse transcription, according to the manufacturer's suggestions except that both oligo(dT) (25 ng/μl) and random primers (25 ng/μl) were used. The RT-qPCR reactions were performed on 1:10 diluted cDNA using MESA Green qPCR Mastermix Plus for SYBR Assay (Eurogentec) and the CFX96 Touch real-time PCR detection system (Bio-Rad). 'No Reverse Transcription' controls were realized once on cDNA samples and 'No Template Control' were made for each pair of primers in every run. The qRT-PCR program consisted of a preliminary 5-min denaturation step at 95°C, followed by 40 amplification cycles of 15 s of denaturation (95°C) and 1 min of annealing and extension (60°C). Analysis of the melting curves (increment of 0.1°C/min) of the final PCR products indicated the absence of contamination and primer dimers. The data were analyzed with CFX Manager Software (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Efficiency reactions of the pairs of primers were tested once on the cDNA sample and were all superior to 92%. Gene expression levels were calculated following the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen 2001), using the real efficiency of the primers and the constitutively expressed actin gene (*bcact1*) as a reference. Wild-type B05.10 was used as control.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank B. Richter and J. Espino (WVU Münster) for their help in mutant screens, P. Le Pêcheur (INRA Grignon, France) for pathotests on grape berries, and S. Baulande and M. Duthieuw (PartnerChip, Evry, France) for the hybridization of the NimbleGen arrays.

LITERATURE CITED

Adams, T. H., Boylan, M. T., and Timberlake, W. E. 1988. *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 54:353-362.

Aghcheh, R. K., Druzhinina, I. S., and Kubicek, C. P. 2013. The putative protein methyltransferase LAE1 of *Trichoderma atroviride* is a key regulator of asexual development and mycoparasitism. *PLoS ONE* 8:e67144.

Ahmed, Y. L., Gerke, J., Park, H. S., Bayram, Ö., Neumann, P., Ni, M., Dickmanns, A., Kim, S. C., Yu, J. H., Braus, G. H., and Ficner, R. 2013. The velvet family of fungal regulators contains a DNA-binding domain structurally similar to NF-κB. *PLoS Biol.* 11:e1001750.

Amselem, J., Cuomo, C. A., van Kan, J. A., Viaud, M., Benito, E. P., Couloux, A., Coutinho, P. M., de Vries, R. P., Dyer, P. S., Fillinger, S., Fournier, E., Gout, L., Hahn, M., Kohn, L., Lapalu, N., Plummer, K. M., Pradier, J. M., Quévillon, E., Sharon, A., Simon, A., ten Have, A., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Wincker, P., Andrew, M., Anthonard, V., Beever, R. E., Beffa, R., Benoit, I., Bouzid, O., Brault, B., Chen, Z., Choquer, M., Collémare, J., Cotton, P., Danchin, E. G., Da Silva, C., Gautier, A., Giraud, C., Giraud, T., Gonzalez, C., Grossetete, S., Güldener, U., Henrissat, B., Howlett, B. J., Kodira, C., Kretschmer, M., Lappartient, A., Leroch, M., Levis, C., Mauceli, E., Neuveglise, C., Oeser, B., Pearson, M., Poulain, J., Poussereau, N., Quesneville, H., Rasclé, C., Schumacher, J., Ségurens, B., Sexton, A., Silva, E., Sirven, C., Soanes, D. M., Talbot, N. J., Templeton, M., Yandava, C., Yarden, O., Zeng, Q., Rollins, J. A., Lebrun, M. H., and Dickman, M. 2011. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genet.* 7:e1002230.

Bailey, L. A., and Ebbole, D. J. 1998. The fluffy gene of *Neurospora crassa* encodes a Gal4p-type C6 zinc cluster protein required for conidial development. *Genetics* 148:1813-1820.

Bayram, O., and Braus, G. H. 2012. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: The velvet family of regulatory proteins. *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Rev.* 36:1-24.

Bayram, O., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J. W., Helmstaedt, K., Valerius, O., Braus-Stromeyer, S., Kwon, N. J., Keller, N. P., Yu, J. H., and Braus, G. H. 2008. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 320:1504-1506.

Bok, J. W., and Keller, N. P. 2004. LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot. Cell* 3:527-535.

Bok, J. W., Balajee, S. A., Marr, K. A., Andes, D., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C., and Keller, N. P. 2005. LaeA, a regulator of morphogenetic fungal virulence factors. *Eukaryot. Cell* 4:1574-1582.

