



HAL
open science

Caractérisation de la régulation MDR chez *Zymoseptoria tritici* (septoriose du blé) et diversité au champ

Simon Patry-Leclaire

► **To cite this version:**

Simon Patry-Leclaire. Caractérisation de la régulation MDR chez *Zymoseptoria tritici* (septoriose du blé) et diversité au champ. Biologie moléculaire. Université Paris-Saclay, 2024. Français. NNT : 2024UPASB020 . tel-04728562

HAL Id: tel-04728562

<https://theses.hal.science/tel-04728562v1>

Submitted on 9 Oct 2024

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.

Caractérisation de la régulation MDR chez
Zymoseptoria tritici (septoriose du blé) et diversité au
champ

*Characterization of the MDR regulation in
Zymoseptoria tritici (septoria leaf blotch of wheat) and
field diversity*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° n° 567 : Sciences du Végétal : du gène à l'écosystème (SEVE)
Spécialité de doctorat : Biologie

Thèse préparée dans l'unité de recherche **BIOGER** (Université Paris-Saclay, INRAE),
sous la direction de **Sabine FILLINGER**, Directrice de recherche (INRAE, BIOGER), et la
co-supervision de **Marc MASSON**, Directeur général (entreprise Anova-Plus)

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 18 juin 2024, par

Simon PATRY-LECLAIRE

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Marie DUFRESNE Professeure des universités, Université Paris-Saclay	Présidente
Thomas GUILLEMETTE Professeur des universités, Université d'Angers	Rapporteur & Examinateur
Guilhem JANBON Directeur de recherche, Institut Pasteur	Rapporteur & Examinateur
Florence CHAPELAND-LECLERC Professeure des universités, Université Paris-Cité	Examinatrice
Cécile LORRAIN Chef de groupe junior, ETH Zurich	Examinatrice

Title : Characterization of the MDR regulation in *Zymoseptoria tritici* (septoria leaf blotch of wheat) and field diversity

Keywords : Fungicide resistance, Membrane transporter, Efflux, Transcriptional regulation, Transposable elements, Promoter

Abstract : Fungal pathogens resistant to multiple antifungal treatments pose a major risk to human and plant health. Several studies highlight the importance of preventing the spread of multi-drug resistance (MDR), which relies, among other factors, on understanding the molecular mechanisms involved, such as transcriptional regulation. In both human and agricultural pathogens, MDR is often associated with increased efflux of antifungal molecules outside the cells. This is the case with the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*, the causal agent of septoria leaf blotch, where overexpression of the *MFS1* gene encoding a proton pump is responsible for the MDR phenotype. This overexpression is directly linked to the presence of inserts in the *MFS1* promoter (P_{MFS1}), namely inserts I, II, or III identified previously. Other inserts found in P_{MFS1} do not necessarily lead to MDR. Thus, one of the questions at the beginning of this thesis concerned the molecular mechanisms responsible for the overexpression of *MFS1* and, more broadly, for MDR in *Z. tritici*. What regulatory motifs specific to inserts I-III are necessary for the overexpression of *MFS1*? What transcription factors are involved? Are there other mechanisms besides *MFS1* overexpression? We studied contemporary MDR populations of *Z. tritici* in Europe to correlate different P_{MFS1} genotypes with observed MDR phenotypes. Our results show that: 1/ the *MFS1* promoter is a hotspot for insertion with 13 different inserts distributed over 7 loci; 2/ among the 13 inserts, 12 are likely derived from transposition events; 3/ only 6 inserts are linked to the MDR phenotype; 4/ multi-drug resistance in *Z. tritici* is not solely linked to the *MFS1* promoter; other mechanisms are involved in the MDR phenotype.

Secondly, we examined the involvement of inserts I-III and different potential regulatory motifs found in these inserts in *MFS1* overexpression using transcriptional fusions with the RFP reporter gene. The potential motifs analyzed were those stated by Omrane et al. (2017); the MCB motifs in type I inserts and the HNF3 motifs in type IIA inserts. These motifs were deleted or replaced by neutral sequences in their respective inserts to assess their role in *MFS1* overexpression. We were able to show that *MFS1* overexpression and, consequently, MDR are due to specific sequences of inserts I, II, and III. In type I inserts, MCB motifs indeed contribute to *MFS1* overexpression but are not the only cis elements involved. In type II inserts, HNF3 motifs are not responsible for *MFS1* overexpression. Other potential regulatory motifs were identified in the P_{MFS1} sequence and in inserts I-III. The P_{MFS1} -RFP transcriptional fusions constructed will allow further characterization of the molecular players involved in *MFS1* overexpression. Thus, we conclude that MDR results from several genetic mechanisms that are not solely linked to the *MFS1* promoter, and we show that the *MFS1* promoter can accommodate a multitude of inserts that may not necessarily be linked to MDR. Estimating MDR in *Z. tritici* solely based on detecting inserts in the *MFS1* promoter can lead to inaccurate estimations. We suggest conducting MDR detection and monitoring in the field through phenotypic tests. Molecular detection of MDR in the field would require exhaustive identification of the molecular mechanisms involved. The expression analysis tools and microbiological resources generated during this work pave the way for the identification of these elements

Titre : Caractérisation de la régulation MDR chez *Zymoseptoria tritici* (septoriose du blé) et diversité au champ

Mots clés : Résistance aux fongicides, Transporteur membranaire, Efflux, Régulation de la transcription, éléments transposables, Promoteur

Résumé : Les pathogènes fongiques résistants à de multiples traitements antifongiques représentent un risque majeur pour la santé humaine et végétale. Plusieurs études montrent l'importance de prévenir la généralisation de la résistance multi-drogue (MDR) qui repose entre autres sur la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués tels que la régulation de la transcription. Chez les pathogènes humains comme agricoles, la MDR est souvent liée à l'efflux accru des molécules antifongiques en dehors des cellules. C'est le cas chez le pathogène du blé *Zymoseptoria tritici* agent de la septoriose, où la surexpression du gène *MFS1* codant une pompe à protons est responsable du phénotype MDR. Cette surexpression est directement liée à la présence d'inserts dans le promoteur de *MFS1* (P_{MFS1}), les inserts I, II ou III identifiés auparavant. D'autres inserts retrouvés dans P_{MFS1} ne conduisent pas nécessairement à la MDR. Ainsi, l'une des questions au début de cette thèse concernait les mécanismes moléculaires responsables de la surexpression de *MFS1* et, plus largement, de la MDR chez *Z. tritici*. Quels motifs de régulation propres aux inserts I-III sont nécessaires à la surexpression de *MFS1* ? Quels sont les facteurs de transcription impliqués ? Existe-t-il d'autres mécanismes en dehors de la surexpression de *MFS1* ? Nous avons étudié des populations MDR contemporaines européennes de *Z. tritici* afin de corrélérer les différents génotypes de P_{MFS1} aux différents phénotypes MDR observés. Nos résultats montrent que 1/ le promoteur de *MFS1* est un hot-spot d'insertion avec 13 inserts différents répartis sur 7 loci ; 2/ parmi les 13 inserts, 12 seraient issus d'événements de transposition ; 3/ seuls 6 inserts sont liés au phénotype MDR ; 4/ la résistance multi-drogue chez *Z. tritici* n'est pas uniquement liée au promoteur de *MFS1* ; d'autres mécanismes sont impliqués dans le phénotype MDR. Dans un second temps, nous avons examiné l'implication des inserts I-III et de différents motifs potentiels de régulation

trouvés dans ces inserts dans la surexpression de *MFS1* au moyen de fusions transcriptionnelles avec le gène rapporteur de la RFP. Les motifs potentiels analysés étaient ceux énoncés par Omrane et al. (2017) ; les motifs MCB dans les inserts de type I et les motifs HNF3 dans les inserts de type IIA. Ces motifs ont été délétés ou remplacés par des séquences neutres dans leurs inserts respectifs afin d'évaluer leur rôle dans la surexpression de *MFS1*. Nous avons pu ainsi montrer que la surexpression de *MFS1* et, de ce fait, la MDR est due aux séquences spécifiques des inserts I, II et III. Dans les inserts de type I, les motifs MCB contribuent bien à la surexpression de *MFS1* mais ne sont pas les seuls éléments *cis* impliqués. Dans les inserts de type II, les motifs HNF3 ne sont pas responsables de la surexpression de *MFS1*. D'autres motifs de régulation potentiels ont été identifiés dans la séquence de P_{MFS1} et dans les inserts I-III. Les fusions transcriptionnelles P_{MFS1} -RFP construites permettront de poursuivre la caractérisation des acteurs moléculaires impliqués dans la surexpression de *MFS1*. Ainsi, nous faisons le constat que la MDR est le résultat de plusieurs mécanismes génétiques qui ne sont pas uniquement liés au promoteur *MFS1*, et nous montrons que le promoteur *MFS1* peut accueillir une multitude d'inserts qui ne seront pas forcément liés à la MDR. Estimer la MDR chez *Z. tritici* par la seule détection d'inserts dans le promoteur *MFS1* peut fausser les estimations. Nous suggérons de réaliser la détection et le suivi de la MDR au champ, au moyen de tests phénotypiques. La détection moléculaire au champ de la MDR nécessiterait d'identifier de façon exhaustive les mécanismes moléculaires impliqués. Les outils d'analyse de l'expression et les ressources microbiologiques générés durant ces travaux permettent d'ouvrir la voie à l'identification de ces éléments.

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier Sabine pour sa disponibilité, ses conseils et ses relectures sans qui cette thèse n'aurait jamais vu le jour. Merci d'avoir supporté mes difficultés de rédaction et surtout de m'avoir offert ce superbe cadre de travail. Je te remercie sincèrement pour ta bienveillance et ton professionnalisme qui ont été d'une grande aide pendant ces 5 années de travail ensemble. Durant les dernières semaines de rédaction, je me suis souvent rappelé à quel point j'avais eu de la chance de t'avoir comme encadrante, et ce n'est pas sans un pincement au cœur que je termine ce manuscrit en sachant que notre collaboration arrive à son terme. Sabine, encore merci pour tout.

Merci à Anne-Sophie pour avoir participé à l'initiation de cette thèse. Merci pour tes conseils quant à l'utilisation de tes collections et merci pour la direction et l'animation de l'équipe GAIA, ainsi que pour l'intégration de tous les membres dans la vie scientifique de l'équipe.

Merci à Marc pour avoir initié ce projet de thèse en collaboration avec Anne-Sophie, et m'avoir offert l'opportunité de travailler à Anova-Plus avant le début de cette thèse.

Merci aux anciens collègues d'Anova-Plus pour leurs conseils, pour les repas partagés et nos discussions. Merci à : Gaëlle, Carole, Didier, Natasha, Léonie, Subash, Angélique, Anne.

J'aimerais également remercier les membres du jury, Marie Dufresne, Thomas Guillemette, Guilhem Janbon, Florence Leclerc et Cécile Lorrain, pour avoir accepté notre invitation à juger ces 3 années de travail et d'avoir accepté de reporter la date initiale de la soutenance. Merci à vous pour votre disponibilité et l'intérêt montré pour ce sujet de thèse.

Merci aux membres du comité de suivi Muriel Viaud, Sanjoy Paul, Mattias Kretschmer et Florence Leclerc, pour leurs remarques pertinentes et leurs conseils apportés durant les différentes réunions de comité de suivi.

Je remercie particulièrement Elza, co-doctorante encadrée par Sabine. Mon séjour à Bioger n'aurait pas été le même sans toi, tu es une personne géniale avec qui j'ai adoré travailler, merci également pour toutes les franches rigolades et les longues discussions. C'est aussi avec tristesse que je rédige ces remerciements, à l'idée de bientôt ne plus t'avoir comme collègue, encore merci pour ces deux années.

Merci à Anais Pitarch et Alicia pour l'aide apportée dans la création des transformants RFP et pour leur expertise. Merci à vous deux pour votre aide indispensable.

Je tiens à remercier tous les collègues de l'équipe GAIA pour tous les moments partagés au laboratoire comme au bureau, pour toutes les informations échangées : du protocole d'extraction à la meilleure brasserie sur Paris. Merci à vous également pour les délicieux repas partagés durant les moments de convivialité, j'ai adoré être dans une équipe qui partage cet amour de la bonne nourriture. Merci à Camille, Amandine, Claire, Lauréline, Agathe, Stéphanie, Gwilherm, Clémentine, Guillaume, Anne, Anais L, Danièle, Anne-Lise, Corentin.

Merci à Isabelle et Béatrice d'avoir soutenu, par leur travail à la laverie, les manipulations tout au long de cette thèse. Surtout merci à vous deux pour le travail titanesque que vous fournissez pour l'unité.

Merci à tous les autres membres de Bioger avec qui j'ai pu interagir de près comme de loin durant ces cinq années et qui ont rendu la vie au laboratoire des plus plaisantes. Merci à Aude (notamment pour nos nombreuses journées de télétravail à rédiger nos thèses respectives), Kaori, Justine R, Justine V, Anthony, Julie, Mathilde, Carolina, Kevin, Emmie.

Merci à mes amis parisiens, Kevin, Maéva, Loïc, Alex et Roxane (et leurs compagnons Paco et Olie) pour leur soutien et pour les moments hors thèse. Mon séjour en Île-de-France a été exceptionnel grâce à vous

Merci à Citronelle, mon chat, pour m'avoir tenu compagnie tout au long de la rédaction et pour ton affection sans limite.

Je souhaite remercier chaleureusement ma famille. Maman, Papa, Chloé, merci de m'avoir soutenu durant toutes ces années, merci de m'avoir toujours poussé et encouragé, je n'aurais pas pu autant m'épanouir sans vous.

Philomène, merci d'être à mes côtés depuis le début de cette aventure, merci pour ton aide et ton soutien. Je n'ai pas de mots pour décrire à quel point grandir avec toi durant ces cinq dernières années a été épanouissant.

Table des matières

I.	Introduction.....	1
I.1.	La Résistance aux antimicrobiens et anticancéreux.....	3
I.2.	La résistance Multidroge liée à l’efflux.....	6
I.2.1.	Transporteurs ABC liés à la MDR.....	6
I.2.2.	Les transporteurs MFS liés à la MDR.....	8
I.3.	La MDR liée à efflux accru chez les champignons.....	10
I.3.1.	Les gènes impliqués dans la MDR et leur régulation.....	10
I.3.2.	La MDR chez les espèces fongiques pathogènes de l’homme.....	11
I.3.3.	MDR chez les champignons phytopathogènes.....	13
I.4.	<i>Zymoseptoria tritici</i>	14
I.4.1.	<i>Zymoseptoria tritici</i> un pathogène majeur du blé.....	14
I.4.2.	La MDR chez <i>Z. tritici</i>	19
I.5.	Problématique.....	21
II.	Étude de la diversité génotypique et phénotypique de la MDR dans des populations récentes de <i>Z. tritici</i> d’Europe de l’ouest.....	23
II.1.	Avant-propos.....	25
II.1.1.	Les transposons chez les champignons.....	25
II.2.	Manuscrit de l’article “Plasticity of the <i>MFS1</i> promotor is not the only driver of Multidrug resistance in <i>Zymoseptoria tritici</i> ”.....	29
III.	Etude moléculaire des inserts de type I – III et leur implication dans la surexpression de <i>MFS1</i> 55	
III.1.	Introduction.....	57
III.1.1.	La régulation de la transcription.....	57
III.1.2.	Etat de l’art concernant la régulation de la transcription de <i>MFS1</i> chez <i>Z. tritici</i>	59
III.2.	Démarche.....	61

III.3. Résultats	68
III.3.1. Discussion	72
IV. Discussion générale	77
V. Conclusion.....	87
Références bibliographiques	91

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNg	ADN génomique
ADP	Adenosine diphosphate
ANOVA	ANalyse Of VAriance
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine TriPhosphate
BIOGER	BIologie et GEstion des Risques en agriculture
BLAST	Basic Local Alignment Tool
CT	Cycle Threshold
DHA	Drug-proton(H+) Antiporters
IDM / DMI	DeMethylase Inhibitors
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DNase	Désoxyribonucléase
dNTP	DésoxyriboNucléotide TriPhosphate quelconque
DO	Densité Optique
EC50	Concentration efficace médiane
FRAC	Fungicide resistance action committee
GAIA	Gestion et Anticipation Intégrées de l'Adaptation des champignons phytopathogènes
GWAS	Genome-wide association study
HIV	Human immunodeficiency virus
HNF3	Hepatocyte nuclear factor 3
HSF1	Heat shock factor 1
MCB	Mlul Cell Cycle Box
MDR	Multidrug resistance
MFS	Major facilitator superfamily
MIC	Minimal inhibitory concentration
MoA	Mode of action
NBD	Nuclea binding domain
pb	Paire de bases
PCR	Polymerase chain reaction
PIC	Preinitiation complex
Qil	Qi site inhibitor
Qol	Qo site inhibitor
RF	Resistance factor
RFP	Red fluorescent protein
RLC	Résistance liée à la cible
RNLC	Résistance non liée à la cible
SDH	Succinate dehydrogenase
SDHI	Succinate dehydrogenase inhibitor
SNP	Single nucleotide polymorphism
STB	Septoria tritici blotch
TE	Transposable element

TF	Transcription factor
TMD	Transmembrane domain
UV	Ultraviolet
WT	Wild-type

Liste des figures

Figure 1 Voies métaboliques ciblées par les fongicides. En rouge, les voies ciblées. En gras, sont indiquées les molécules et leur domaine d'application est indiqué par des surlignements : rouge pour celles utilisées dans le milieu médical, vert pour celles utilisées dans le milieu agricole, bleu pour celles utilisées dans les deux milieux. Issue de (Sanglard, 2019)	3
Figure 2 Les mécanismes de résistance des cellules eucaryotes face aux molécules toxiques : les résistances liées à la cible : 1- Modification du site de fixation ; 2 - Surexpression de la cible. Les résistances non liées à la cible : 3 – détoxification enzymatique 4 ; – Efflux accru, 5 – Influx réduit, 6 – Inactivation par liaison protéique.....	4
Figure 3 Résistance à différents modes d'action A : Principe de différenciation des fongicides possédant un même mode d'action, ici deux modes d'action représentés par un rond rouge ou une étoile bleue, les molécules possédant le même mode d'action ont la même forme et sont différenciées par le texte contenu dans les différentes formes. B Différence entre les types de résistances : RLC : Résistance Liée à la Cible et RNLC : Résistance Non Liée à la Cible.....	5
Figure 4 Schéma des transporteurs membranaires liés à la MDR. Les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour l'efflux. Les transporteurs MFS (Major Facilitator Superfamily) utilisent l'énergie liée au gradient de protons pour le transport de molécules à travers la membrane plasmique.	6
Figure 5 mécanismes de l'efflux d'une molécule par un transporteur ABC	7
Figure 6 Les trois familles de transporteurs ABC liées à la MDR. A/ Topologie des transporteurs ABC G C et B. B/ Transporteurs ABC impliqués dans la MDR chez différents eukaryotes	8
Figure 7 Structure des transporteurs MFS liés à la MDR.....	8
Figure 8 Mécanismes de résistance non lié à la cible (NTSR) aux principales classes de fongicides utilisés pour la gestion des maladies de grandes cultures. Chaque cercle de différentes couleurs représente une classe chimique, tandis que les symboles à l'intérieur de chaque cercle représentent chacun un mécanisme de résistance comme indiqué sur la figure. DMIs : Inhibiteurs de la déméthylation; MBCs : Carbamates de méthylbenzimidazole; APs : Anilino-pyrimidines; PPs : Phénylpyrroles; QoIs : Inhibiteurs de quinone externe; KRIs : Inhibiteurs de la cétoréductase; SDHIs : Inhibiteurs de la succinate déshydrogénase. (Adapté de Hu et al., 2021).....	13
Figure 9 Cycle d'infection représentant le rôle des différentes morphologies de <i>Z. tritici</i> dans la septoriose du blé. (Francisco et al 2019).....	15