Brakhage, A. A. 2013. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.* 11:21-32.

Campbell, M. A., Rokas, A., and Slot, J. C. 2012. Horizontal transfer and death of a fungal secondary metabolic gene cluster. *Genome Biol. Evol.* 4:289-293.

Canessa, P., Schumacher, J., Hevia, M. A., Tudzynski, P., and Larrondo, L. F. 2013. Assessing the effects of light on differentiation and virulence of the plant pathogen *Botrytis cinerea*: Characterization of the white collar complex. *PLoS ONE* 8:e84223.

Cenis, J. L. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Res.* 20:2380.

Chang, P. K., Scharfenstein, L. L., Mack, B., and Ehrlich, K. C. 2012. Deletion of the *Aspergillus flavus* orthologue of *A. nidulans* fluG reduces conidiation and promotes production of sclerotia but does not abolish aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:7557-7563.

Chang, P. K., Scharfenstein, L. L., Li, P., and Ehrlich, K. C. 2013. *Aspergillus flavus* VelB acts distinctly from VeA in conidiation and may coordinate with FluG to modulate sclerotial production. *Fungal Genet. Biol.* 58-59:71-79.

Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J. M., Simon, A., and Viaud, M. 2007. *Botrytis cinerea* virulence factors: New insights into a necrotrophic and polyphagous pathogen. *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Lett.* 277:1-10.

Collado, I. G., Sánchez, A. J., and Hanson, J. R. 2007. Fungal terpene metabolites: Biosynthetic relationships and the control of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Nat. Prod. Rep.* 24:674-686.

Colot, H. V., Park, G., Turner, G. E., Ringelberg, C., Crew, C. M., Litvinkova, L., Weiss, R. L., Borkovich, K. A., and Dunlap, J. C. 2006. A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:10352-10357.

D'Souza, C. A., Lee, B. N., and Adams, T. H. 2001. Characterization of the role of the FluG protein in asexual development of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 158:1027-1036.

Dalmats, B., Schumacher, J., Moraga, J., Le Pêcheur, P., Tudzynski, B., Collado, I. G., and Viaud, M. 2011. The *Botrytis cinerea* phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. *Mol. Plant Pathol.* 12:564-579.

Doss, R. P., Deisenhofer, J., Krug von Nidda, H. A., Soeldner, A. H., and McGuire, R. P. 2003. Melanin in the extracellular matrix of germlings of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 63:687-691.

Epton, H. A. S., and Richmond, D. V. 1980. Formation, structures and germination of conidia. Pages 41-83 in *The Biology of Botrytis cinerea*. J. R. Coley-Smith, K. Verhoeff, and W. R. Jarvis, eds. Academic Press, London.

Espino, J. J., Gutiérrez-Sánchez, G., Brito, N., Shah, P., Orlando, R., and González, C. 2010. The *Botrytis cinerea* early secretome. *Proteomics* 10:3020-3034.