Figure 10 Diversité des inserts connus dans le promoteur de MFS1 chez <i>Z. tritici</i> et phénotype MDR associé.....	20
Figure 11 Interaction entre les éléments composant le complexe de pré-initiation (PIC), nécessaire à la transcription d'un gène par l'ARN polymérase II (Pol II). A/ Recrutement de Pol II par le complexe facteur de transcription-méiateur reconnaissant les UAS. B/ Initiation de la transcription par recrutement de la Pol II par les facteurs de transcription généraux.....	58
Figure 12 Impact de l'état de condensation de la chromatine sur la transcription. A/ Structure des chromosomes et de la chromatine issue composée d'ADN s'enroulant autour d'histones, formant les nucléosomes. B/ Chromatine condensée, hétérochromatine, résultant en la répression des gènes contenus dans les nucléosomes. C/ Chromatine décondensée, euchromatine, permettant l'expression des gènes contenus dans les nucléosomes.	58
Figure 13 A / Motifs MCB retrouvés dans l'insert de type I chez <i>Z. tritici</i> , B/conservation de ces motifs chez les ascomycetes, C / proximité des éléments MCB ainsi que le nombre de répétions en amont des gènes du cycle cellulaire chez les ascomycètes. (Gasch et al., 2004).....	60
Figure 14 Identification des éléments de régulation potentiels retrouvés à l'extrémité 5' des inserts de type IIA, IIB et IIC. Le motif de reconnaissance HNF3 (Johnson et al., 1995) est souligné en rouge.....	61
Figure 15 Principe de l'intégration de la fusion transcriptionnelle au locus KU70 . L'intégration de la fusion transcriptionnelle (A) est réalisée par recombinaison homologe au locus KU70 (B) de la souche HLS1000 grâce aux bords flanquants KU70 LF et RF bordant la fusion transcriptionnelle. A/Construction comportant la fusion transcriptionnelle P _{MFS1} – rfp possédant le marqueur de sélection menant à la résistance à l'hygromycine, le gène KU70 ainsi que les séquences flanquant les bords KU70 . B/ Séquence présente entre les deux séquences flanquantes KU70 LF et RF (en bleu) dans la souche de <i>Z. tritici</i> HLS1000, ici le gène de résistance à la généticine remplace le gène KU70 . C) Séquence au locus KU70 après intégration de la fusion transcriptionnelle dans la souche de <i>Z. tritici</i> HLS1000 transformée.....	62
Figure 16 Allèle P _{MFS1} des différentes constructions intégrées au locus KU70 des transformants RFP. Les lignes de couleurs représentent les séquences propres aux promoteurs hors insert des souches de champ (*issues de Omrane et al., 2017) chez lesquelles les inserts ont été retrouvés (représentés sous forme de rectangle de la même couleur). En noir correspond la séquence P _{MFS1} sans insert issue de la souche IPO323.....	63

Figure 17 Allèle P_{MFS1} des différentes constructions intégrées au locus KU70 des transformant RFP « neutre ». Le trait noir correspond a la séquence du promoteur IPO323. Les rectangles hachurés correspondent aux inserts neutres au même lieu d'insertion et de la même taille que les inserts : bleu type I, rouge type IIA et vert type III.63

Figure 18 Allèle P_{MFS1} des différentes constructions intégrées au locus KU70 des transformants RFP possédant les motifs de régulation délévés ou remplacés. Les inserts concernés sont les inserts de type I et IIA. Les lignes de couleurs représentent les séquences propres aux promoteurs hors insert des souches du champ (*issues de Omrane et al., 2017) chez lesquelles les inserts ont été retrouvés (représentés sous forme de rectangle de la même couleur), trait bleu pour I, trait rouge pour IIA. Les rectangles représentent les inserts modifiés; bleu pour le type I, rouge pour le type II. Les motifs MCB, initialement au nombre de quatre, sont représentés chacun sous forme d'une barre verticale bleue foncée, et la délétion de ces inserts par une croix blanche. Les quatre motifs HNF3 sont représentés par un unique rectangle rouge pourpre. Leur délétion est représentée par une croix blanche et leur remplacement par une séquence neutre par un hachurage blanc/rouge pourpre. 64

Figure 19 Comparaison entre l'analyse quantitative des ARNm de MFS1 et la variation de la fluorescence pour les mêmes allèles de P_{MFS1} . A/ Variation de l'expression de MFS1 mesurée par qRT-PCR dans des souches de champ possédant les inserts I, IIA, ou III comparée à la référence IPO323 (Omrane et al., 2017). B/ Variation de la fluorescence dans les transformants P_{MFS1} -RFP possédant les inserts I, IIA, ou III comparée aux transformants Sans_insert-rfp. En noir, les souches ne possédant pas d'insert. En bleu, les souches possédant l'insert de type I; en rouge, les souches possédant les inserts de type II; en vert, les souches possédant l'insert de type III. Les valeurs d'expression en A sont extrapolées des mesures issues de Omrane et al. 2017. Les valeurs de fluorescence en B proviennent de n=4 réplicats biologiques. Les lettres différencient les catégories significativement différentes . Statistiques / ANOVA sur données transformées (racine carrée de la fluorescence relative (F)) : p-value < 0,0001, comparaisons par paires post-hoc de Tukey, seuil de significativité des groupes : p-value > 0,05.)68

Figure 20 Variation de la fluorescence relative dans les transformants P_{MFS1} – rfp possédant des inserts aux séquences neutres à la même position et de la même taille que les inserts type I, IIA et III. La fluorescence absolue a été mesurée dans chaque transformant, normalisée à la concentration cellulaire et rapportée à la fluorescence moyenne des transformants Sans_insert-rfp-11 et 37. Les moyennes des valeurs apparaissent sous forme d'histogramme, et les barres d'erreur correspondent aux écarts-types des répétitions biologiques (n = 4 pour tous les transformants). Statistiques : ANOVA sur données transformées (racine carrée de la fluorescence relative (F)) : p-value < 0,0001,

comparaisons par paires post-hoc de Tukey, seuil de significativité des groupes : p-value > 0,05.
.....69

Figure 21 Impact de la mutation des éléments MCB sur la fluorescence dans les transformants P_{MFS1} -rfp possédant les inserts type I complets, et avec deux ou quatre éléments MCB délétés respectivement. La fluorescence absolue a été mesurée chez chaque transformant, normalisée à la concentration cellulaire et rapportée à la fluorescence moyenne des transformants Sans_insert-rfp-11 et 37. Les moyennes des valeurs apparaissent sous forme d'histogramme, et les barres d'erreur correspondent aux écarts-types des répétitions biologiques (n = 4 pour tous les transformants, sauf pour I-▲2_MCB-rfp-19, I-▲4_MCB-rfp-10, I-▲2_MCB-rfp-12, n = 3). Statistiques : ANOVA sur données transformées (racine carrée de la fluorescence relative (F)) : p-value < 0,0001, comparaisons par paires post-hoc de Tukey, seuil de significativité des groupes : p-value > 0,05.
.....70

Figure 22 Variation de la fluorescence relative chez des transformants P_{MFS1} -rfp possédant les inserts Type IIA, IIC complet, et avec les éléments HNF3 du type IIA délétés ou remplacés par une séquence neutre. La fluorescence absolue a été mesurée chez chaque individu, normalisée à la concentration cellulaire et rapportée à la fluorescence moyenne des souches sans insert Sans_insert-rfp-11 et 37. Les moyennes des valeurs apparaissent sous forme d'histogramme, et les barres d'erreur correspondent aux écarts-types des répétitions biologiques (n = 4 pour tous les individus, sauf pour IIA-▲HNF3-13, IIA-▲HNF3-37 n = 2). Statistiques : ANOVA sur données transformées (racine carrée de la fluorescence relative (F)) : p-value < 0,0001, comparaisons par paires post-hoc de Tukey, seuil de significativité des groupes : p-value > 0,05.....71

Figure 23 Alignement MAFFT des séquences des inserts de type II A, B, C, D, E F le retrotransposon RLX_LARD_Gridr. Les séquences conservées sont représentées sous formes de rectangles rouges. Les éléments-cis de régulation homologues à ceux décrits chez Gasch et al., 2004, sont représentés sous formes de traits rouge.72

Figure 24 Niveaux d'expression relatifs liés à l'insert de type III en fonction du type d'allèle P_{MFS1} . A/ Expression de la RFP par mesure de la fluorescence dans les transformants RFP. B/ Expression de MFS1 par qRT-PCR dans les souches de champ PMFS1-Type_III. C/ Expression de MFS1 par qRT-PCR dans les souches isogéniques de référence (transformant IPO 323 avec remplacement d'allèle par PMFS1-Type_III). La composition des promoteurs portant l'insert de type III correspondant à chaque expérience (A, B, et C) se trouve en bas. Les traits verts correspondent à la séquence promotrice (hors insert) associée à l'insert de type III retrouvé dans la souche du champ 15-PQ-2B. Le trait noir correspond à la séquence promotrice MFS1 de IPO323. En aval des

séquences promotrices figure le type de gène contrôlé, rectangle noir : MFS1, rectangle rouge : RFP
.....73

Figure 25 Scénarios sur l'implication des motifs de régulation cis et l'insert de type III sur l'expression de MFS1. A/ Expression basale de MFS1 chez IPO323. B/Sous-expression de MFS1 par l'éloignement des motifs de régulation HAP2 et RME1 par l'insert neutre de 150 pb en position -213. C/ Surexpression de MFS1 par le recrutement de facteur(s) de transcription par les motifs de régulation cis présents dans l'allèle P_{MFS1} -type_III. Les motifs de régulation sont représentés sous forme de barres horizontales : en noir, les motifs de régulation initialement présents dans P_{MFS1} -sans_insert et en vert, les motifs de régulation apportés par les inserts III. Les facteurs de transcription (TF) sont représentés sous forme de cercles de couleurs : en gris, les TF recrutés par les motifs de régulation initialement présents dans P_{MFS1} -sans_insert ; en vert, ceux recrutés par les motifs de régulation apportés par les allèles P_{MFS1} -type_III74

Figure 26 Comparaison des séquences de P_{MFS1} chez les souches de champ de référence issues de la publication Omrane et al., 2017. A/ Schéma global représentant le promoteur de MFS1 avec la position des inserts par rapport au codon start de MFS1. Les motifs de régulation putatifs présents dans P_{MFS1} hors insert sont représentés sous forme de barre horizontale en noir si présents chez toutes les souches de champ, en rouge et vert si présents dans les souches 12-VM-5A (IIA) et 15-PQ-2B (III). B/ Alignement MAFFT des séquences promotrices hors insert des souches de champ de référence, en noir pour IPO323, en bleu pour 09-ASA-3apz (I), en rouge pour 12-VM-5A (IIA), et en vert pour 15-PQ-2B (III). Les motifs de régulation putatifs sont encadrés en noir.75

Figure 27 Éléments de régulation présents dans les différents allèles P_{MFS1} et interaction **supposée** avec les facteurs de transcription exprimés chez IPO323 : A/Transcription basale de MFS1 par l'allèle P_{MFS1} -sans_insert. B/ Transcription chez l'allèle P_{MFS1} -type_I. C/ Transcription chez l'allèle P_{MFS1} -type_IIA. D/ Transcription chez l'allèle P_{MFS1} -type_III. Les motifs de régulation sont représentés sous forme de barres horizontales : en noir, les motifs de régulation initialement présents dans P_{MFS1} -sans_insert et en bleu, rouge, vert, les motifs de régulation apportés par les inserts I, IIA et III respectivement. Les facteurs de transcription (TF) sont représentés sous forme de cercles de couleurs : en gris, les TF recrutés par les motifs de régulation initialement présents dans P_{MFS1} -sans_insert ; en bleu, rouge, vert, ceux recrutés par les motifs de régulation apportés par les allèles P_{MFS1} -type_I, IIA et III respectivement.82

Figure 28 Expression relative de MFS1 chez les souches du champs de *Z. tritici* par rapport aux souches isogéniques de référence possédant les différentes allèles P_{MFS1} dans la souche IPO32 (P_{MFS1} -sans_insert, P_{MFS1} -type_I, et P_{MFS1} -type_III) . Le type d'allèle est représenté en noir pour

P_{MFS1} -sans insert ; bleu pour P_{MFS1} -type_I ; vert pour P_{MFS1} -type_III. répétitions biologiques (n=2).
Statistiques : ANOVA sur données transformées, comparaisons par paires post-hoc de Tukey, seuil
de significativité des groupes : p-value > 0,0583

Figure 29 Figure 30 Les inserts retrouvés dans P_{MFS1} auraient pour origine des événements de
transposition. Les inserts possédant des similarités avec des éléments transposables ont été
encadrés avec la couleur correspondant à la super-famille à laquelle ils appartiennent. La
classification des éléments transposables simplifiée est adaptée de Wickers et al., 2007.....84

Liste des tableaux

Tableau I Transporteurs impliqués dans la résistances aux molécules xénobiotiques	10
Tableau II Mode d'action des fongicides utilisés contre <i>Zymoseptoria tritici</i> adapté de Garnault et al 2019	18
Tableau III Liste des 11 fusions transcriptionelles RFP, Les transformants seront désignés selon la nomenclature suivante : type d'insert – modulation – rfp.....	65

I. Introduction

I.1. La Résistance aux antimicrobiens et anticancéreux

Le contrôle des champignons, des bactéries pathogènes ainsi que des cellules cancéreuses peut être réalisé par des molécules qui vont inhiber un ou plusieurs processus biochimiques au sein des cellules des différents organismes. Ainsi, on considère des molécules ayant la même cible métabolique comme appartenant à une même classe de traitement. Les molécules d'une même classe auront donc le même mode d'action (MoA). Chez les champignons pathogènes, il existe sept grandes voies métaboliques qui peuvent être la cible de fongicides (Fisher *et al.*, 2018; Sanglard, 2019) : la synthèse de la paroi, la synthèse de l'ergostérol, les voies de signalisation, la synthèse de l'ADN/ARN, la synthèse ou l'assemblage des microtubules, la respiration cellulaire (Figure 1). Pour une même voie métabolique ciblée, plusieurs modes d'actions peuvent être utilisés ; c'est le cas, par exemple, de l'inhibition des fonctions mitochondriales, qui peuvent être ciblées par trois modes d'actions différents. La voie la plus souvent ciblée est celle de la biosynthèse de l'ergostérol, ce stérol est exclusif aux champignons et n'est pas présent chez leurs hôtes végétaux comme animaux. Le traitement utilisant des azoles est donc favorisé pour sa faible toxicité chez l'hôte.

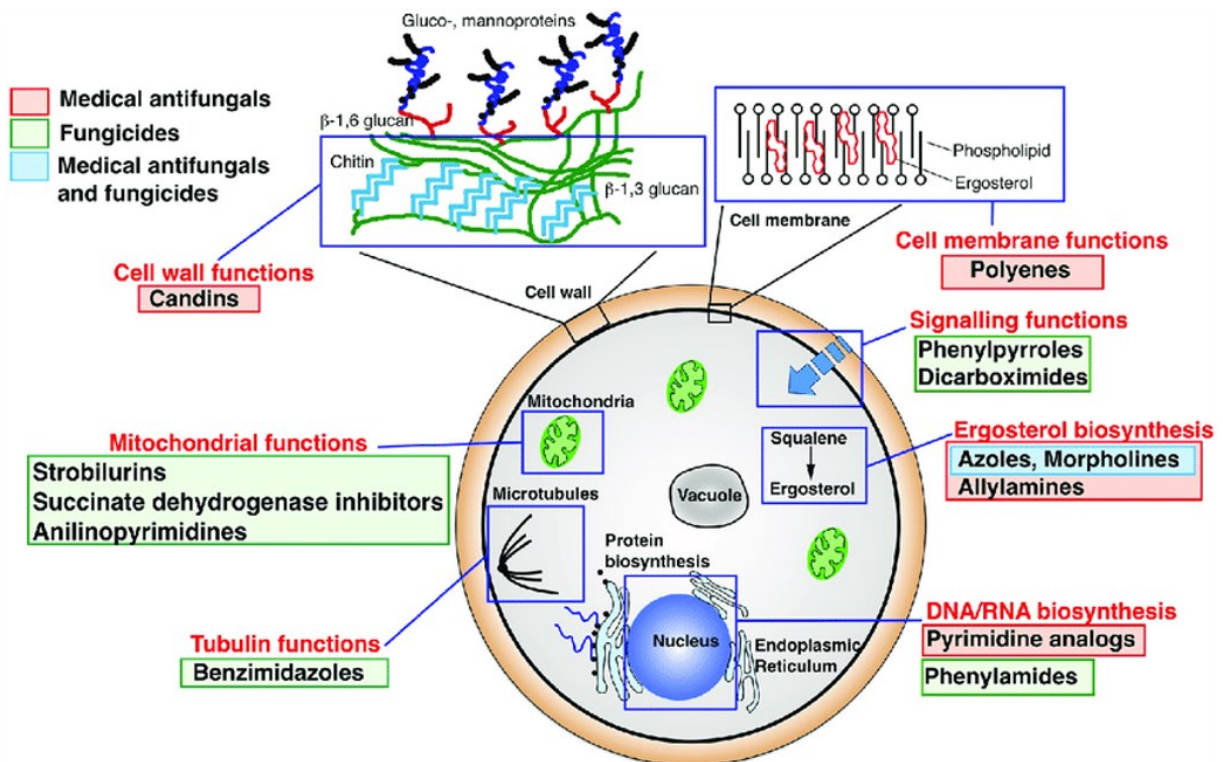


Figure 1 Voies métaboliques ciblées par les fongicides. En rouge, les voies ciblées. En gras, sont indiquées les molécules et leur domaine d'application est indiqué par des surlignements : rouge pour celles utilisées dans le milieu médical, vert pour celles utilisées dans le milieu agricole, bleu pour celles utilisées dans les deux milieux. Issue de (Sanglard, 2019)

Pour tous ces organismes, la résistance à un traitement chimique correspond à la capacité héréditaire permettant de survivre et de continuer leur prolifération, afin d'augmenter la biomasse durant un traitement. Alors que la tolérance aux antifongiques est la capacité des organismes traités de reprendre leur croissance après un temps données en présence d'antifongique la ou des organismes non tolérants reprendraient leur croissance uniquement en absence d'antifongiques (Brauner *et al.*, 2016; Berman & Krysan, 2020).

La résistance repose sur des mécanismes biochimiques issus de caractères génétiques héréditaires.

Face aux traitements, on distingue deux types de résistances : la résistance liée à la cible (RLC) et la résistance non liée à la cible (RNLC). La résistance liée à la cible concerne donc une classe de molécules toxiques ayant la même cible (même MoA), tandis que la résistance non liée à la cible peut concerner plusieurs classes de molécules. Ces deux types de résistances reposent sur des mécanismes moléculaires différents (Figure 2).

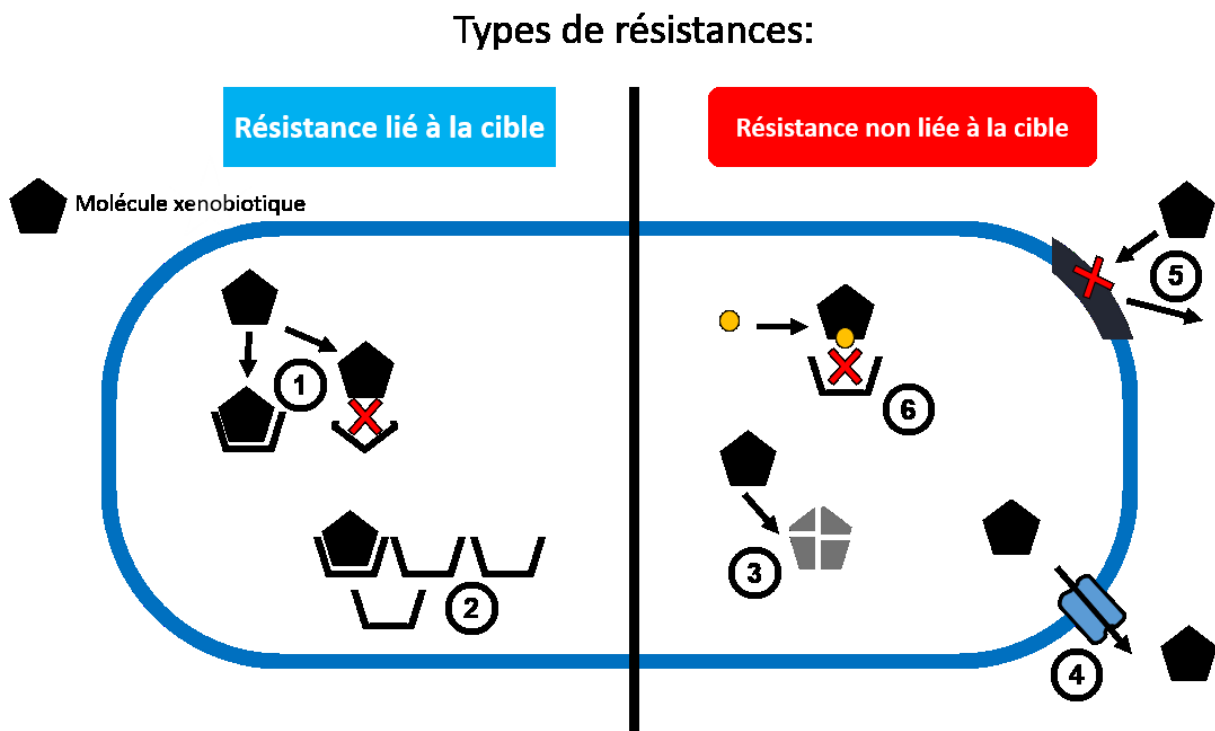


Figure 2 Les mécanismes de résistance des cellules eucaryotes face aux molécules toxiques : les résistances liées à la cible : 1- Modification du site de fixation ; 2 - Surexpression de la cible. Les résistances non liées à la cible : 3 - détoxification enzymatique 4 ; - Efflux accru, 5 - Influx réduit, 6 - Inactivation par liaison protéique.

Pour la résistance liée à la cible (RLC) : l'action directe de la molécule de traitement sur l'organisme sera réduite de deux manières possibles :

- par la multiplication de sa cible, due à la surexpression du gène correspondant ;

- par la modification du site de fixation de la molécule sur la cible.

La résistance non liée à la cible (RNLC) repose sur la surexpression d'un ou plusieurs gènes impliqués dans :

- la limitation de l'influx dans la cellule ;
- la dégradation des molécules à l'intérieur de la cellule ;
- leur inactivation par une protéine qui s'y lie ;
- l'augmentation de l'efflux des substances hors de la cellule.
- Le bypass de l'enzyme inhibée par l'utilisation d'une voie de biosynthèse alternative.

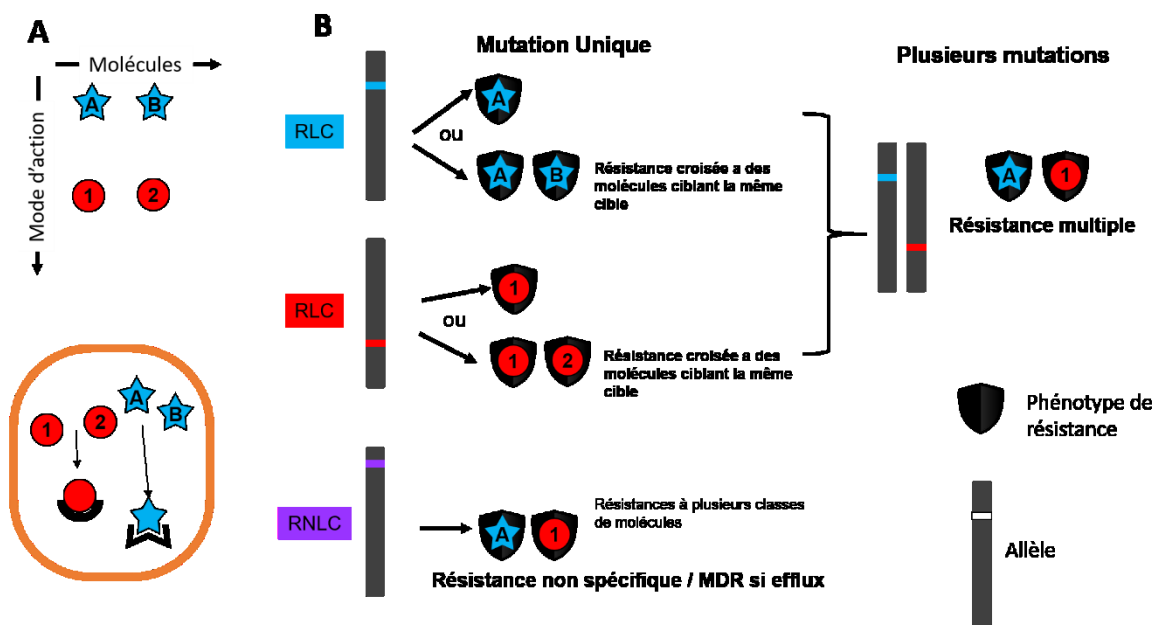


Figure 3 Résistance à différents modes d'action A : Principe de différenciation des fongicides possédant un même mode d'action, ici deux modes d'action représentés par un rond rouge ou une étoile bleue, les molécules possédant le même mode d'action ont la même forme et sont différenciées par le texte contenu dans les différentes formes. B Différence entre les types de résistances : RLC : Résistance Liée à la Cible et RNLC : Résistance Non Liée à la Cible.

Les phénotypes de résistance sont décrits en fonction des types de mécanismes de résistance impliqués. Dans cette thèse, nous utiliserons les définitions agronomiques des phénotypes de résistance (R4P : <https://www.r4p-inra.fr/fr/glossaire/>) :

On parle de résistance croisée quand une unique mutation liée à une RLC va donner lieu à un phénotype de résistance à plusieurs molécules au sein d'un même mode d'action. Quand un phénotype de résistance à plusieurs modes d'action est obtenu par une accumulation de mutations (≥ 2), on parle alors de Résistance Multiple. Une RNLC pourra donner un phénotype de résistance non spécifique à plusieurs classes de fongicides. Dans le monde agricole, la résistance à

plusieurs classes de fongicides liée au mécanisme d'efflux est appelée Multidroque Résistance (MDR). Dans le monde médical, la MDR a une autre définition : elle concerne uniquement le phénotype de résistance, c'est-à-dire la capacité à résister à plusieurs classes de fongicides. Ainsi, dans le monde médical, on qualifiera un organisme de MDR s'il peut résister à un nombre $\geq x$ de classes de traitements différents (≥ 3 pour les bactéries, ≥ 2 pour les champignons pathogènes cliniques)(Coleman & Mylonakis, 2009; Hernando-Amado *et al.*, 2016; Khunweeraphong & Kuchler, 2021).

I.2. La résistance Multidroque liée à l'efflux

Il existe deux grandes familles de transporteurs liées au phénotype MDR, des bactéries aux mammifères (Pao *et al.*, 1998).

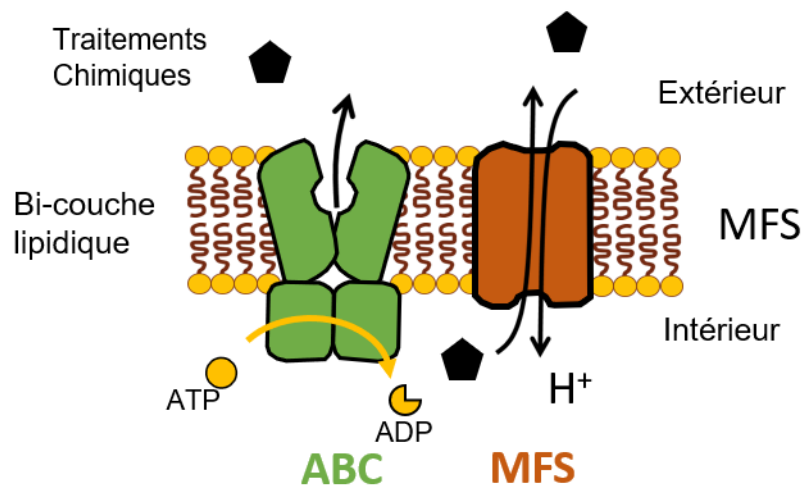


Figure 4 Schéma des transporteurs membranaires liés à la MDR. Les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour l'efflux. Les transporteurs MFS (Major Facilitator Superfamily) utilisent l'énergie liée au gradient de protons pour le transport de molécules à travers la membrane plasmique.

Les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) et MFS (Major Facilitator Superfamily) se distinguent par l'énergie utilisée pour le transport de composants hors de la cellule. Les transporteurs ABC utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour l'efflux (Wilkins, 2015), tandis que les transporteurs MFS (Drew *et al.*, 2021) exploitent l'énergie du gradient électrochimique entre l'intérieur et l'extérieur de la membrane plasmique (Fig. 4).

I.2.1. Transporteurs ABC liés à la MDR

Présents chez les prokaryotes comme chez les eucaryotes, les transporteurs ABC jouent un rôle crucial dans les processus cellulaires grâce à leur capacité à utiliser l'énergie de l'ATP pour réaliser

l'efflux de diverses substances à travers la membrane cellulaire. Ces protéines se caractérisent par des régions fonctionnelles distinctes :

- des régions hydrophobes appelées domaines transmembranaires (TMD), qui traversent la membrane, formant des canaux par lesquels les molécules peuvent passer ;
- des régions dans la partie cytosolique des cellules appelées domaines de liaison nucléotidique (NBD) où l'ATP se lie et s'hydrolyse, fournissant l'énergie nécessaire au transport.

Chez l'humain, les transporteurs ABC sont subdivisés en sept sous-familles, de A à G, une classification basée sur l'arrangement des séquences codant pour les NBD et TMD, ainsi que sur la composition des NBD (Dean *et al.*, 2001).

Les transporteurs ABC associés à la MDR chez les champignons sont composés de quatre régions:

- deux NBD ;
- deux régions hydrophobes dans les membranes, chacune contenant 6 TMD (Figure 5).

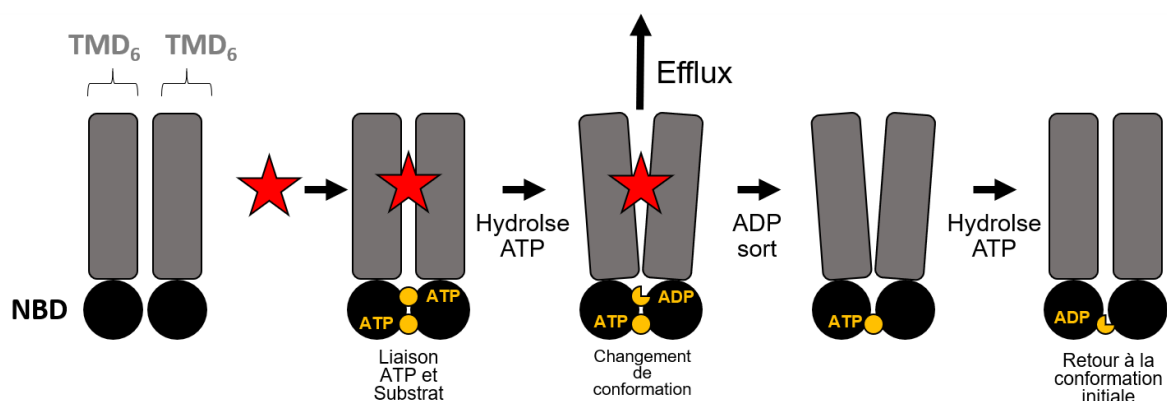


Figure 5 mécanismes de l'efflux d'une molécule par un transporteur ABC

Les transporteurs ABC liés à la MDR chez les eucaryotes présentent deux types de topologies : (NBD-TMD₆)₂ ou (TMD₆-NBD)₂, et sont classés dans les sous-familles ABCB, ABCC, et ABCG chez *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* et chez *Homo sapiens* (Figure 6). Bien que des hypothèses sur une origine prokaryote commune soient évoquées (Xiong *et al.*, 2015), la caractérisation d'un site catalytique unifiant ces transporteurs reste une question ouverte, et pourrait s'avérer essentielle pour le développement d'inhibiteurs de l'efflux.

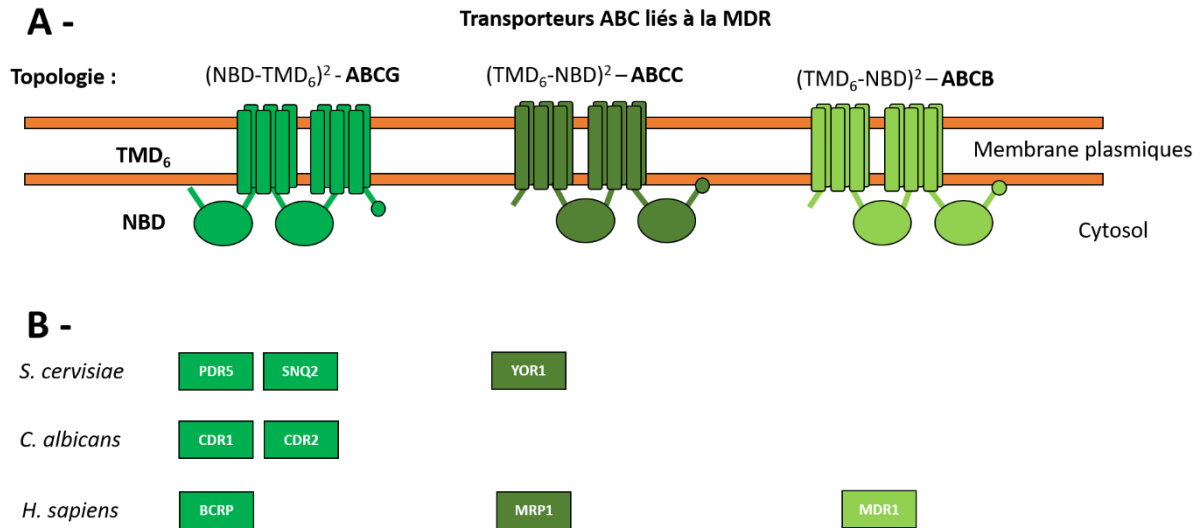


Figure 6 Les trois familles de transporteurs ABC liées à la MDR. A/ Topologie des transporteurs ABC G C et B. B/ Transporteurs ABC impliqués dans la MDR chez différents eukaryotes

I.2.2. Les transporteurs MFS liés à la MDR

Les autres transporteurs impliqués dans l'efflux sont ceux de la famille MFS (Major Facilitator Superfamily). Cette famille de transporteurs est divisée en trois catégories en fonction du mode de transport :

- Les uniporteurs, qui transportent uniquement leur substrat à travers la membrane plasmique ;
- Les symporteurs, qui transportent leur substrat et des ions à travers la membrane plasmique dans une même direction ;
- Les antiporteurs, qui transportent leur substrat et des ions dans des directions opposées à travers la membrane plasmique.

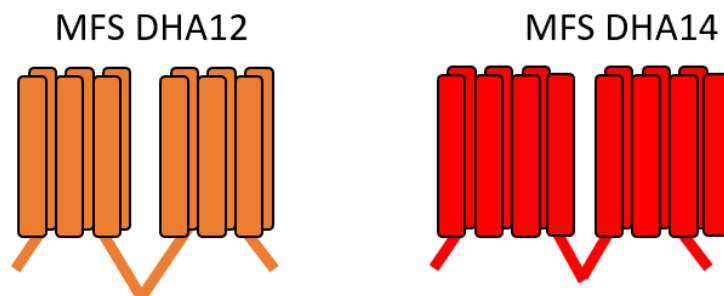


Figure 7 Structure des transporteurs MFS liés à la MDR

Ce sont ces derniers, les antiporteurs, qui sont impliqués dans le phénotype de résistance multidrogue (MDR), utilisant les protons H⁺ comme ions. Cette grande famille est appelée **Drug Proton (H⁺) Antiporter (DHA)**. Les transporteurs MFS DHA responsables de la MDR sont divisés en deux sous-familles, en fonction du nombre de domaines transmembranaires : DHA12 et DHA14, possédant respectivement 12 et 14 domaines transmembranaires. Ces transporteurs sont également retrouvés chez les levures et sont impliqués dans la MDR, comme c'est le cas pour Flr1 (Alarco *et al.*, 1997) et Atr1 (Kanazawa *et al.*, 1988). A contrario, les MFS ne sont pas impliqués dans la MDR des cellules cancéreuses de *H. sapiens* à ce jour.

Bien que la compréhension exacte des mécanismes enzymatiques des transporteurs MFS et ABC impliqués dans la MDR reste un sujet d'interrogation, leur spécificité de substrat a été bien caractérisée grâce aux études *in vitro* réalisées chez *S. cerevisiae* (Tableau I).

Tableau I Transporteurs impliqués dans la résistances aux molécules xénobiotiques

Type de transporteur	Nom	Type de molécule de traitement	Molécule	Littérature
ABC C	Yor1	Antibiotique/Antifongique	oligomycin	Katzmann et al. 1995
ABC G	PDR5	Antibiotique/Antifongique	cycloheximide	Katzmann et al. 1994
		Antibiotique/Antifongique	oligomycin	Decottignies et al. 1994
		Antifongique potentiel	diazaborine	Wehrschütz-Sigl et al. 2004
		Antifongique	flusilazole	Rogers et al., 2001
	Snq2	Herbicide	acide 2,4- dichloro-phénoxyacétique	Teixeira and Sá-Correia 2002
MFS DHA12	Flr1	Médicament antitumoral	Triaziquone methyl	Servos et al. 1993
		Antifongique	benomyl	Brôco et al. 1999
		Antimicrobien de la classe des epoxides	cerulenin	Oskouian and Saba 1999
		Fongicide multisite	Mancozeb	Teixeira et al. 2008
	Qdr3	Antifongique potentiel	diazaborine	Jungwirth et al. 2000
		Herbicide	barban	Tenreiro et al. 2005
		Médicament antitumoral	bleomycin	Tenreiro et al. 2005
	Tpo1	Médicament antitumoral	cisplatine	Tenreiro et al. 2005
		Antibiotique/Antifongique	cycloheximide	Do Valle Matta et al. 2001
		Herbicide	chlorinated phenoxyacetic acid	Teixeira and Sá-Correia 2002
		Médicament antitumoral	bleomycin	Berra et al. 2014
MFS DHA14	Atr1	Herbicide	aminotriazole (Amitrole)	Kanazawa et al. 1988
	Sge1	Intercalant ADN	ethidium bromide	Ehrenhofer-Murray et al. 1998
		Intercalant ADN	methylmethane sulfonate (MMS)	Ehrenhofer-Murray et al. 1998

I.3. La MDR liée à efflux accru chez les champignons

I.3.1. Les gènes impliqués dans la MDR et leur régulation.

Un modèle de référence : *Saccharomyces cerevisiae*

Les mécanismes de MDR liée à l'efflux ont été particulièrement bien caractérisés in vitro chez le modèle de référence *Saccharomyces cerevisiae*, la levure boulangère ou de bière.

Concernant les transporteurs ABC, la sous-classe G est la plus (Balzi *et al.*, 1994) dans la résistance aux azoles, avec les transporteurs de la même famille Pdr10, Pdr15 (Wolfger *et al.*, 1997) et Snq2 (Servos *et al.*, 1993; Mahé *et al.*, 1996). Ces transporteurs peuvent réaliser l'efflux d'une multitude de molécules toxiques, comme des fongicides, des antitumoraux ou des métaux lourds (Kolaczowski *et al.*, 1998) (Tableau I).

Les transporteurs MFS sont aussi impliqués dans l'efflux accru d'un grand nombre de molécules chimiques, avec Atr1, Sge1 et Vba1-4 la famille des DAH14 (Kanazawa *et al.*, 1988; Ehrenhofer-Murray *et al.*, 1998; Shimazu *et al.*, 2012; Kawano-Kawada *et al.*, 2016) impliqués dans l'efflux accru d'azoles ou de bromure d'éthidium. C'est aussi le cas du transporteur de la famille DAH12, Flr1 qui a pour substrat le benomyl ainsi que les diazaborines (Alarco *et al.*, 1997; Brôco *et al.*, 1999) ou Tpo1, impliqué dans la résistance au cycloheximide et à la quinidine (Do Valle Matta *et al.*, 2001).

L'expression des transporteurs ABC et MFS est régulée par des facteurs de transcription dont l'expression est modulée par différents types de stress, chimique ou oxydatif par exemple (Godinho & Sá-Correia, 2019). C'est le cas des facteurs de transcription Pdr1-3 qui régulent l'expression des gènes codant pour des transporteurs ABC *PDR5*, *SNQ2* et des transporteurs MFS *TPO1* (Kolaczowski *et al.*, 1998; Teixeira & Sá-Correia, 2002; Godinho & Sá-Correia, 2019). La proximité phylogénétique entre le modèle *S. cerevisiae* et les espèces *Candida spp.* pathogènes de l'homme ont permis de faire le parallèle entre des phénotypes MDR retrouvés dans des cas cliniques et les mécanismes régulant l'efflux observés *in vitro* chez *S. cerevisiae*.