- Faretra, F., and Antonacci, E. 1987. Production of apothecia of *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz under controlled environmental conditions. *Phytopathol. Mediterr.* 26:29-35.
- Faretra, F., Antonacci, E., and Pollastro, S. 1988. Sexual behaviour and mating system of *Botryotinia fuckeliana*, teleomorph of *Botrytis cinerea*. *J. Gen. Microbiol.* 134:2543-2550.
- Fields, S., and Song, O. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340:245-246.
- Gao, Q., and Garcia-Pichel, F. 2011. Microbial ultraviolet sunscreens. *Nat. Rev. Microbiol.* 9:791-802.
- Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R., and Woods, R. A. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11:355-360.
- Godoy, G., Steadman, J. R., Dickman, M. B., and Dam, R. 1990. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 37:179-191.
- Han, Y., Joosten, H. J., Niu, W., Zhao, Z., Mariano, P. S., McCalman, M., van Kan, J., Schaap, P. J., and Dunaway-Mariano, D. 2007. Oxaloacetate hydrolase, the C-C bond lyase of oxalate secreting fungi. *J. Biol. Chem.* 282:9581-9590.
- Hoff, B., Kamerewerd, J., Sigl, C., Mitterbauer, R., Zadra, I., Kürnsteiner, H., and Kück, U. 2010. Two components of a velvet-like complex control hyphal morphogenesis, conidiophore development, and penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Eukaryot. Cell* 9:1236-1250.
- Hoffmeister, D., and Keller, N. P. 2007. Natural products of filamentous fungi: Enzymes, genes, and their regulation. *Nat. Prod. Rep.* 24:393-416.
- James, P., Halladay, J., and Craig, E. A. 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144:1425-1436.
- Kim, H. J., Han, J. H., Kim, K. S., and Lee, Y. H. 2014. Comparative functional analysis of the velvet gene family reveals unique roles in fungal development and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* 66:33-43.
- Kroken, S., Glass, N. L., Taylor, J. W., Yoder, O. C., and Turgeon, B. G. 2003. Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:15670-15675.
- Lee, B. N., and Adams, T. H. 1994. The *Aspergillus nidulans flug* gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamine synthetase I. *Genes Dev.* 8:641-651.
- Liang, X., Liberti, D., Li, M., Kim, Y. T., Hutchens, A., Wilson, R., and Rollins, J. A. 2014. Oxaloacetate acetylhydrolase gene mutants of *Sclerotinia sclerotiorum* do not accumulate oxalic acid, but do produce limited lesions on host plants. *Mol. Plant Pathol.* 10.1111/mpp.12211. Published online.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Massaroli, M., Moraga, J., Bastos Borges, K., Ramírez-Fernández, J., Viaud, M., González Collado, I., Durán-Patrón, R., and Hernández-Galán, R. 2013. A shared biosynthetic pathway for botcinins and botrylactones revealed through gene deletions. *ChemBioChem* 14:132-136.
- Mootha, V. K., Lindgren, C. M., Eriksson, K. F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstråle, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M. J., Patterson, N., Mesirov, J. P., Golub, T. R., Tamayo, P., Spiegelman, B., Lander, E. S., Hirschhorn, J. N., Altshuler, D., and Groop, L. C. 2003. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* 34:267-273.
- Olmedo, M., Ruger-Herreros, C., and Corrochano, L. M. 2010. Regulation by blue light of the fluffy gene encoding a major regulator of conidiation in *Neurospora crassa*. *Genetics* 184:651-658.
- Oritani, T., and Kiyota, H. 2003. Biosynthesis and metabolism of abscisic acid and related compounds. *Nat. Prod. Rep.* 20:414-425.
- Palmer, J. M., Theisen, J. M., Duran, R. M., Grayburn, W. S., Calvo, A. M., and Keller, N. P. 2013. Secondary metabolism and development is mediated by LlmF control of VeA subcellular localization in *Aspergillus nidulans*. *PLoS Genet.* 9:e1003193.
- Park, H. S., Nam, T. Y., Han, K. H., Kim, S. C., and Yu, J. H. 2014. VelC positively controls sexual development in *Aspergillus nidulans*. *PLoS ONE* 9:e89883.
- Paul, W. R. C. 1929. A comparative morphological and physiological study of a number of strains of *Botrytis cinerea* Pers. with special reference to their virulence. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 14:118-134.
- Pinedo, C., Wang, C. M., Pradier, J. M., Dalmais, B., Choquer, M., Le Pêcheur, P., Morgant, G., Collado, I. G., Cane, D. E., and Viaud, M. 2008. Sesquiterpene synthase from the botrydial biosynthetic gene cluster of the phytopathogen *Botrytis cinerea*. *ACS Chem. Biol.* 3:791-801.
- Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, L. M., MacDonald, K. D., and Bufton, A. W. J. 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* 5:141-238.
- Purschwitz, J., Müller, S., Kastner, C., Schöser, M., Haas, H., Espeso, E. A., Atoui, A., Calvo, A. M., and Fischer, R. 2008. Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Biol.* 18:255-259.
- Quidde, T., Osbourn, A. E., and Tudzynski, P. 1998. Detoxification of alpha-tomatine by *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 52:151-165.
- Reid, K. E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F., and Lund, S. T. 2006. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biol.* 6:27.
- Reino, J. L., Hernandez-Galan, R., Duran-Patron, R., and Collado, I. G. 2004. Virulence-toxin production relationship in isolates of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *J. Phytopathol.* 152:563-566.
- Rossi, F. R., Gárriz, A., Marina, M., Romero, F. M., Gonzalez, M. E., Collado, I. G., and Pieckenstein, F. L. 2011. The sesquiterpene botrydial produced by *Botrytis cinerea* induces the hypersensitive response on plant tissues and its action is modulated by salicylic acid and jasmonic acid signaling. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24:888-896.
- Ruger-Herreros, C., Rodríguez-Romero, J., Fernández-Barranco, R., Olmedo, M., Fischer, R., Corrochano, L. M., and Canovas, D. 2011. Regulation of conidiation by light in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 188:809-822.
- Saikia, S., Nicholson, M. J., Young, C., Parker, E. J., and Scott, B. 2008. The genetic basis for indole-diterpene chemical diversity in filamentous fungi. *Mycol. Res.* 112, Pt 2:184-199.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A..
- Schumacher, J. 2012. Tools for *Botrytis cinerea*: New expression vectors make the gray mold fungus more accessible to cell biology approaches. *Fungal Genet. Biol.* 49:483-497.
- Schumacher, J., Pradier, J. M., Simon, A., Traeger, S., Moraga, J., Collado, I. G., Viaud, M., and Tudzynski, B. 2012. Natural variation in the VELVET gene *bceV11* affects virulence and light-dependent differentiation in *Botrytis cinerea*. *PLoS ONE* 7:e47840.
- Schumacher, J., Gautier, A., Morgant, G., Studd, L., Ducrot, P. H., Le Pêcheur, P., Azeddine, S., Fillinger, S., Leroux, P., Tudzynski, B., and Viaud, M. 2013. A functional bikaverin biosynthesis gene cluster in rare strains of *Botrytis cinerea* is positively controlled by VELVET. *PLoS ONE* 8:e53729.
- Schumacher, J., Simon, A., Cohrs, K. C., Viaud, M., and Tudzynski, P. 2014. The transcription factor BcLTF1 regulates virulence and light responses in the necrotrophic plant pathogen *Botrytis cinerea*. *PLoS Genet.* 10:e1004040.
- Siewers, V., Smedsgaard, J., and Tudzynski, P. 2004. The P450 monooxygenase BcABA1 is essential for abscisic acid biosynthesis in *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3868-3876.
- Siewers, V., Viaud, M., Jimenez-Teja, D., Collado, I. G., Gronover, C. S., Pradier, J. M., Tudzynski, B., and Tudzynski, P. 2005. Functional analysis of the cytochrome P450 monooxygenase gene *bcbot1* of *Botrytis cinerea* indicates that botrydial is a strain-specific virulence factor. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18:602-612.
- Siewers, V., Kokkelink, L., Smedsgaard, J., and Tudzynski, P. 2006. Identification of an abscisic acid gene cluster in the grey mold *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4619-4626.
- Simon, A., and Biot, E. 2010. ANAIS: Analysis of NimbleGen arrays interface. *Bioinformatics* 26:2468-2469.
- Simon, A., Dalmais, B., Morgant, G., and Viaud, M. 2013. Screening of a *Botrytis cinerea* one-hybrid library reveals a Cys₂His₂ transcription factor involved in the regulation of secondary metabolism gene clusters. *Fungal Genet. Biol.* 52:9-19.
- Staats, M., and van Kan, J. A. 2012. Genome update of *Botrytis cinerea* strains B05.10 and T4. *Eukaryot. Cell* 11:1413-1414.
- Stefanato, F. L., Abou-Mansour, E., van Kan, J., Metraux, J. P., and Schoonbeek, H. J. 2008. Oxaloacetate acetylhydrolase is responsible for oxalic acid production in *Botrytis cinerea* and required for lesion expansion on some, but not on most host plants. Page 24 in: 3rd Botrytis Genome Workshop, Third Session, Pathogenicity, Tenerife, Spain. <http://botrytis.webs.ull.es/BookAbst.pdf>. Published online.
- Stewart, T. M., and Long, P. G. 1987. Sporulation of *Botrytis cinerea* in the dark. *N. Zeal. J. Exp. Agricul.* 15:389-392.
- Stinnett, S. M., Espeso, E. A., Cobeno, L., Araújo-Bazán, L., and Calvo, A. M. 2007. *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is