I.3.2. La MDR chez les espèces fongiques pathogènes de l'homme

En 2022, l'Organisation Mondiale de la Santé a publié un rapport classant, par ordre de priorité, les agents infectieux fongiques. Ce rapport prend en compte plusieurs paramètres, tels que le taux de mortalité, la distribution globale et la possibilité de traitement, entre autres (World Health Organization, 2022). De cette étude, quatre pathogènes ont été classés dans la catégorie la plus critique : *Candida albicans*, *Candida auris*, *Aspergillus fumigatus* et *Cryptococcus neoformans*. Ces quatre pathogènes présentent un risque principalement chez les patients immunodéprimés, et leur traitement se fait par l'utilisation d'antifongiques. Les traitements disponibles se divisent en trois classes : les azoles, les polyènes et les échinocandines (World Health Organization, 2022). L'utilisation des azoles est le traitement le plus utilisé en raison de sa faible toxicité chez l'homme (Engler *et al.*, 2014) et de son coût de production abordable (Saag & Dismukes, 1988). Cependant, depuis 1995, des résistances aux azoles ont été détectées chez *C. albicans* dans des cas cliniques (Sanglard *et al.*, 1995), orientant ainsi les différentes études depuis lors. Les phénotypes

de résistances aux azoles par efflux accru dans le secteur clinique sont surtout expliqués par la résistance par mutation de cible (Joseph-Horne & Hollomon, 1997). Mais les azoles sont aussi le substrat de transporteurs ABC dont la surexpression augmentent la résistance chez les organismes concernés. Par exemple les transporteurs ABC impliqués dans l'efflux accru des azoles retrouvés chez les levures *Candida* spp. sont homologues des transporteurs ABC de *S. cerevisiae* (Sanglard *et al.*, 1995). L'efflux accru des azoles participe est une composante du phénotype MDR chez les pathogènes de l'homme et plusieurs transporteurs sont impliqués.

I.3.2.1. Transporteur ABC chez les pathogènes fongiques de l'homme

Les transporteurs ABC sont impliqués dans le phénomène de résistance multidrogue (MDR) chez *C. albicans*, *Candida auris* et *Aspergillus fumigatus*. Chez *C. albicans*, la surexpression des gène de la famille ABCG, *CDR1* et *CDR2*, joue un rôle crucial dans l'efflux accru des azoles (Sanglard *et al.*, 1995; Niimi *et al.*, 2004) . Cette surexpression est régulée par des facteurs de transcription tels que CaTaC1, qui, en cas de mutation, peut rendre l'expression de ces transporteurs constitutive (Coste *et al.* 2006). Chez *A. fumigatus*, la surexpression des gène codant le transporteur ABC *AjCDR1B* (ABCG) contribue également à la résistance aux azoles (Fraczek *et al.*, 2013). Sa régulation est liée à AfAtrR, un facteur de transcription de type Zn2-Cys6 (Hagiwara *et al.*, 2017). Le facteur de transcription AfAtrR interagit avec une région située entre 100 et 1300 paires de bases avant le codon start ATG de *AjCDR1B* (Paul *et al.*, 2019).

I.3.2.2. Les transporteurs MFS chez les pathogènes fongiques de l'homme

La résistance MDR liée aux transporteurs MFS est peu observée chez les champignons pathogènes de l'homme. Seul le gène *CaMDR1* chez *C. albicans* est décrit dans des cas cliniques comme participant à la MDR, sa régulation se fait par l'intermédiaire de facteurs de transcription tels que CaMrr1 ou CaCap1 (Morschhäuser *et al.*, 2007; Schubert *et al.*, 2011).

Chez ces 3 pathogènes fongiques cliniques décrits précédemment, la MDR liée à l'efflux est plus ou moins bien comprise. On peut retenir les observations suivantes :

- Globalement, seuls les azoles sont concernés par l'efflux accru de molécules.
- La principale famille de transporteurs impliquée dans l'efflux d'azoles est celle des ABC.
- L'expression des transporteurs est induite par une cascade transcriptionnelle en réponse au stress induit par l'application de fongicides.
- Des mutations conférant un gain de fonction chez des facteurs de transcription peuvent produire une surexpression constitutive de certains transporteurs.

I.3.3. MDR chez les champignons phytopathogènes

La MDR est également présente chez différents champignons pathogènes du secteur agricole et est liée à plusieurs mécanismes de résistance non liée à la cible (RNLC). L'efflux accru est donc impliqué dans la résistance à tous les modes d'action unisites utilisés (Figure 8).

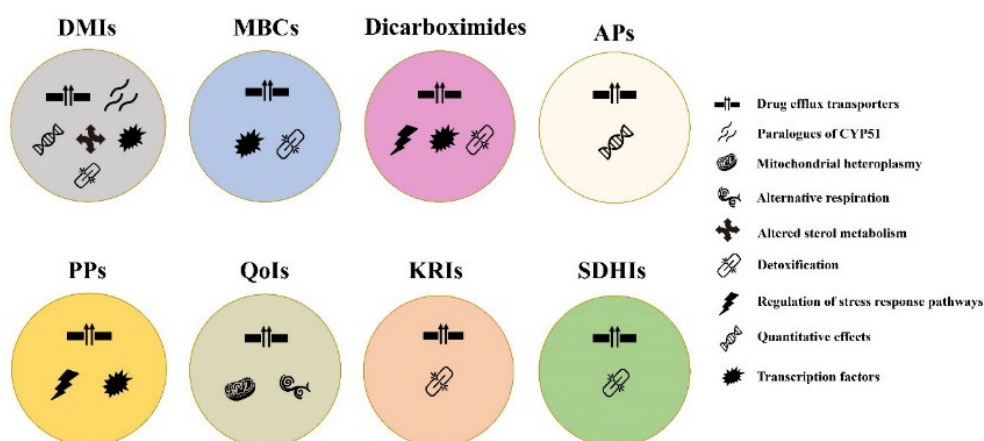


Figure 8 Mécanismes de résistance non lié à la cible (NTSR) aux principales classes de fongicides utilisés pour la gestion des maladies de grandes cultures. Chaque cercle de différentes couleurs représente une classe chimique, tandis que les symboles à l'intérieur de chaque cercle représentent chacun un mécanisme de résistance comme indiqué sur la figure. DMIs : Inhibiteurs de la déméthylation; MBCs : Carbamates de méthylbenzimidazole; APs : Anilino-pyrimidines; PPs : Phénylpyrroles; QoIs : Inhibiteurs de quinone externe; KRIs : Inhibiteurs de la cétoréductase; SDHIs : Inhibiteurs de la succinate déshydrogénase. (Adapté de Hu et al., 2021)

Les mécanismes de résistance multidrogue (MDR) les plus étudiés et les plus couramment observés sur le terrain sont ceux liés à l'efflux accru. Cependant, un autre mécanisme de résistance non lié à la cible (RNLC) existe, celui de la détoxification.

Chez *Claviceps homoeocarpa* (anciennement *Sclerotinia homoeocarpa*), l'agent responsable de la tache brune du dollar, une maladie des pelouses, les gènes codant pour des monooxygénases à cytochrome P450 et pour des transporteurs ABC sont directement impliqués dans la détoxification de différents fongicides. Ces gènes des phases I et III de la détoxification sont surexprimés par un facteur de transcription codé par le gène *ShXDR1*, qui présente une mutation de gain de fonction chez les souches MDR. De plus, l'expression hétérologue du gène muté *ShXDR1* chez *Botrytis cinerea* provoque également la surexpression de gènes impliqués dans les phases I et III de la détoxification. Ce phénomène de MDR partagé souligne la conservation des mécanismes de régulation de la MDR chez ces deux organismes (Sang et al., 2018).

Botrytis cinerea est un champignon nécrotrophe responsable de la pourriture grise de la vigne, de la tomate et d'autres plantes, où l'efflux accru est également impliqué dans la MDR. Dans les premières années 2000, des gènes impliqués dans l'efflux ont été caractérisés en laboratoire. La

surexpression du gène ABC *atrB* permet d'augmenter la résistance aux fongicides fludioxonil et fenpiclonil et est induite en présence de phénylpyrroles (Vermeulen *et al.*, 2001). L'expression d'un autre gène codant pour un transporteur ABC, *atrD*, est également induite par l'exposition aux fongicides (Hayashi *et al.*, 2001). Du côté des transporteurs MFS, c'est la surexpression du gène *mfsM1* qui est impliquée dans la résistance aux molécules naturelles camptothécine et cercosporine, ainsi qu'aux inhibiteurs de la synthèse des stérols (Hayashi *et al.*, 2002). Grâce aux campagnes de surveillance à grande échelle, des souches de champignons présentant un phénotype MDR ont pu être détectées (Chapeland *et al.*, 1999) (Chapeland *et al.*, 1999). La surexpression de *atrB* chez les souches de champignons est liée à la résistance multidrogue, et sa surexpression constitutive est due à une mutation de gain de fonction du facteur de transcription Mrr1 (Kretschmer *et al.*, 2009). Il a également été démontré que la surexpression constitutive du gène *mfsM2*, responsable d'un autre phénotype MDR, est liée à l'insertion d'un élément transposable dans son promoteur (Kretschmer *et al.*, 2009). Par la suite, un autre élément transposable a été détecté dans le promoteur de *mfsM2* dans d'autres souches MDR (Mernke *et al.*, 2011). Ces génotypes, détectés en France et en Allemagne, seraient issus d'un événement de transposition unique sélectionné ultérieurement par les conditions environnementales et les traitements fongicides.

Chez *Zymoseptoria tritici*, un pathogène du blé, le phénotype multidrogue a également été détecté sur le terrain. L'étude de la diversité de la MDR rencontrée sur le terrain et des mécanismes impliqués fait l'objet de cette thèse.

I.4. *Zymoseptoria tritici*

I.4.1. *Zymoseptoria tritici* un pathogène majeur du blé

Zymoseptoria tritici est un pathogène majeur du blé, responsable de la maladie foliaire appelée septoriose. Ce champignon, un ascomycète, présente différentes morphologies tout au long de son cycle de vie et en fonction des conditions de culture. Il est considéré comme un champignon hémibiotrophe, ce qui signifie qu'il possède une phase biotrophe associée à un développement asymptomatique qui maintient les cellules de son hôte vivantes. Ensuite, il bascule vers une phase nécrotrophe, associée à des processus causant la mort des cellules hôtes et l'apparition de symptômes (Steinberg, 2015).

Disease cycle showing functions of different cell morphologies in STB epidemics

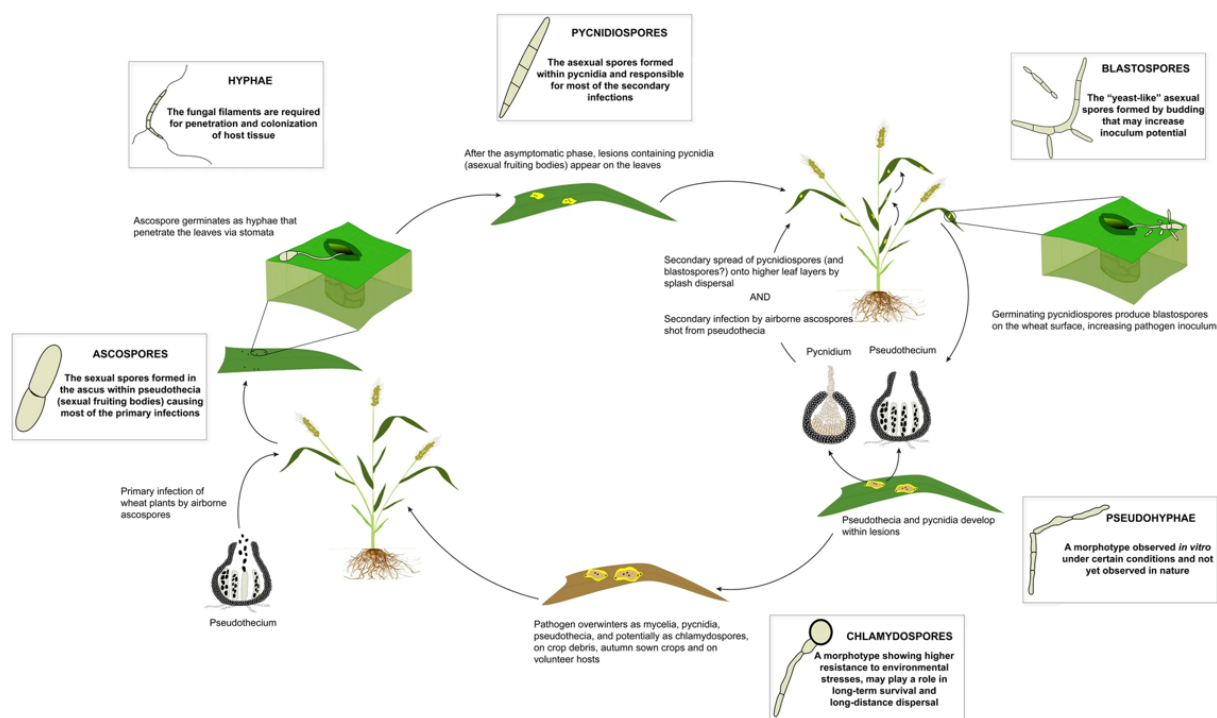


Figure 9 Cycle d'infection représentant le rôle des différentes morphologies de *Z. tritici* dans la septoriose du blé. (Francisco *et al* 2019)

Durant son cycle infectieux, *Z. tritici* (Figure 9) se reproduit de façon sexuelle ou asexuelle, ces phases de reproduction sont associées à des morphologies spécifiques. À la fin de l'automne et au début de l'hiver, les structures de reproduction sexuée de *Z. tritici*, les pseudothèces, présentes sur des débris végétaux issus des cultures précédentes et des graminées communes, libèrent des ascospores (Suffert *et al.*, 2011). Ces ascospores peuvent être transportées par le vent sur de longues distances et, en se déposant sur le blé hôte, constituent l'inoculum primaire. La première phase d'infection est biotrophe, où les ascospores présentes sur les feuilles de blé germent sous forme d'hyphes et colonisent les stomates des feuilles. Après l'infection des stomates, une phase latente de 14 à 28 jours asymptomatiques survient, qui, lors de l'accélération de la croissance de *Z. tritici*, laisse place à la phase nécrotrophe. Cette phase est associée à l'apparition de lésions sur les feuilles du blé-hôte. Ces lésions renferment les formes de reproduction asexuée de *Z. tritici*, les pycnides produisant des pycnidiospores qui peuvent émettre des blastospores par bourgeonnement. Ces formes asexuées constituent l'inoculum secondaire, qui peut se propager aux différents étages foliaires de la plante et aux plantes voisines par les éclaboussures entraînées par la pluie (Fones & Gurr, 2015). À la fin du cycle infectieux, les structures de reproduction sexuée, les pseudothèces, se forment au niveau des nécroses, produisant des ascospores. Ainsi, *Z. tritici* subsiste pendant l'intersaison sous forme de mycélium, de pycnides, de pseudothèces et de chlamydospores, présents

sur les hôtes alternatifs et les débris de culture, qui constitueront l'inoculum primaire de la prochaine culture. (Suffert *et al.*, 2011; Francisco *et al.*, 2019).

Le blé est central dans l'alimentation en Europe. Les conditions climatiques du nord de la France, de l'Allemagne et du Royaume-Uni favorisent le développement de *Z. tritici*. Ce pathogène est considéré comme la principale menace pour la production de blé en Europe. Il a été montré que sans moyen de contrôle, les pertes de rendement peuvent atteindre 50% en cas de forte pluie (Fones & Gurr, 2015).

Pour combattre la septoriose, on adapte les modes de culture. Cela inclut l'enfouissement des résidus de culture entre deux rotations et l'allongement de ces rotations (Pedersen & Hughes, 1992). L'objectif est de détruire l'inoculum de *Z. tritici* (les ascospores) pour éviter l'infection des nouvelles cultures. Le semis tardif du blé réduit également l'infection au printemps par l'inoculum hivernal (Ansar *et al.*, 2010; Suffert *et al.*, 2011). La virulence de *Z. tritici* est également influencée par la densité végétale. Pour réduire cette densité, on peut diminuer les apports azotés et ainsi réduire la densité du feuillage (Leitch & Jenkins, 1995; Ansar *et al.*, 2010). Diminuer le couvert végétal par la réduction de la densité de semis complique la propagation des ascospores (Baccar *et al.*, 2011). Cependant, les méthodes réduisant la biomasse de blé ne sont pas utilisées car elles diminuent directement le rendement.

La lutte variétale, privilégiant l'utilisation de variétés de blé résistantes à la septoriose, est souvent préférée car plus économique et plus respectueuse de l'environnement (Steiner *et al.*, 2017). La résistance peut être totale, empêchant l'infection suite à la détection du pathogène par la plante et l'activation de mécanismes de défense, appelée résistance qualitative impliquant les gènes de résistance *Stb* (21 gènes décrits de *Stb1* à *Stb21* (Chartrain *et al.*, 2004)). À la résistance qualitative s'ajoute ce que l'on appelle la résistance quantitative, issue de l'accumulation de plusieurs mutations.

L'utilisation de produits chimiques reste le moyen de lutte le plus courant contre la septoriose (Torriani *et al.*, 2015). Le but est de prévenir l'apparition de la maladie ou de la traiter en ralentissant ou tuant *Z. tritici*. Les classes de produits antifongiques sont définies selon leur mode d'action.

Le contrôle de *Z. tritici* repose principalement sur l'utilisation de fongicides ciblant deux voies métaboliques clés : La respiration mitochondriale est ciblée par trois classes de fongicides : les SDHI, qui inhibent la succinate déshydrogénase (complexe II de la chaîne respiratoire), les QoI, qui bloquent l'activité du cytochrome b (complexe III de la chaîne respiratoire) en se fixant au site extérieur (Outside) de la quinone (Qo), et enfin les QiI, qui agissent sur la même enzyme mais en se liant au site intérieur (inside ; Qi). La synthèse des stérols est ciblée par les IDM (Inhibiteurs DeMethylase) de classe I (les triazoles). À cela s'ajoute une classe de fongicides multisites, incluant

le soufre et le folpet. En résumé, le contrôle de *Z. tritici* par les fongicides vise deux voies métaboliques principales grâce à l'utilisation de 5 classes de fongicides, représentées par 13 familles chimiques qui comprennent au total 23 molécules actives autorisées sur le marché français. (Tableau II)

Tableau II Mode d'action des fongicides utilisés contre *Zymoseptoria tritici* adapté de Garnault et al 2019

Biochimie			Structure chimique		Molécule active	Autorisation en France		
Voie métabolique principale	Site de fixation / cible / Mode d'action	Abbréviation	Classe principale	Classe secondaire		Enregistrement	Première année d'utilisation	Retrait en France
Mitochondrie / respiration	Complex II or succinate dehydrogenase Binding site of ubiquinone involving the subunits SdhB, SdhC and SdhD.	SDH	Carboxamides	Benzamides	Fluopyram	2016	2017	-
				Nicotinamides	Boscalide	2006	2007	-
				Pyrazole-carboxamides	Benzovindiflupyr	2016	2017	-
					Bixafen	2011	2011	-
	Penthiopyrad	2014	2014		-			
	Fluxapyroxad	2011	2011	-				
	Complex III or cytochrome bc1. Binding site of ubiquinone to cytochrome b at the "o" center (proton output) in the heme b1 proximal domain	Qol (or Qol-P)	Synthetic strobilurins and analogs	Methoxy-acrylates	Azoxystrobin	1996	1997	-
					Picoxystrobin	1999	2000	2018
				Methoxy-carbamates	Pyraclostrobin	2000	2000	-
				Oximino-acetates	Kresoxim-methyl	1996	1997	2013
					Trifloxystrobin	2001	2002	-
				Oximino-acetamides	Dimoxystrobin	2009	2010	-
					Fluoxastrobin	2006	2006	-
Tetrazolinone	Metyltetraprole	2022?	-	-				
	Fenpicoxamid	2020	2021	-				
Complex III or cytochrome bc1 complex. Ubiquinone Qi binding site.	Qil	Carboxamides	Picolinamides	Florypicoxamid	-	-	-	
Biosynthèse des Stéroïdes	Binding to sterol 14 α -demethylase (syn. CYP51)	DMI or SBI-DM	Heterocyclic compounds	Imidazoles	Prochloraz	1980	1980?	-
					Bromuconazole	1994	1995	-
				Triazoles	Cyproconazole	1987	1987	-
					Difenoconazole	1988	2011	-
					Epoconazole	1992	1992	2020
					Fenbuconazole	1991	1992	-
					Fluquinconazole	1997	1998	2016
					Flusilazole	1985	1986	2013
					Flutriafol	1983	1984	2015
					Hexaconazole	1990	1990	2007
					Metconazole	1993	1994	-
					Propiconazole	1980	1980?	2019
					Tebuconazole	1988	1989	-
					Tetraconazole	1991	1991?	-
Triadimenol	1987	1988	2014					
Mefenflucconazole	2019	2020	-					
Triazolinediones	Prothioconazole	2006	2006	-				
Multisite		MSI	Halogenated alkyl-thio compounds	Phthalamides	Folpet	2003	2003	2009 (reintroduced in 2020)
			Sulphur-based mineral substance		Elemental sulphur	1942	1942?	-

I.4.2. La MDR chez *Z. tritici*

Le contrôle chimique de la septoriose représente 70% de l'usage de fongicides en Europe (Torriani *et al.*, 2015). Cependant, l'efficacité de ces fongicides est menacée par l'émergence de résistances sur le terrain, principalement liées à la cible et affectant quatre des cinq classes de fongicides - SDHI, QoI, QiI et IDM. Depuis 2009, des isolats au phénotype de résistance multidrogue (MDR) ont été identifiés dans des souches présentant par ailleurs des résistances aux IDM et QoI (Leroux & Walker, 2011). L'hypothèse selon laquelle des mécanismes d'efflux pourraient contribuer à la résistance aux IDM, en plus des résistances liées aux cibles, a été soutenue par la résistance observée aux fongicides dont le mode d'action n'est pas utilisé en agriculture, mais dans le secteur médical, comme les inhibiteurs de la squalène époxydase. L'implication de l'efflux dans cette hypothétique MDR a été confirmée par la réduction de la résistance des souches MDR à différents modes d'action lors de l'utilisation d'inhibiteurs d'efflux tels que le vérapamil, l'amitriptyline et le chlorpromazine (Leroux & Walker, 2011).

Les transporteurs ABC, initialement envisagés comme acteurs de la MDR chez *Z. tritici*, sont codés par les gènes *ZtATR1*, *ZtATR2* et *ZtATR4*, et présentent des similitudes avec les gènes codant les transporteurs ABC *PDR5* de *S. cerevisiae* et *AtrA* de *B. cinerea*. Leur capacité à utiliser les IDM comme substrats a été démontrée *in vitro* (Zwiers *et al.*, 2003), bien que leur lien avec la résistance au champ reste non établi (Stergiopoulos *et al.*, 2003). C'est le transporteur MFS *ZtMFS1* qui est impliqué dans la MDR chez *Z. tritici*, caractérisé *in vitro* pour sa ressemblance avec le transporteur *BcMfsM1* trouvé chez *B. cinerea*, il a une plus forte capacité d'efflux de fongicides azolés et de strobilurine que *ZtATR1* (Roohparvar *et al.*, 2007b, 2007a; Roohparvar, 2008). La mesure des profils d'expression dans les souches MDR détectées au champ à partir de 2008 a montré que *ZtMFS1* est surexprimé de façon constitutive chez les souches présentant un phénotype MDR (Omrane *et al.*, 2015). Ce mécanisme, qui permet d'augmenter le niveau de résistance lié à *MFS1* chez *Z. tritici*, est celui de l'efflux accru. En effet, il a été montré que l'accumulation de prochloraz était plus forte chez des souches sensibles que chez des souches MDR surexprimant *MFS1*, et que l'utilisation de modulateurs inhibant l'activité des pompes à efflux augmenterait l'accumulation de prochloraz chez les souches MDR (Omrane *et al.*, 2015). Chez des souches MDR du champ, l'inactivation de *MFS1* réduit leur résistance aux SDHI et aux inhibiteurs de la squalène époxydase à des niveaux similaires à ceux des souches sensibles. La surexpression constitutive de *MFS1* chez les souches de *Z. tritici* MDR est liée à la présence d'inserts dans le promoteur. Les premiers inserts détectés ont été nommés type I, IIa, IIb et III (Omrane *et al.*, 2017). Ces inserts se différencient par leur taille et leur position. L'insert de type I est celui qui permet la surexpression constitutive la plus forte de *MFS1*, suivi par les inserts de type IIa et IIb, puis III. L'implication de *MFS1* dans

l'augmentation de la résistance basale à différents fongicides a soulevé des interrogations quant à une éventuelle perte de fitness induite par ce mécanisme. L'équipe a montré que la MDR liée aux inserts n'entraînait pas de perte de fitness en conditions contrôlées chez les souches de *Z. tritici*. On peut donc imaginer que la MDR présente un fort risque de dispersion de recombinaison avec d'autres mécanismes de résistance (<https://ecophytopic.fr/recherche-innovation/prevenir/projet-mdrisque>). Il a été montré que la MDR avait un risque d'augmenter dans les populations des champs, en particulier lors de l'application de mélanges de différentes classes de fongicides (Garnault *et al.*, 2019; Ballu *et al.*, 2021). Depuis 2012, l'évolution de la MDR chez les populations de *Z. tritici* est évaluée dans les champs en France comme à l'étranger notamment grâce au réseau performance (Garnault *et al.*, 2019). Le suivi de la MDR dans les champs se fait de deux manières différentes : 1) en phénotypant les souches pour leur capacité à résister aux inhibiteurs de la squalène époxydase, tolnoftate et terbinafine, soulignant ainsi leur résistance non liée à la cible. 2) par méthode moléculaire en détectant la présence d'inserts par PCR.

La détection par phénotypage a montré que le phénotype MDR a légèrement augmenté en fréquence dans les populations françaises entre 2019 et 2023 (Notes communes gestion des adventices 2019 à 2023 sur <https://www.arvalis.fr/infos-techniques>). La détection de la MDR par PCR a montré la présence de nouveaux inserts (Huf *et al.*, 2020). Récemment, deux inserts, dont l'un issu d'un événement de transposition, ont été détectés sur le terrain, mais ne sont pas liés au phénotype MDR (Mäe *et al.*, 2020; Lavrukaitė *et al.*, 2023). Ainsi ces dernières années, parallèlement à l'augmentation de souches détectées ayant un phénotype MDR sur le terrain en Europe, de nouveaux inserts dans le promoteur de *MFS1* ont été détectés, sans pour autant être systématiquement liés à la MDR (Fig. 10).

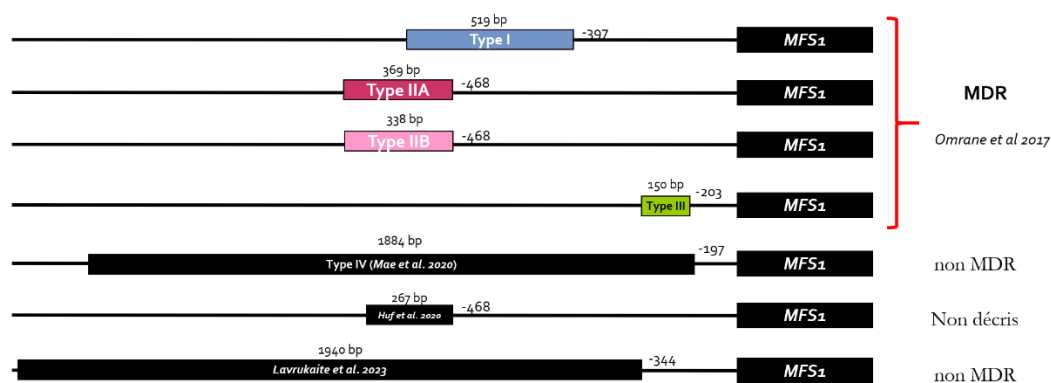


Figure 10 Diversité des inserts connus dans le promoteur de *MFS1* chez *Z. tritici* et phénotype MDR associé.

I.5. Problématique

De ces observations découlent plusieurs questions :

1 - Pourquoi certains inserts confèrent-ils la MDR et d'autres non ? En particulier, existe-t-il des séquences cis spécifiques dans certains inserts entraînant la surexpression de *MFS1* ?

2 – Y a-t-il d'autres acteurs impliqués dans la MDR chez les souches de champ ?

Dans cette thèse, nous aborderons ces questions par un inventaire extensif de souches MDR du nord de l'Europe et en analysant la diversité génétique du promoteur de *MFS1* en lien avec le phénotype MDR. Parallèlement, nous chercherons à vérifier l'implication des motifs de régulation hypothésés dans les travaux précédant cette thèse (Omrane *et al.*, 2017).

II. Étude de la diversité génotypique et phénotypique de la MDR dans des populations récentes de *Z. tritici* d'Europe de l'ouest

II.1. Avant-propos

Cette thèse s'inscrit dans le prolongement des travaux qui ont mis en évidence l'implication d'inserts dans le promoteur *MFS1* dans le phénotype MDR (Omrane *et al.*, 2015, 2017) ainsi que les suivis annuels de l'équipe qui ont mis en évidence la progression du phénotype MDR dans les populations de *Z. tritici* française (Notes communes gestion des adventices 2019 à 2023 sur <https://www.arvalis.fr/infos-techniques>).

Dans cette étude, l'approche adoptée a consisté à isoler un grand nombre de souches potentiellement MDR contemporaines, à partir de populations d'Europe de l'ouest isolées sur des doses discriminantes des inhibiteurs de la squalène époxydase la terbinafine et le tolnaftate. Cette démarche s'est fondée sur l'hypothèse que la résistance à la terbinafine et au tolnaftate, deux fongicides dont le mode d'action n'ont jamais été utilisé sur le terrain, pourrait indiquer la présence de mécanismes MDR chez *Z. tritici* (Leroux & Walker, 2011).

Chaque année, l'équipe GAIA analyse, à travers le réseau Performance en collaboration avec Arvalis, Végéphyll et des entreprises phytosanitaires, la résistance des populations de *Z. tritici* sur le terrain en évaluant in vitro le taux de germination sur différentes modalités de fongicides des spores récoltées sur des plants de blé. Dans ce contexte, j'ai procédé à l'isolement de souches potentiellement MDR à la suite de la campagne de suivi menée par l'équipe GAIA. À cela se sont ajoutées des souches potentiellement MDR isolées par des partenaires européens (Allemagne, Angleterre, Belgique, Danemark, Estonie, Irlande, Lituanie). Les études précédentes ont suggéré une préférence d'insertion d'éléments transposables dans le promoteur de *MFS1*. (Omrane *et al.*, 2017; Lavrukaitė *et al.*, 2023). Nous avons donc analysé toutes les nouvelles séquences d'insert pour d'éventuelles signatures d'éléments transposables. Par conséquent, nous avons décidé de vous présenter ici un aperçu concis de l'état actuel des connaissances sur les éléments transposables, avant de passer à la présentation de nos résultats.

II.1.1. Les transposons chez les champignons

Les transposons ou éléments transposables (TEs) sont des séquences d'ADN pouvant se déplacer dans le génome, retrouvées chez quasiment tous les organismes. Ces éléments peuvent, en fonction de l'endroit où ils s'insèrent, moduler l'expression des gènes. La modulation de l'expression des gènes peut se faire au niveau de la transcription ou de façon post-transcriptionnelle: En s'insérant dans la séquence codante d'un gène, les transposons peuvent empêcher l'expression de ce dernier ou la production d'une protéine fonctionnelle. Un transposon, en s'insérant dans le promoteur d'un gène, pourra introduire un nouveau site d'initiation de la transcription

(transcription start site, TSS). Il pourra aussi perturber des fonctions cis de régulation initialement présentes dans le promoteur. Un transposon s'insérant dans le promoteur d'un gène pourra apporter également de nouveaux éléments de régulation comme des domaines de fixation pour des facteurs de transcription.

Les TEs, par leur capacité à se multiplier dans les génomes sont souvent décrits comme des éléments égoïstes et ayant des conséquences délétères pour la fitness des organismes, en favorisant l'expansion des génomes (Raffaele & Kamoun, 2012), les réarrangements chromosomiques, des délétions et duplications (Charlesworth & Charlesworth, 1983; Petrov *et al.*, 2003). Contre ces effets délétères, les génomes possèdent des mécanismes de défense contre les TEs (Le Rouzic & Capy, 2005), qui reposent principalement sur la répression de l'expression des TEs au niveau épigénétique ou de la mutation des séquences des TEs, réduisant leur capacité à proliférer (Daboussi & Capy, 2003; Lisch & Bennetzen, 2011).

Chez certains champignons ascomycètes, un des mécanisme de défense des génomes permettant de réguler la prolifération des TEs est appelé le **RIP** pour "**R**epeat-**I**nduced **P**oint mutation" (Hane *et al.*, 2015; Gladyshev, 2017). Ce mécanisme induit des mutations dans des séquences répétées comme les TE. En induisant la méthylation de l'ADN des séquences répétées. Les acteurs enzymatiques impliqués dans le RIP sont DIM-2 et RID. Le RIP permet la détection de séquences répétées à partir de ~0.4 kpb et induit des mutations des cytosines en thymines chez les TEs, qui de ce fait perdent leur capacité à proliférer dans le génome. Ces signature du RIP peuvent être détectées par analyse des séquences permet de déterminer si les TEs présents dans un génome ont été soumis au RIP (John Clutterbuck, 2011). Chez *Z. tritici*, le mécanisme RIP a été détecté en premier chez IPO323 (Dhillon *et al.*, 2014). La signature du mécanisme RIP diffère chez d'autres espèces de *Zygomycota*, mais l'espèce *tritici* est celle possédant une signature RIP la moins présente (Lorrain *et al.*, 2021), suggérant une plus grande susceptibilité à l'émergence de TEs dans son génome. Chez *Z. tritici*, les TE sont compartimentés et sont retrouvés notamment dans les chromosomes accessoires (Goodwin *et al.*, 2011; Feurtey *et al.*, 2020).

Il existe une multitude de types de transposons, mais ils partagent tous la caractéristique commune d'être une séquence d'ADN qui peut se déplacer dans le génome. Les TEs sont donc classés en fonction de : **1 - la façon dont ils se déplacent, 2 - leur mode d'intégration, et 3 - le contenu de leur séquence.** Ainsi, le premier niveau de différenciation se fait au niveau du mode de déplacement, selon qu'ils utilisent ou non un intermédiaire à ARN. On distingue deux classes :

- **La classe I, ou Rétrotransposons, ou transposons à ARN**, se déplace en se **multipliant grâce à un à intermédiaire ARN**, rétrotranscrit ensuite en ADNc.

- **La classe II, ou Transposons à ADN**, se déplace par excision et réintégration dans l'ADN. Ces transposons **ne se multiplient pas par l'intermédiaire de l'ARN**.

Le mécanisme de déplacement est également décrit comme "copier-coller" pour les rétrotransposons (classe I) et "couper-coller" pour les transposons ADN (classe II) (Finnegan, 1989). Le deuxième niveau de classification, la sous-classe, est défini par le mode d'intégration des transposons une fois rétro-transcrits (pour les rétrotransposons), ou excisés pour les transposons ADN dans le génome. Enfin, le 3ème niveau de classification, la famille, est défini par le contenu des séquences des transposons.

Les rétrotransposons de par leur mécanismes copier-coller, peuvent se multiplier rapidement, et sont les principales causes d'éléments répétés dans les génomes des plantes (Kumar & Bennetzen, 1999; Sabot & Schulman, 2006). Parmi les rétrotransposons, on distingue la famille des Long Terminal Repeat (LTR), qui sont les éléments transposables les plus abondants chez les plantes, avec une taille pouvant varier de 100 à 25 000 pb. Ces derniers se caractérisent, comme leur nom l'indique, par des longues séquences terminales répétées dont la taille peut varier de 100 à 5000 pb. Ces rétrotransposons se distinguent aussi par la signature du site cible de duplication de 4 à 6 pb après leur intégration dans le génome. Les LTR possèdent des séquences codant pour la transcriptase inverse (RT), les protéines capsidiques (GAG) et les intégrases (INT) pour l'intégration de l'ADNc dans le génome.

Les éléments transposables sont souvent associés à des régions génomiques évoluant rapidement, liées à la virulence ou à la tolérance au stress chez les champignons filamenteux (Möller & Stukenbrock, 2017; Seidl & Thomma, 2017). Par exemple, chez *Leptosphaeria maculans*, les gènes codant des effecteurs sont colocalisés avec des éléments transposables (Grandaubert *et al.*, 2014). Lors de l'infection de l'hôte, l'expression des effecteurs est régulée de façon épigénétique (Soyer *et al.*, 2014). La décondensation de la chromatine, qui permet l'expression des effecteurs, permet aussi de réactiver l'expression des TEs colocalisés avec ces derniers. La co-régulation des effecteurs et des éléments transposables permet une forte variabilité des gènes codant les effecteurs et est un moteur de l'adaptation du pathogène *L. maculans* à son hôte *Brassica napus* (Soyer *et al.*, 2021). Un tel mécanisme de dérégulation des TE lors de la phase d'infection a aussi été détecté chez *Z. tritici* (Fouché *et al.*, 2020). Chez *Z. tritici*, 17 % du génome de IPO323 est composé d'éléments répétés (Dhillon *et al.*, 2014) et 70 % de ces éléments répétés sont des éléments transposables de classe I.

Les éléments transposables peuvent être impliqués dans la régulation de l'expression des gènes chez *Z. tritici*, c'est le cas d'un gène impliqué dans la voie de biosynthèse de la mélanine (Krishnan

et al., 2018) ou du paralogue ZtSDHC3 impliqué dans la résistance aux SDHI (Steinhauer *et al.*, 2019).

Concernant la MDR, la plus forte expression constitutive du gène *MFS1* est due à la présence d'un insert dont la séquence comporte des traces d'un rétrotransposon LTR Ty1/copia, suggérant l'implication d'événements de transposition dans l'adaptation aux fongicides. Toutefois, chez une souche retrouvée en Lituanie en 2018, la présence d'un transposon de type TIR de 1884 pb dans le promoteur de *MFS1* n'est pas liée à la MDR (Mäe *et al.*, 2020). La présence de transposons de classe I ou II en amont de gènes chez *Z. tritici* peut donc être un moteur d'adaptation aux stress environnementaux, mais la cause de leur présence reste encore floue. C'est pour cela que nous nous avons investigué la présence d'autres éléments transposables pouvaient être trouvés dans le promoteur du gène *MFS1* dans des souches MDR. Pour cela, nous avons isolé 384 souches potentiellement MDR entre 2020 et 2021 en Europe de l'ouest. L'analyse et l'identification systématique de traces d'événements de transposition dans le promoteur de *MFS1* nous a permis d'identifier, avec les inserts des études précédentes, 11 inserts dans le promoteur de *MFS1* liés à des événements de transposition.

Les résultats de cette analyse sont présentés sous forme de publication publié sur bioRxiv (Patry-Leclaire *et al.*, 2023 « Plasticity of the *MFS1* promotor is not the only driver of Multidrug resistance in *Zymoseptoria tritici* ». doi : <https://doi.org/10.1101/2023.12.27.573052>)

II.2. Manuscrit de l'article "Plasticity of the *MFS1* promotor is not the only driver of Multidrug resistance in *Zymoseptoria tritici*"

Plasticity of the MFS1 promotor is not the only driver of Multidrug resistance in *Zymoseptoria tritici*

Authors : Simon Patry-Leclaire, Elza Neau, Anaïs Pitarch, Anne-Sophie Walker, and Sabine Fillinger

Background

Multidrug resistance has been identified in the fungal pathogen responsible for Septoria leaf blotch, *Zymoseptoria tritici*, since 2011. It has been linked to the overexpression of the gene encoding the MFS1 transporter due to inserts in the promoter region of *MFS1* (P_{MFS1}), namely types I-III. Recently, two new inserts were discovered in P_{MFS1} that were not linked to MDR, interrogating about whether P_{MFS1} inserts are the only drivers of MDR in *Z. tritici*.

The goal of our study was to gain a more complete view of MDR in *Z. tritici* by examining the genotypic diversity associated with the MDR phenotype in a large sample of the modern population.

Results

We isolated 384 potential MDR strains between 2020 and 2021 in northern Europe for P_{MFS1} genotype and MDR assessment. We discovered six new inserts in P_{MFS1} , bringing the total count to 13 including one insertion-deletion in the 5' UTR region. Of these, 11 display similarities with transposable elements, and 3 are not linked to MDR. Some field strains were significantly more resistant than their respective reference of the same P_{MFS1} genotype and some strains without insert displayed MDR phenotype.

Conclusion

We described the landscape of the MDR in modern *Z. tritici* population and postulate that P_{MFS1} is a hot-spot for insertions involving transposition events. Our study shows that MDR cannot be solely explained by inserts found in P_{MFS1} , and that additional mechanisms might be at work.

Introduction 2023

The ascomycete *Zymoseptoria tritici* causes Septoria leaf blotch in wheat, leading to significant yield losses worldwide (Fones & Gurr, 2015). This widespread pathogen affects both bread wheat and durum wheat, and is the most damageable wheat pathogen in Europe particularly in temperate climates (Klink et al., 2021; Torriani et al., 2015).

Besides the use of resistant or tolerant wheat varieties, the most commonly used control method to decrease the impact of *Z. tritici* in the field, is the application of fungicides. Several unisite fungicides with different modes of action are recommended for use in the field, targeting various but specific metabolic enzymes. They include succinate dehydrogenase inhibitors (SDHIs), 14-demethylation inhibitors (DMIs), and since very recently the quinone inside inhibitor (Qil) fenpicoxamid, while quinone outside inhibitors (QoI) have lost efficacy against STB due to generalized resistance (Garnault et al., 2019). Inhibitors targeting multiple cellular targets such as sulfur or folpet may also be applied, especially as preventive, first treatment, eventually in association with a unisite fungicide .