- dependent on the importin alpha carrier and on light. *Mol. Microbiol.* 63: 242-255.
- Sturn, A., Quackenbush, J., and Trajanoski, Z. 2002. Genesis: Cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* 18:207-208.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., and Mesirov, J. P. 2005. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:15545-15550.
- Subramanian, A., Kuehn, H., Gould, J., Tamayo, P., and Mesirov, J. P. 2007. GSEA-P: A desktop application for gene set enrichment analysis. *Bioinformatics* 23:3251-3253.
- Tani, H., Koshino, H., Sakuno, E., and Nakajima, H. 2005. Botcinins A, B, C, and D, metabolites produced by *Botrytis cinerea*, and their antifungal activity against *Magnaporthe grisea*, a pathogen of rice blast disease. *J. Nat. Prod.* 68:1768-1772.
- Tani, H., Koshino, H., Sakuno, E., Cutler, H. G., and Nakajima, H. 2006. Botcinins E and F and Botcinolide from *Botrytis cinerea* and structural revision of botcinolides. *J. Nat. Prod.* 69:722-725.
- van Kan, J. A. 2006. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci.* 11:247-253.
- Wiemann, P., and Keller, N. P. 2014. Strategies for mining fungal natural products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41:301-313.
- Wiemann, P., Willmann, A., Straeten, M., Kleigrewe, K., Beyer, M., Humpf, H. U., and Tudzynski, B. 2009. Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation. *Mol. Microbiol.* 72:931-946.
- Wiemann, P., Brown, D. W., Kleigrewe, K., Bok, J. W., Keller, N. P., Humpf, H. U., and Tudzynski, B. 2010. FfVel1 and FfLae1, components of a velvet-like complex in *Fusarium fujikuroi*, affect differentiation, secondary metabolism and virulence. *Mol. Microbiol.* 77:972-994.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., and van Kan, J. A. 2007. *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. *Mol. Plant Pathol.* 8: 561-580.
- Wu, D., Oide, S., Zhang, N., Choi, M. Y., and Turgeon, B. G. 2012. ChLae1 and ChVel1 regulate T-toxin production, virulence, oxidative stress response, and development of the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. *PLoS Pathog.* 8:e1002542.
- Yager, L. N., Lee, H. O., Nagle, D. L., and Zimmerman, J. E. 1998. Analysis of fluG mutations that affect light-dependent conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 149:1777-1786.
- Yang, Q., Chen, Y., and Ma, Z. 2013. Involvement of BcVeA and BcVelB in regulating conidiation, pigmentation and virulence in *Botrytis cinerea*. *Fungal Genet. Biol.* 50:63-71.
- Zeun, R., and Buchenauer, H. 1985. Effect of tricyclazole on production and melanin contents of sclerotia of *Botrytis cinerea*. *Phytopathol. Z.* 112:259-267.