However, *Z. tritici* has developed resistance against single-site fungicides (reviewed by Lucas et al., 2015). These resistances can either occur through target-site modifications generally inducing alterations in the fungicide binding site or through the overexpression of the fungicide target. This is the case for DMI resistance, where target mutations in *CYP51* have steadily increased since their introduction in the 1970s, with the frequency of these mutations rising in field populations in Europe (Garnault et al., 2019; Huf et al., 2018).

In addition to target-site resistance, non-target site resistance may occur through several processes with variable effects on fungicide efficacy, most of which are still misunderstood in fungal plant pathogens (Hu & Chen, 2021). Probably, the most prominent mechanism is increased efflux leading to multidrug resistance (MDR), conferring unspecific resistance to unisite fungicides. MDR has been revealed in some plant pathogenic fungi so far (e.g., *Botrytis cinerea*, *Oculimacula spp.*, *Penicillium digitatum* & *P. expansum*, *Clariireedia homoeocarpa* (formerly *Sclerotinia homoeocarpa*), and *Z. tritici* (Kretschmer et al., 2009; Leroux et al., 2013; Sang & Hulvey, 2018; Sun et al., 2013)).

In *Z. tritici* MDR confers moderate resistance to SDHIs, Qols, and DMIs (Leroux & Walker, 2011; Omrane et al., 2015), but combined to target-site resistance MDR leads to particularly high resistance factors as in the case of DMI resistance. *In vitro*, the selection of multidrug resistant strains of *Z. tritici* was favored by alternation or mixture of fungicides (Ballu et al., 2021).

Multidrug resistance has been characterized in some plant pathogenic fungi: in *Botrytis cinerea*, MDR is linked to the overexpression of the ABC transporter gene *BcAtrB* caused by a gain-of-function mutation in the transcription factor *BcMrr1*. MDR is also associated with the insertion of a retrotransposon in the promoter region of the gene encoding an MFS transporter (*BcMfsM2*) (Kretschmer et al., 2009). In *Clariireedia homoeocarpa* multidrug resistance is linked to the joint overexpression of three CYP450 encoding genes and two ABC transporter encoding genes (Sang & Hulvey, 2018). The joint overexpression of these genes involved in phase I and III detoxification pathways is due to a gain-of-function mutation in the transcription factor (ShXDR1). The heterologous expression of this transcription factor SHXDR1 confers MDR to transformed *B. cinerea* strains.

Multidrug resistance (MDR) in *Z. tritici* has been associated with drug efflux as well (Omrane et al. 2015). This drug efflux mechanism is regulated by the expression of *MFS1*, a gene encoding an MFS transporter that enhances the efflux of DMIs, Qols, and SDHIs outside the cytoplasm (Fouché et al., 2022, Omrane et al. 2015, 2017). It has been observed that *MFS1* overexpression is due to the insertion of a 519 bp element in its promoter region, which was the first insert identified and characterized in relation to the MDR phenotype in this pathogen. Subsequently, type II and III inserts were detected in the *MFS1* promoter (P_{MFS1} ; Omrane et al., 2017). From 2008 to 2017, the landscape of MDR strains was predominantly dominated by the genotype harboring the type I allele (75%) (Garnault et al. 2019). In 2018 and 2021 respectively, new inserts (furtheron named type IV and V inserts) were found but were not associated with the MDR phenotype (Lavrukaitė et al. 2023; Mäe et al. 2020). A population survey using PCR around the previously identified *MFS1* promoter inserts revealed an unsuspected P_{MFS1} allele diversity (at least 8 different amplicon sizes; Huf et al, 2020).

Concerning the origins of these insertions, the type I insert corresponds to an LTR transposon (Omrane et al., 2017), and also type IV was classified as potential transposon (Maë et al., 2020), suggesting frequent transposition events in the promoter region of *MFS1*. Transposable elements (TEs) play a significant role in the evolution and adaptation of plant pathogens (Möller & Stukenbrock, 2017; Oggenfuss et al, 2023; Singh et al., 2021). These mobile genetic elements are ubiquitous in the genome of *Z. tritici* (Lorrain et al. 2021) with a proportion in the genome between 14 to 21.5 % (Badet et al., 2020). They are found in higher density within the core chromosomes of the genome, and the analysis of their

insertion frequencies in around twenty genomes suggests the existence of TE burst centers (Oggenfuss et al. 2023).

In the field, multidrug resistance (MDR) detection is commonly achieved through genotyping using endpoint PCR (Huf et al., 2018; Lavrukaitė et al., 2023; Mäe et al., 2020; Omrane et al., 2017). However, the reliability of a single PCR method in accurately identifying MDR without the occurrence of false negatives or false positives is of critical concern. Therefore, the objective of this study was to evaluate the P_{MFS1} genotypic diversity and the MDR phenotypic diversity of *Zymoseptoria tritici* in Europe during the period of 2020-2021, with the aim of establishing the correspondence between genotype and MDR phenotype. Our study revealed unprecedented promoter diversity at the *MFS1* locus; albeit not all inserts lead to MDR. Interestingly, some strains with known P_{MFS1} genotypes but higher MDR levels hint to additional mechanisms involved in multi-drug resistance in *Z. tritici*.

Results

Large-scale sampling of *Z. tritici* MDR isolates

Isolates of *Z. tritici* were gathered in Northern Europe in 2020 and 2021. Most of the populations used for this study were collected from fields in France and provided by the "Performance network" (Garnault et al. 2019). To isolate potential MDR strains we inoculated spore-solutions from wheat leaves on Petri dishes containing the medical fungicides tolnaftate or terbinafine at their respective discriminating concentrations (adapted after Leroux & Walker, 2011; Experimental procedures). Both molecules are inhibitors of squalene epoxidase (Ryder et al. 1992). By this way, we obtained 282 potential MDR isolates from France; other isolates were provided by our collaborators, namely 28 from Germany, 26 from the United Kingdom, 23 from Ireland, 12 from Lithuania, six from Belgium, two from Estonia and one from Denmark (Table S1). It has to be highlighted that only MDR isolates from France were selected on terbinafine or tolnaftate, while those from other countries had been selected for their particular *MFS1* gene promoter (P_{MFS1}) genotypes or their resistance phenotypes to terbinafine or tolnaftate.

We then genotyped the promoter of the *MFS1* gene (P_{MFS1}) of all 384 isolates by PCR as previously described using the primer pair 2F-4R (Omrane et al, 2017). The results show a higher diversity than expected. Namely, we found strains with previously unidentified inserts, but also potential MDR strains without inserts. The most frequent P_{MFS1} alleles were of type I and type II (Table S1). Roughly 12% of the strains had no insert (n=46); the P_{MFS1} type III allele was found less frequently (<6%) in addition to other genotypes either with previously unknown inserts (see below) or one isolate whose promoter sequence could not be amplified and sequenced.

Table 1: Summary of inserts detected in P_{MFS1} in previous and the present study. Inserts are listed according to their localization relative to the start codon. Insert numbering is chronological according to time of discovery.

position relative to start codon (bp)	Insert size (bp)	Insert name	Reference
-108	Insertion/deletion (164/678)	Indel VIII	This study
-197/194	1884	type IV	Mäe and al., 2020
-203	150	type III	Omrane and al., 2017
-215	360	type VI	This study
-344	1940	type V	Lavrukaite et al., 2022 / This study
-397	519	type I	Omrane et al., 2017

-468	369	type IIA	Omrane and al., 2017
-468	338	type IIB	Omrane and al., 2017
-468	267	IIC	This study
-468	339	IID	This study
-468	298	IIE	This study
-468	328	IIF	This study
-468	327	type VII	This study

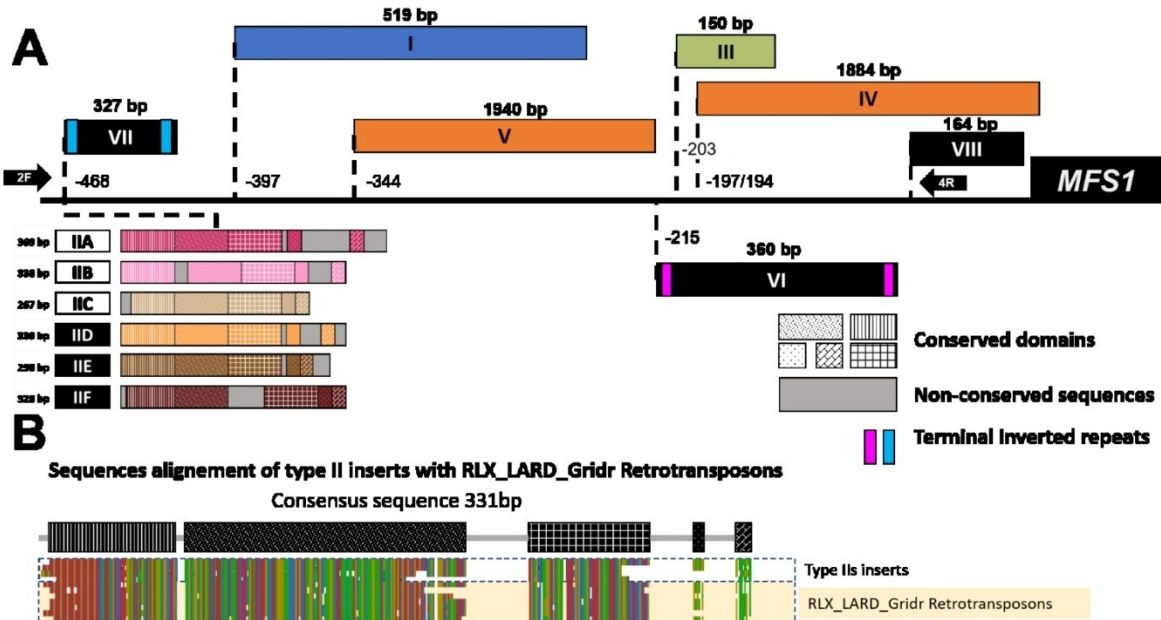


Figure 1 Molecular structure of MFS1 promoter genotypes. A/ Insertion sites, sizes, and representation of the different inserts; those discovered in this study depicted in black. Terminal inverted repeats are highlighted in fuchsia and turquoise. Additionally, conserved domains in type 2 inserts are shown as filled patterns, while non-conserved domains are represented in gray. B/ Alignment of consensus sequences of type II inserts with the end of retrotransposons RLX_LARD_ridr found in the genome of *Z. tritici*, highlighted in yellow. Bases in type II insert and retrotransposon alignments are color-coded: A in green, T in red, G in yellow, and C in blue, with mismatches between the consensus sequence and the aligned sequence indicated by the absence of a base.

New inserts detected in P_{MFS1}

Table 1 summarizes the current knowledge of *MFS1* promoter inserts from previous (Lavrukaitė et al., 2023; Mäe et al., 2020; Omrane et al., 2017) and the present study. We have arbitrarily numbered all known and sequenced inserts chronologically according to the date of their discovery. Five new inserts were identified at the same insertion locus (at position -468 relative to the *MFS1* start codon) as the previously reported type II inserts (IIA and IIB). Among the newly detected inserts, four (IIC, IID, IIE, and IIF) share conserved domains with the previously described type II inserts, ranging in size from 267 bp to 339 bp. The fifth insert, however, does not exhibit any similarity with the type II inserts and was therefore referred to as the type VII insert. Further analysis using the reannotated genome of

Z. tritici (Lapalu 2023) revealed that the conserved domains (totaling five) of type II inserts show similarities with retrotransposons from the RLX_Lard_Gridr family (Figure 1B).

Additionally, with the new annotated genome, we found that the entire type III insert aligns with the end of annotated transposable elements located on chromosomes 1, 8, 10, and 12. These transposable elements vary in size from 625 bp to 7060 bp.

Another new insert, measuring 360 bp, was identified in P_{MFS1} at a novel insertion site (-215 from the start codon of *MFS1*) and was designated as the type VI insert. Additionally, a new insertion was detected in a French isolate. Initially, this insertion could not be detected using the routine 2F-4R primer pair, as it failed to yield an amplification product. However, by designing new primers located relatively up- and downstream from the 2F-4R primer pair (see Experimental Procedures), we were able to successfully amplify the promoter region. Sequencing revealed a deletion of 678 bp between nucleotides 786 and 108 bp upstream of the start codon. Alongside this deletion, an insertion of 164 bp was detected. We have named this insertion/deletion “indel VIII”.

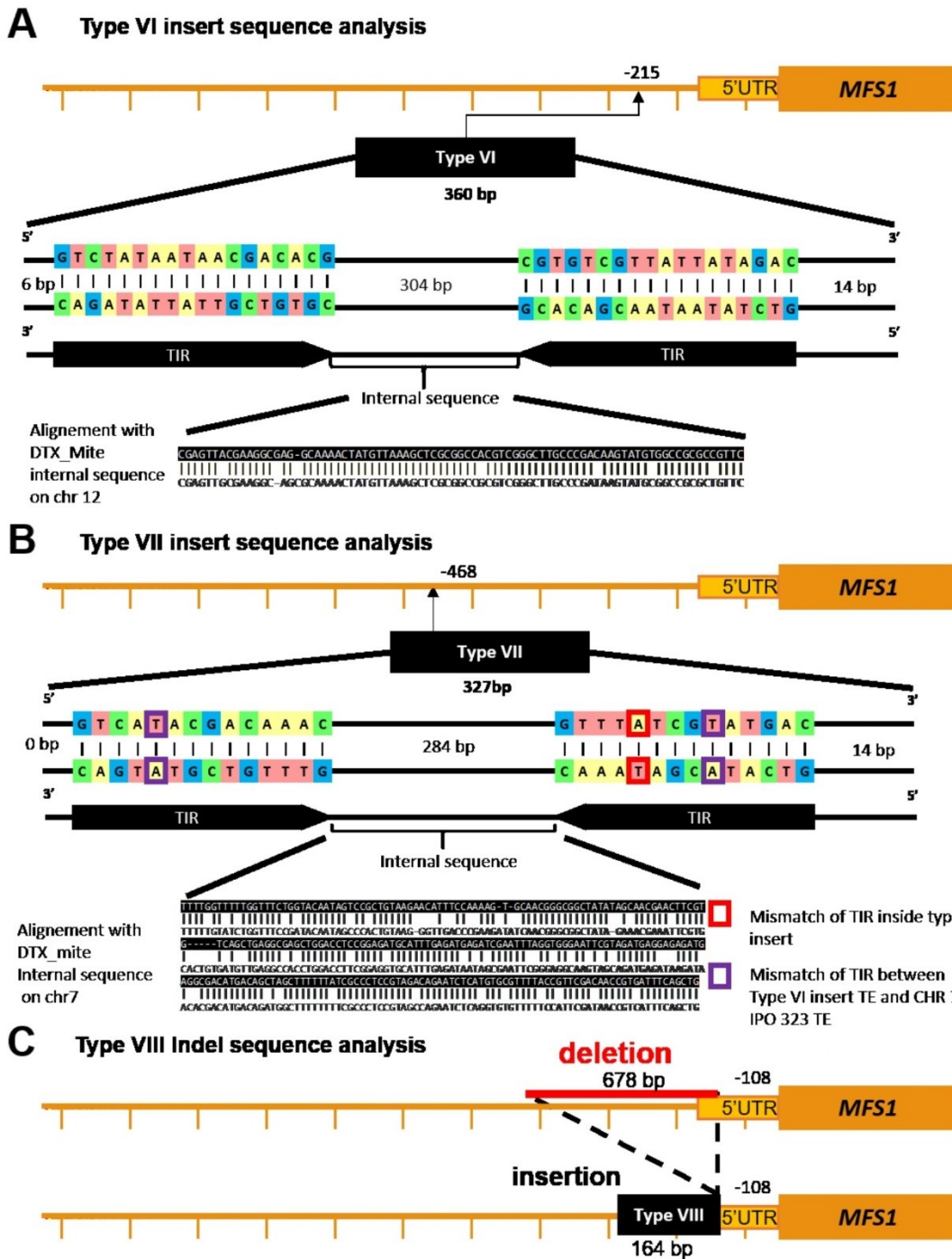


Figure 2 : Molecular structure of the new P_{MFS1} inserts found in *Z. tritici* field isolates. Insertion site position relative to the start-codon and length of the inserts are indicated. Coloured bases represent terminated inverted repeat (TIR) pairs identified in insert types VI and VII. Alignments with known sequences from other genomic regions are displayed.

Both new inserts, type VI and VII, correspond to miniature inverted repeat transposable elements (MITEs) (Badet et al. 2021). They contain short conserved terminal inverted repeats (TIRs) of 18 bp for the type VI insert and 14 bp for the type VII insert, respectively. Aligning the type VI insert sequence on the *Z. tritici* reference genome (Goodwin et al., 2011

(Lapalu et al., 2023) shows 91.57% identity to 89 bp of the internal sequence of another DTX MITE of a total size of 402 bp localized on chromosome 12 (Fig. 2). From the internal sequences of the type VII insert, 256 base pairs align with the internal sequences of a 323-base pair long DTX_MITE with 76.17% identity. This DTX_MITE transposable element was identified upstream of a gene encoding a putative unnamed protein on chromosome 7 (annotated with Ingeannot Lapalu et al., 2023). For the Indel VIII the 678 bp deletion affects a portion of the 5'UTR region, removing 58 bp out of 166 bp. The inserted sequence does not show similarity to a known transposable element nor typical TE structure (according to most recent annotation of *Z. tritici* genomes).

Resistance profiles vary among P_{MFS1} genotypes

To validate terbinafine resistance and to establish MDR resistance profiles we tested 333 isolates from our 2020-2021 collection of *Z. tritici* through a droplet growth test on terbinafine and tolnaftate on a range of concentrations. We classified the resistance profiles into three categories, from low to high resistance according to the growth patterns observed (Table S.1, Figure S3)

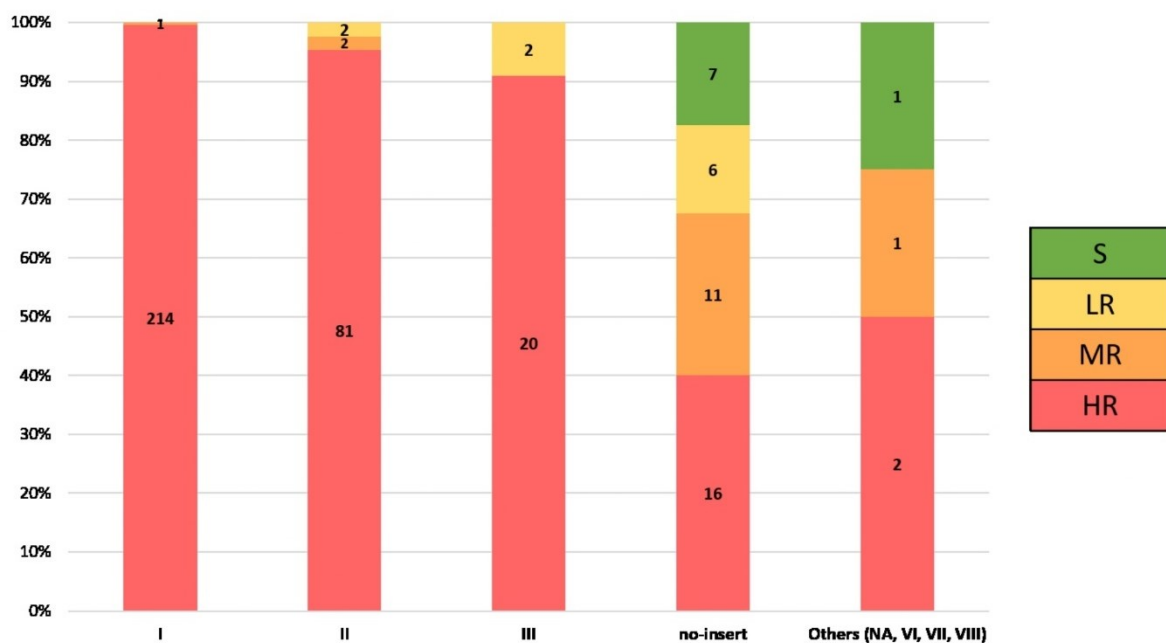


Figure S3 Distribution of terbinafine resistance among *Z. tritici* isolates of different P_{MFS1} genotypes. The MDR phenotypes are indicated as follows: HR, High Resistance; MR, Medium Resistance; LR, Low Resistance to terbinafine; S, Sensitive

Looking at the resistance profiles (Figure S3) isolates with the P_{MFS1} -type I allele had the most homogeneous resistance to terbinafine. 214 out of 215 tested strains displayed high resistance to terbinafine. On the other hand, isolates with the P_{MFS1} -no insert allele (n=40) were those with the most heterogeneous resistance profiles ranging from sensitive (S) to highly resistant (HR).

Based on these results the original collection of 380 strains was downsized for further analysis. Among the isolates carrying the type II insert, 75 isolates were selected, among isolates carrying the type III insert, 14 isolates inserts were selected. Among the isolates with no insert in the $MFS1$ promoter, 21 isolates displaying resistance to terbinafine (HR & MR) were selected. Among the isolates carrying the type I insert, 24 isolates were randomly selected. In total, 138 strains were retained for precise resistance assessment.

The reference strains used in the assessment were as follows: for the sensitive reference, a selection of seven strains of our laboratory collection (Garnault et al, 2015 & 2019) isolated between 2012 and 2014 without insertion in P_{MFS1} and sensitive to terbinafine and tolnaftate at the discriminating concentration; for the P_{MFS1} -type I, type IIA and type III genotypes, strains with promotor replacements at the $MFS1$ locus in the sensitive reference strain IPO323 (P_{MFS1} -no insert) by either the P_{MFS1} - type I, type IIA or type III allele were used (Omrane et al, 2017).

For each of the 138 strains and the references, quantitative resistance to terbinafine was assessed as EC_{50} values (the concentration inducing 50% of the maximum fungicidal effect) through dose-response curves.

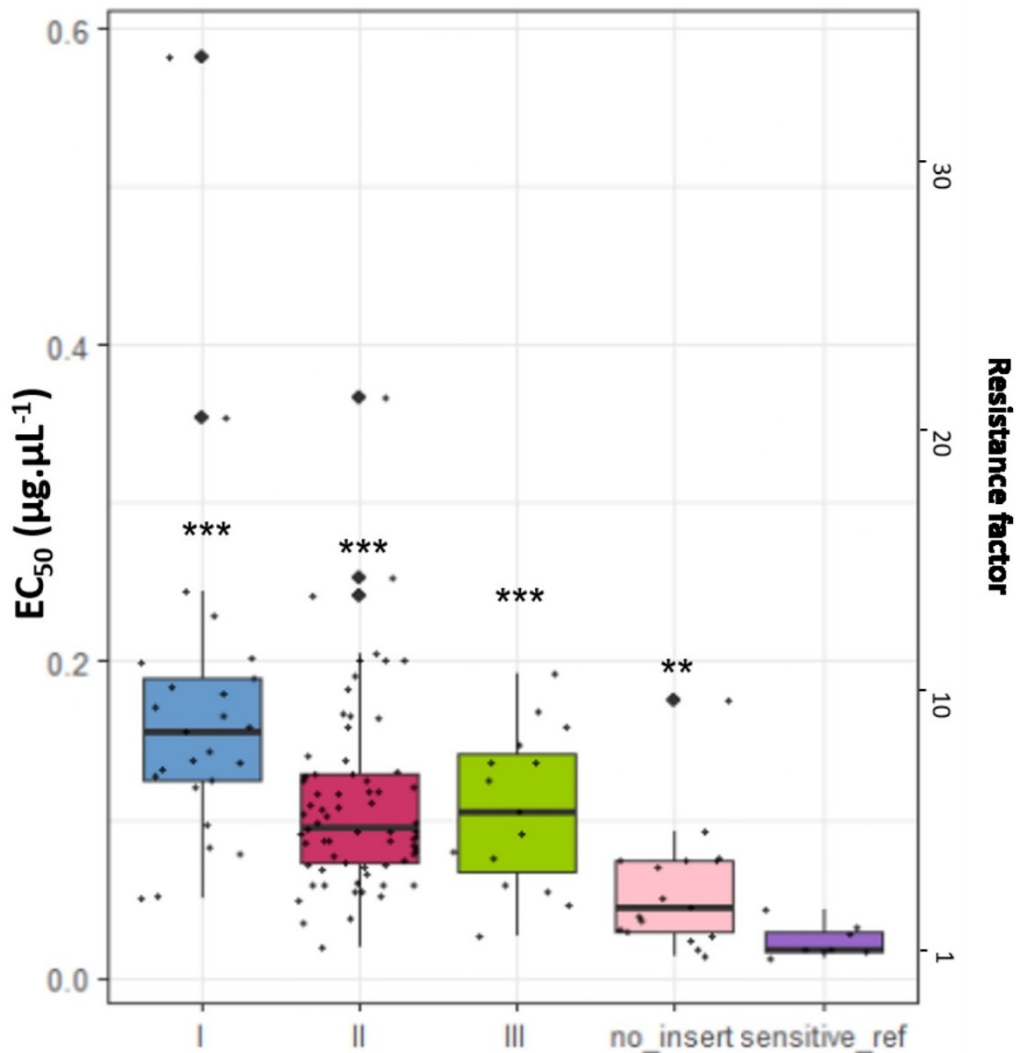


Figure 3 Distribution of EC_{50} values to terbinafine for each genotype group: P_{MFS1} -type I, II and III, P_{MFS1} - no insert.-Sensitive references in these analyses are pooled values of seven sensitive strains. Each dot corresponds to the mean EC_{50} value of one strain. Student tests between sensitive reference and the other genotype were performed. Significant differences at p -value <0.005 are indicated by ** and p -value <0.0005 are indicated by ***

All P_{MFS1} genotype groups showed terbinafine resistance significantly different from the sensitive reference with mean resistance factors (RF) ranging from 3.1 to 9.4 (Fig. 3). Field

isolates with the type I insert displayed the strongest resistance to terbinafine with a mean RF of 9.4, followed by the field isolates with type II or type III inserts with an average RF of 7,7 and 5.84. It is noticeable that the EC_{50} values in each genotypic group were strongly dispersed.

Phenotypic diversity within a common genotype indicates additional resistance mutations

We then compared terbinafine resistance levels of isolates of the same P_{MFS1} genotype.

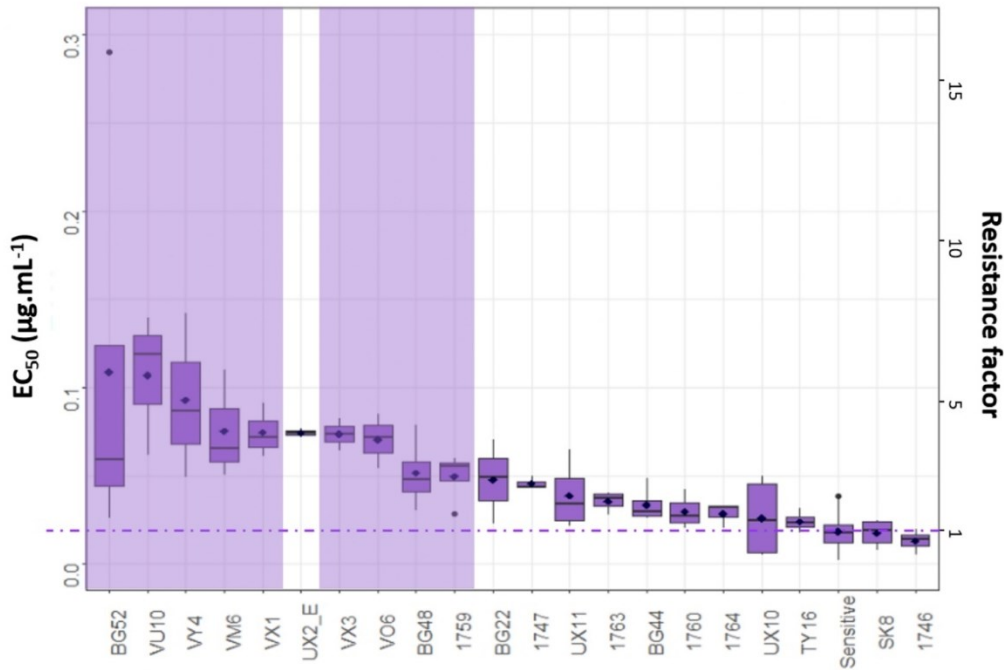


Figure 4: Distribution of terbinafine resistance profiles (EC_{50} & resistance factor) among isolates with P_{MFS1} -no_insert genotypes. The sensitive reference values used in the analysis were pooled from seven sensitive strains. The diamond-shaped dots represent the mean EC_{50} of each strain, while the horizontal lines represent the median EC_{50} value of the strain. ANOVA test with posthoc Bonferroni correction revealed significant differences from the sensitive reference as indicated by an the purple background for p -value < 0.05 . Resistance factors (RFs) were calculated based on the mean EC_{50} values

Among the strains without insert in P_{MFS1} , we observed a quantitative distribution of the terbinafine EC_{50} -values (Fig. 4). According to the ANOVA test with Bonferroni correction, six strains (strains highlighted by the purple background) out of 14 were significantly different from the sensitive reference (with a resistance factor of 5 for strain VY4) indicating that terbinafine resistance can be obtained in an P_{MFS1} -no_insert background.

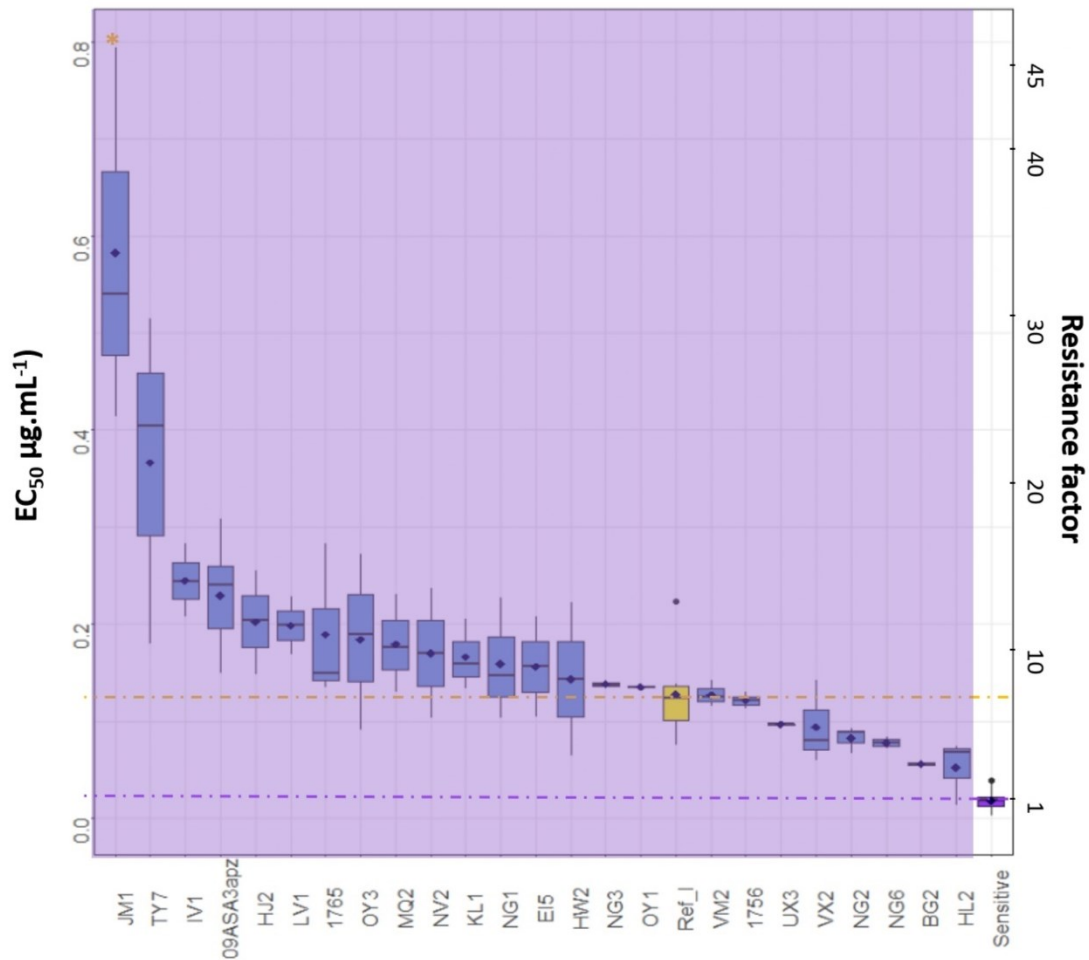


Figure 5 : Distribution of terbinafine resistance profiles (EC_{50} & resistance factor) among isolates with P_{MFS1} -type I genotypes. The sensitive reference values used in the analysis were pooled from seven sensitive strains. The yellow box indicate the EC_{50} values for the reference strain of the corresponding P_{MFS1} -type I genotype. The diamond-shaped dots represent the mean EC_{50} of each strain, while the horizontal lines represent the median EC_{50} value of the strain. ANOVA test with post-hoc Bonferroni correction revealed significant differences from the sensitive reference as indicated by the purple highlighting background, for p -value < 0.05 . Significant differences from the P_{MFS1} -type I reference are indicated by a yellow asterisk (*), for p -value < 0.05 . Resistance factors (RFs) were calculated based on the mean EC_{50} values.

Among the 23 field strains with P_{MFS1} -type I genotype, all isolates showed significant differences in EC_{50} values compared to the sensitive reference (Fig. 5) including the P_{MFS1} -type I reference and the previously published strain 09-ASA-3apz (Omrane et al. 2015; Leroux et Walker, 2011). Resistance factors were heterogenic among strains. One isolate (JM1) displayed an EC_{50} value significantly different from the P_{MFS1} -type I reference strain. The resistance factor (RF) to terbinafine was 3-4 times higher in JM1 compared to the P_{MFS1} -

type I reference strain and 34-fold higher than to the sensitive reference.

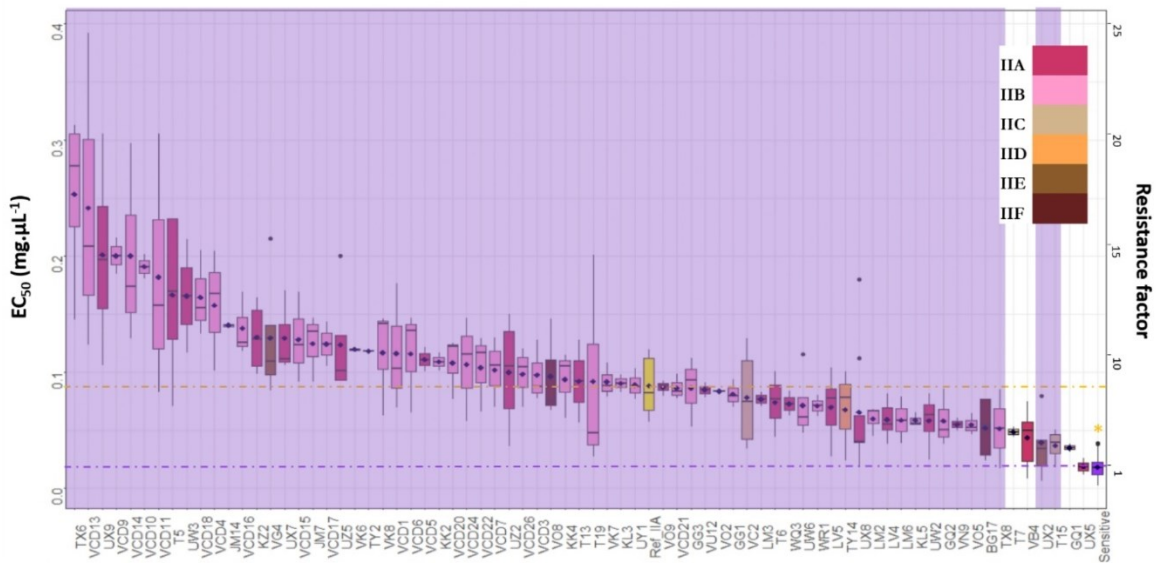


Figure 6 : Distribution of terbinafine resistance profiles (EC_{50} & resistance factor) among isolates with P_{MFS1} -type IIs genotypes. The sensitive reference values used in the analysis were pooled from seven sensitive strains. The yellow box indicates the EC_{50} values for the reference strain of the corresponding P_{MFS1} -type IIa genotype. The diamond-shaped dots represent the mean EC_{50} of each strain, while the horizontal lines represent the median EC_{50} value of the strain. ANOVA test with posthoc Bonferroni correction revealed significant differences from the sensitive reference as indicated by a highlighting frame, for p -value < 0.05 . Significant differences from the P_{MFS1} -type IIa reference were indicated by a yellow asterisk (*), for p -value < 0.05 . Resistance factors (RFs) were calculated based on the mean EC_{50} values.

Among the 75 strains of P_{MFS1} -type II genotype 69 exhibited EC_{50} values significantly different from the sensitive reference (Figure 6, table S1). A quantitative distribution of EC_{50} values to terbinafine was observed among the strains. No significant difference of EC_{50} -values between the P_{MFS1} -type II reference and the tested isolates of the P_{MFS1} -type II genotype was observed, neither between the strains of P_{MFS1} -type IIA, B, C, D, E, or F genotype.

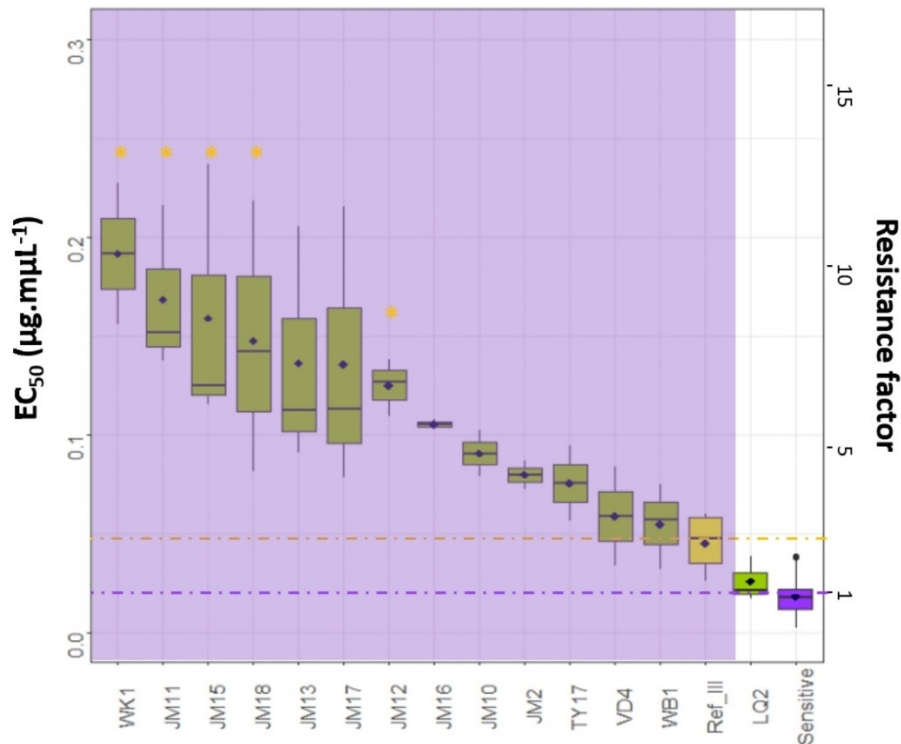


Figure 7: Distribution of terbinafine resistance profiles (EC_{50} & resistance factor) among isolates with P_{MFS1} -type III genotypes. The sensitive reference values used in the analysis were pooled from seven sensitive strains. The yellow box indicates the EC_{50} values for the reference strain of the corresponding P_{MFS1} -type III genotype. The diamond-shaped dots represent the mean EC_{50} of each strain, while the horizontal lines represent the median EC_{50} value of the strain. ANOVA test with posthoc Bonferroni correction revealed significant differences from the sensitive reference as indicated by a highlighting frame, for p -value <0.05 . Significant differences from the P_{MFS1} -type III reference were indicated by a yellow asterisk (*), for p -value <0.05 . Resistance factors (RFs) were calculated based on the mean EC_{50} values.

The analyzed isolates of P_{MFS1} -type III genotype displayed quantitative distribution of terbinafine EC_{50} values (Fig. 7). According to the Anova test, 13 out of 14 isolates were significantly different from the sensitive reference with RFs between 2.5 and 10. Five strains significantly differed from the P_{MFS1} -type III reference strain, displaying 3-6 times higher EC_{50} -values.