AUTHOR-RECOMMENDED INTERNET RESOURCES

- Broad Institute *Botrytis cinerea* database:
www.broadinstitute.org/annotation/genome/botrytis_cinerea
 GSEA toolkit: www.broadinstitute.org/gsea
 NCBI Gene Expression Omnibus database: www.ncbi.nlm.nih.gov/geo
 URGI Plant and Data Integration database:
urgi.versailles.inra.fr/Data/Transcriptome

Study of the regulation mechanisms of secondary metabolism in *Botrytis cinerea*, the gray mold disease agent.

Keywords : *Botrytis cinerea*, secondary metabolism, regulation (biology), transcription factors.

Botrytis cinerea is a necrotrophic polyphagous fungus able to induce the gray mold disease on hundreds of plant species. The resulting losses are important worldwide notably on economically important crops such as tomato, strawberry or grapevine. Among the virulence factors identified in *B. cinerea* stand two non-host specific toxins: the sesquiterpene botrydial and the polyketide botcinic acid. Although their redundant role in necrotrophy has been shown, the mechanisms governing the clusters responsible for their synthesis (respectively BOT and BOA) remain unknown. In this context, the aim of my PhD project was to characterize the different mechanisms that regulate secondary metabolism in *B. cinerea*. I particularly focused on BOT and BOA clusters as well as on a third one (PKS7) which, according to the phenotype of an insertion-based mutant (T-DNA), could be involved in necrotrophy. Thanks to the newly assembled genome of the B05.10 wild type strain, a candidate gene encoding a putative transcription factor (TF) could be identified near the BOT cluster. The characterization of this gene allowed pointing out the major role of the protein (BcBot6) in the activation of *Bcbot* genes and in the subsequent botrydial production. Similarly, the characterization of *Bcboa13*, a putative TF-encoding gene present into the BOA cluster, allowed demonstrating the positive regulatory role of BcBoa13 on *Bcboa* genes. Unlike the BOT and BOA clusters, the PKS7 one does not contain any putative TF-encoding gene. In order to confirm the role of the putative metabolite produced by this cluster and to identify its chemical structure, the inactivation of the PKS-NRPS key enzyme-encoding gene (*Bcpks7*) was conducted and metabolic analyses were initiated. Finally, the presence of many RIP(Repeat-Induced Point mutations)-inactivated transposons within BOT and BOA clusters as well as the subtelomeric location of BOA and PKS7 clusters raised our interest about the role of chromatin structure on those clusters regulation. In this context, three mutants inactivated into putative chromatin modifiers encoding-genes (the histone methyltransferases BcDim-5 and BcKmt6 and the heterochromatin protein BcHp1) were generated. The expression analysis of the key genes of the BOT, BOA and PKS clusters suggests different chromatin-based mechanisms that intervene for the BOT and BOA cluster on one side and on the PKS7 cluster on another. Altogether, the results generated during this PhD project are a major contribution to the comprehension of pathway-specific as well as chromatin-based mechanisms that regulate the production of necrotrophy-involved phytotoxins by *B. cinerea*.

Etude des mécanismes de régulation du métabolisme secondaire chez *Botrytis cinerea*, l'agent de la pourriture grise.

Mots clés : *Botrytis cinerea*, métabolisme secondaire, régulation (biologie), facteurs de transcription.

Botrytis cinerea est un champignon nécrotrophe et polyphage capable de provoquer la pourriture grise sur plusieurs centaines d'espèces végétales. Les pertes engendrées par cette maladie sont importantes à travers le monde notamment sur des espèces économiquement importantes comme la tomate, la fraise ou encore la vigne. Parmi les facteurs de virulence identifiés chez *B. cinerea* se trouvent deux toxines non-hôte spécifiques. Il s'agit du sesquiterpène botrydial et du polycétide acide botcinique. Même si leur rôle redondant dans la nécrotrophie a été démontré, les mécanismes qui gouvernent l'expression des clusters responsables de leur synthèse (respectivement BOT et BOA) restent inconnus. Dans ce contexte, l'objectif de mon projet de thèse était de caractériser les différents mécanismes qui régulent le métabolisme secondaire chez *B. cinerea*. Je me suis particulièrement intéressé aux clusters BOT et BOA ainsi qu'à un troisième cluster (PKS7) qui, d'après le phénotype d'un mutant d'insertion (ADN-T), pourrait être impliqué dans la nécrotrophie. Grâce à la disponibilité du nouvel assemblage du génome de la souche modèle B05.10, un gène candidat codant un facteur de transcription (FT) putatif a pu être identifié à proximité du cluster BOT. La caractérisation de ce gène a permis de démontrer le rôle majeur de la protéine (BcBot6) dans l'activation des gènes *Bcbot* et la production subséquente de botrydial. De même, la caractérisation de *Bcboa13*, un gène codant un FT putatif présent au sein du cluster BOA, a permis de démontrer le rôle de régulateur positif de BcBoa13 envers les gènes *Bcboa*. A la différence des clusters BOT et BOA, le cluster PKS7 ne contient pas de gène codant pour un potentiel FT spécifique. Afin de confirmer le rôle du métabolite putatif produit par ce cluster et d'identifier sa structure chimique, l'inactivation du gène clé codant une PKS-NRPS (*Bcpcs7*) a été réalisée et des analyses métaboliques ont été initiées. Finalement, la présence au sein des clusters BOT et BOA de nombreux transposons ayant subi des mutations de type RIP (*Repeat-Induced Point mutations*) ainsi que la position sub-télomérique des clusters BOA et PKS7 nous a amené à nous intéresser au rôle de la structure chromatinienne dans la régulation de ces clusters. Dans ce cadre, trois mutants délétés dans des gènes codant des modificateurs chromatiniens putatifs (les histones méthyltransférases BcDim-5 et BcKmt6 et la protéine hétérochromatinienne BcHp1) ont été générés. L'expression des gènes clés des clusters BOT, BOA et PKS7 chez les mutants *Bcdim-5*, *Bchp1* et *Bckmt6* suggère que différents mécanismes chromatiniens interviennent pour le contrôle des clusters BOT et BOA d'une part et du cluster PKS7 d'autre part. L'ensemble des résultats obtenus pendant cette thèse apporte une contribution majeure à la compréhension des mécanismes de régulation spécifiques mais aussi de ceux en lien avec la structure chromatinienne de la production de métabolites phytotoxiques impliqués dans la nécrotrophie chez *B. cinerea*.