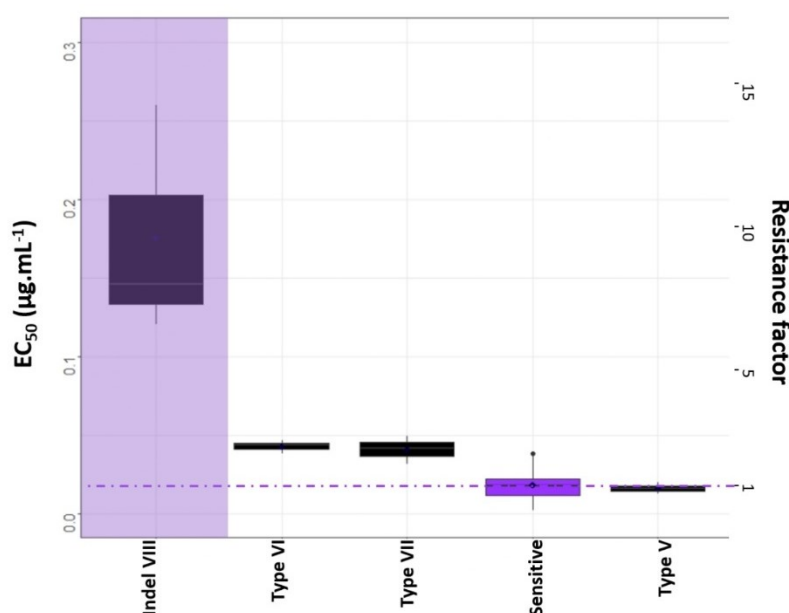


Figure 8: Distribution of terbinafine resistance profiles (EC_{50} & resistance factor) among isolates with P_{MFS1} type V, VI, VII and VIII genotypes. The sensitive reference values used in the analysis were pooled from seven sensitive strains genotype. ANOVA test with posthoc Bonferroni correction revealed significant differences from the sensitive reference as indicated by a highlighting frame, for p -value <0.05 .

Isolates with the type V, VI and VII inserts displayed EC_{50} -values ranging from 0.016 to 0.046 $\mu\text{g}/\text{mL}$ statistically not different from the sensitive reference (Figure 8). These results indicate that these insertions in the promotor of $MFS1$ do not confer resistance to terbinafine. On the opposite, isolate UW1 harbouring the indel VIII showed significant resistance to terbinafine (RF = 9.62 compared to the sensitive reference).

Taken together the results of the quantitative assessment of terbinafine resistance revealed the quantitative distribution of EC_{50} values for P_{MFS1} genotypes without insert, and with inserts of type I-II and III. For several strains ($n=7$ for P_{MFS1} -no insert, $n=1$ for P_{MFS1} -type I, $n=5$ for P_{MFS1} -type III) the RFs were significantly higher than of the corresponding reference strain indicating additional mutations involved in terbinafine resistance.

Among the new P_{MFS1} inserts, only type II inserts (C-E) and Indel VIII seem to confer terbinafine resistance.

Insert type VI does not confer terbinafine resistance

We chose to verify that insert type VI does not confer terbinafine resistance through the same gene-replacement strategy as published by Omrane et al, 2017. We introduced the corresponding replacement construct into the sensitive recipient strain IPO323. After PCR validation of hygromycin resistant transformants, three independent transformants carrying the P_{MFS1} -type VI genotype were tested for their growth on terbinafine or tolnaftate. None out of the three transformants was able to grow at the discriminatory dose of the squalene-inhibitors (data not shown), confirming that insert number VI does not confer terbinafine resistance, neither MDR (see below).

Terbinafine resistance reflects multidrug resistance

As terbinafine or other squalene epoxidase inhibitors are not used in treatments against phytopathogenic fungi, we suspect that the observed resistances correspond to multi-drug resistance as previously observed by others (Leroux et Walker, 2011; Kretschmer et al., 2009; Leroux et al., 2013).

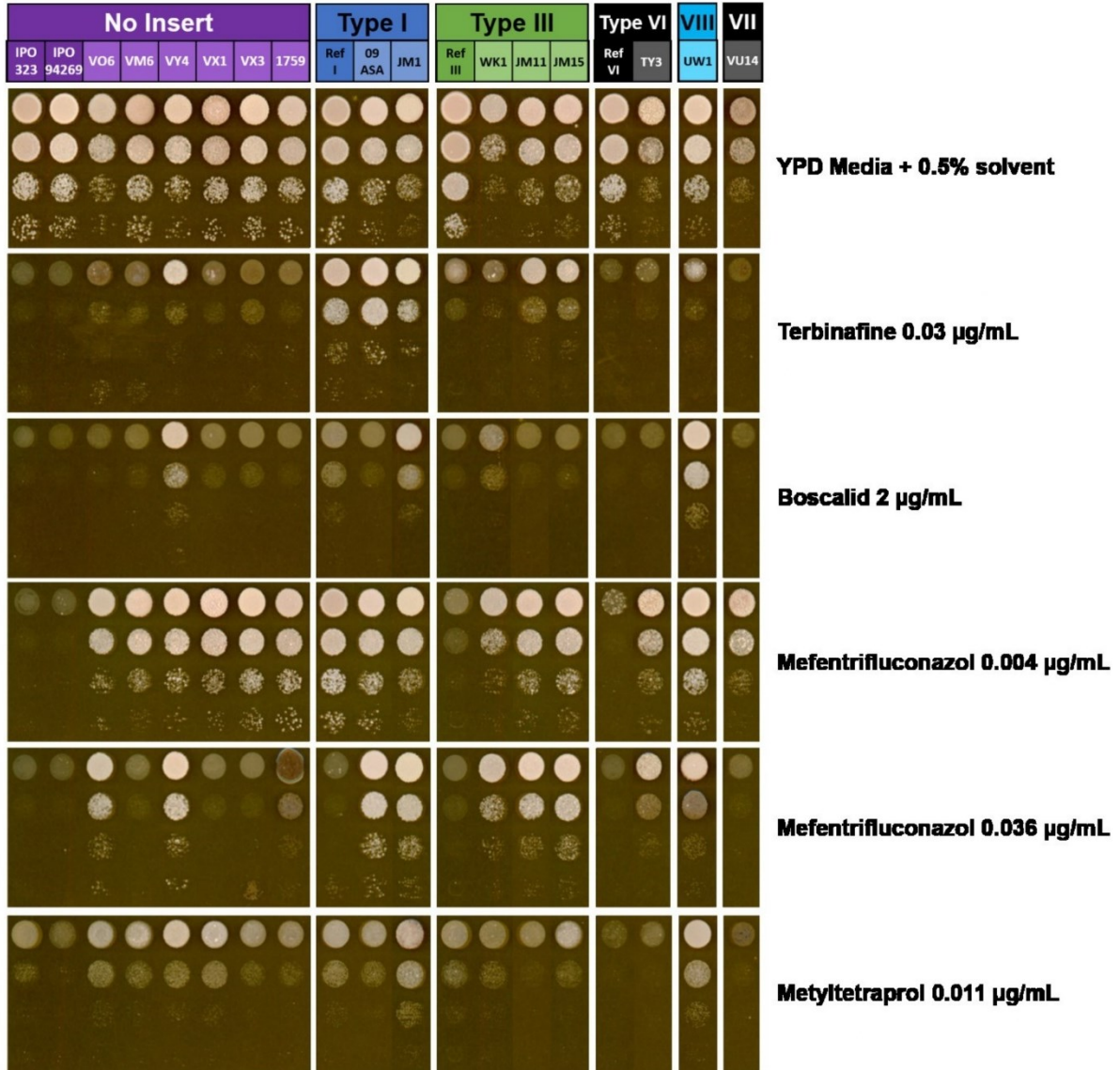


Figure 7 : Fungicide sensitivity assay of novel terbinafine resistant isolates. For a same genotype isolates from the field are represented with a lighter color than their corresponding reference.

To confirm that the accentuated terbinafine resistance of all strains that differ from their corresponding reference strain corresponds to an MDR phenotype (VO6, VM6, VY4, VX1, VX3, 1759 for the P_{MFS1} -no insert genotype, JM1 for the P_{MFS1} -type I genotype, WK1, JM11, JM15 for the P_{MFS1} -type III genotype; Figs. 4-7), we evaluated their sensitivity to fungicides of different modes-of-action by a droplet growth assay. We also tested isolate UW1 (P_{MFS1} -Indel VIII) as well as strains with the insert types VI or VII, respectively, not conferring terbinafine resistance. As fungicides we tested the DMI mefentrifluconazole (Jørgensen et al., 2022; Kiiker et al., 2021; Vestergård et al., 2023), the SDHI boscalid, as well as a complex III

inhibitor, QoI-A, metyltetraprole. This last fungicide is not yet concerned by specific resistance to QoI due to known target site modification in *Z. tritici* field populations (Matsuzaki et al., 2020).

Fig. 9 shows the growth of all tested strains on control and test media. On high terbinafine concentration (0.03 µg/mL), only strains with RF > 5 were able to grow: VY4 the only strain of genotype *P_{MFS1}-no_insert*, all strains of *P_{MFS1}-type I*, *P_{MFS1}-type III* genotype strains JM11 & JM 15, *P_{MFS1}-Indel VIII* strain UW1. As expected, the strains of genotype *P_{MFS1}-type VI & VII* did not grow.

On boscalid at 2 µg.mL⁻¹, disparities in growth emerged between VY4 and the *P_{MFS1}-no insert* references IPO323 and IPO94269, as well as between JM1 and the *P_{MFS1}-type I* reference. Also strain UW1 (*P_{MFS1}-Indel VIII*) was resistant to this SDHI. At low concentration of mefenftruconazole (0.004 µg/mL), one can notice that only the elder sensitive reference strains did not grow, *i.e.* IPO323, IPO94269 as well as the IPO323 based *P_{MFS1}-type III* reference strain. However, IPO323 based reference *P_{MFS1}-type I* strain showed resistance to this DMI at low concentration showing that this MDR genotype confers resistance to mefenftruconazole. The growth of the non-MDR strains TY3 and VU14 (type VI & VII inserts), on the opposite, hint to specific resistance, probably through *CYP51* modification. At higher concentration (0.036 µg.mL⁻¹ of mefenftruconazole), differences between strains of a common *P_{MFS1}* genotype appeared, namely between VO6, VY4 and the *P_{MFS1}-no insert* references; 09ASA-3apz and JM1 relative to the *P_{MFS1}-type I* reference; between *P_{MFS1}-type III* field strains and their corresponding reference. These differences support the hypothesis that MDR and target site modification increase the resistance level to this DMI.

Growth differences were less striking on metyltetraprole containing medium. The sensitive controls IPO323, IPO94269, and the type VI & VII strains TY3 and VU14 were sensitive to metyltetraprole (Fig. 7). Resistance, visible as growth was observed for strain UW1 (*Indel VIII*). Concerning strains of common genotype: those without insert in *P_{MFS1}*, namely VO6, VM6, VY4, and VX1 demonstrated increased growth compared to the sensitive references IPO94269 and IPO323; as does JM1 relative to the *P_{MFS1}-type I* reference.

In conclusion, strains with enhanced terbinafine resistance displayed increased resistance to fungicides with unrelated modes of action, thereby indicating that terbinafine resistance reflects multidrug-resistant (MDR) phenotype. This holds true especially for strains VO6 & VY4 (no-insert), JM1 (type I), and UW1 (*Indel VIII*). The droplet growth-test in Fig. 7 also shows that the type VI insert does not confer MDR, visible through the absence of growth of IPO323 transformant Trf-VI on all tested fungicides.

Discussion

In this study we observed a large diversity of P_{MFS1} alleles within our *Z. tritici* population 2020-2021 sampled as terbinafine resistant isolates. Notably, apart from the type VIII indel and type V, all described inserts, both in previous studies and in our research, exhibited characteristics of transposable elements (TE). In addition, we noted that different individuals sharing the same P_{MFS1} allele, displayed distinct terbinafine resistance levels.

Strains exhibiting notable resistance to terbinafine also display resistance to the fungicide metyltetraprol unaffected by known mutations conferring resistance to QoIs, but is significantly affected by MDR (Matsuzaki et al., 2020), as well as to the DMI mefenitruconazol and/or the SDHI boscalid. This is the case for the type I reference strain, associating terbinafine resistance with resistance to metyltetraprol. Strain UW1 with the novel genotype P_{MFS} -Indel VIII, resistant to terbinafine, also exhibited resistance to metyltetraprol. The use of the clinical squalene epoxidase inhibitor fungicide, terbinafine, has been shown to be an effective approach for assessing multidrug resistance (MDR) in the field. At this stage, this can be confirmed through metyltetraprol resistance assays.

Large diversity of P_{MFS1} alleles

In total, our study has identified six new inserts (type IID to F, type VI to VIII) within the *MFS1* promoter region. This increases the total count of inserts found in this region to 13 when considering previous research (Omrane et al., 2017; Mäe et al., 2020; Lavrukaitė et al., 2023). The high frequency of inserts in P_{MFS1} suggests that the zone of 360 bp, located between -108 and -468 relative to the start codon, is a hotspot for insertions. In particular, our analysis showed the presence of at least seven different inserts at locus -468, with four of them showing high similarity to the previously identified type II inserts (A & B, Omrane et al., 2017). The similarity among the six type II inserts suggests a common ancestral insertion event that underwent several mutations or rearrangements leading to the observed insert genotypes.

Despite the diversity of inserts found in P_{MFS1} , our results show that among all described inserts only indel VIII and inserts I, II (5 in total), and III confer an MDR phenotype. These last three types account for 92% of the MDR strains identified in France between 2020 and 2021 (Type I, 72%; Type II, 14%; Type III, 6%). In contrast, the remaining inserts (Types IV to VII, found only in one isolate for each allele) do not provide resistance.

Insert origins

Our analysis of *Z. tritici* isolates from 2020-2021 has revealed two novel inserts displaying similarities with miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs): type VI and type VII. The latter was discovered in an isolate from France in 2021, at the same locus (-468) as the previously reported Type II inserts, which also share conserved domains with retrotransposons classified as RLSX_LARD_gridr. In a previous study, the type I insert was described as an LTR retrotransposon, type IV as a transposon, and upon further analysis, we found that type II and III inserts display similarities with retrotransposons and transposons respectively. Except for insert types V and VIII, all the inserts found and described appear to originate from transposition events. These transposition events may have occurred at different times; the type II insert may be the oldest, as evidenced by the accumulation of mutations (type IIA to F). While the type I insert seems to be one of the most recent insertions, given its 100% sequence conservation among isolates with the P_{MFS1} -type I insert genotype in our sampling. These inserts, detected in France in 2020 and 2021, underline once again the promoter region's plasticity in field strains and suggest that more new insert discoveries are yet to be made in this field.

Previous studies have shown that putative pathogenicity-encoding genes can be found associated with TE-rich regions in *Z. tritici* (Dhillon et al., 2014). In *Leptosphaeria maculans 'brassicae'*, TEs play a role in pathogen adaptation, impacting effector gene regulation (Grandaubert et al., 2014). Under stress, TEs impact gene expression dynamics in pathogens like *Z. tritici* (Fouché et al., 2020). During the plant infection process, pathogens rely on the epigenetic control of virulence factors by derepressing nearby TEs, leading to genome size expansions (Fouché et al., 2022). Hence, the presence of TEs in *PMFS1* could originate from a TE burst associated with the stress involved in the plant infection process and could have been selected due to environmental pressure from fungicides in the field.

In summary we have identified and characterized four distinct insert types with potential transposition origins (IV, V, VI, and VII) as non-multidrug resistant (no-MDR). Notably, these non-MDR inserts have been found only once. In contrast, we observed that isolates from the field containing inserts associated with potential transposition events linked to multidrug resistance (types I, II, III) were the most frequent within our sample. This finding suggests that, despite the presence of a transposition hotspot in *P_{MFS1}*, the resulting inserts do not consistently lead to an MDR phenotype. It is likely that isolates with inserts conferring MDR are preferentially selected in the field during fungicide treatments, as the MDR phenotype provides a fitness advantage by enhancing fungicide tolerance. Hence, the high number of isolate found in the field displaying *P_{MFS1}* genotype linked to the MDR phenotype.

Another new *P_{MFS1}* allele, which we have named *P_{MFS}*-Indel VIII, has been discovered. This allele exhibits a 678 bp deletion, removing 58 bp out of 166 bp from the 5'UTR region. Additionally, a 164 bp insert is linked to this deletion, which is conserved in the *Z. tritici* genome but does not share any similarity with known transposable element structures. The unique isolate with *P_{MFS}*-Indel VIII displayed significant resistance to terbinafine. These findings suggest an MDR mechanism at play, linked to an insertion-deletion within the 5'UTR region.

Our findings underscore that evaluating the MDR potential in the field cannot be based solely on the genotyping of the *P_{MFS1}* promoter size; specific primers must be used to target the sequences of the inserts that confer resistance. Otherwise, MDR potential must be evaluated through phenotyping.

Phenotype - genotype discrepancy suggests additional mechanisms involved in MDR

Several isolates from our collection displayed higher resistance factors (RFs) than their respective reference strains for the same genotypes, including five for *P_{MFS1}*-Type III, one for *P_{MFS1}*-Type I and six for *P_{MFS1}*-no insert. This discrepancy suggests the existence of potential additional mechanisms of multidrug resistance (MDR) that may operate independently of the *MFS1* promoter insert. These mechanisms may involve mutations outside the promoter region of *MFS1*, such as gain-of-function mutations in transcription factors, as previously reported in *Clariireedia homoeocarpa* (Sang et al., 2018) and *Botrytis cinerea* (Kretschmer et al., 2009), or unidentified quantitative mutations of resistance.

Noticeably, our study found that the previously described *P_{MFS1}*-Type I wild-type strain (MDR6/09ASA), which exhibited the highest resistance factor towards terbinafine in the study by Omrane et al. (2017), displayed an RF of 15, while an isolate with the same genotype exhibited an RF of 30. Overall, the MDR phenotype observed in our field isolates displayed higher levels of resistance than those reported in previous studies. These findings suggest that the mechanisms underlying MDR in *Z. tritici* field isolates may be more complex and diverse than previously thought, and may involve multiple genetic factors. Further

investigation is needed to elucidate these mechanisms and to develop more effective strategies for managing multidrug resistance in *Z. tritici* field strains.

Material and Method

Z. tritici strain collection

French field strains used in this study were obtained from the "Performance Network" (Garnault et al., 2019) during the years 2020 and 2021. Both French and British strains in our panel were isolated from infected wheat leaves and suspended in water. The spore suspensions were incubated at 18°C in the dark for 24 hours on PDA media supplemented with the discriminatory concentration of terbinafine (0.015 µg/mL) (Leroux & Walker, 2011). After incubation, colonies with long germ tubes were picked using a sterile toothpick and isolated three to five times on PDA media supplemented with antibiotics (Kanamycin, Streptomycin, and Penicillin (Sigma-Aldrich) at 37.5 µg/mL). Pure strains were stored as spore suspensions in 25% glycerol at -80°C. Strains from Belgium, Denmark, Estonia, Germany, Ireland, and Lithuania were provided by different colleagues as pure strains based on their respective P_{MFS1} genotypes.

Reference strains

In this study, one of the sensitive *Z. tritici* reference strains used was IPO323, which is susceptible to all fungicides and recognized as a worldwide reference (Goodwin et al., 2011). To establish the basal EC₅₀ value to terbinafine, as sensitive reference we selected six field strains of our collection, isolated between 2012 and 2014 of P_{MFS1} -no-insert genotype, sensitive to terbinafine (not germinating on PDA at the terbinafine discriminatory dose), in addition to IPO323. Transformants carrying either the P_{MFS1} -type I allele, P_{MFS1} -type II allele, or P_{MFS1} -Type III allele integrated at the *MFS1* locus of IPO323 (Omrane et al., 2017) were employed as references and named Ref-I, Ref-II, and Ref-III, respectively. The full list of reference strains and field isolates used in this study is provided in Table S1.

General growth conditions

For the precultures, strains were taken out of the -80°C and plated on solid YPD medium (20 g.L⁻¹ dextrose, 20 g.L⁻¹ peptone, 10 g.L⁻¹ yeast extract, 10 g.L⁻¹ agar). All strains were grown in 10 mL liquid YPD medium in 50 mL sterilized Erlenmeyer flasks plugged with cotton wool for 7 days at 150 rpm and 18°C in the dark. Cell concentrations were determined by OD measurements at $\lambda=405$ nm in a Spectramax M2 microtiterplate reader (Molecular Devices, USA) according to the formula established by Ballu *et al.* (2021).

Qualitative resistance assay to fungicides (droplet growth test)

The qualitative assessment of terbinafine resistance as proxy for the MDR phenotype for the 398 isolates was performed using a droplet test according to the following conditions. To this end, suspensions of 10⁷, 10⁶, 10⁵, and 10⁴ spores.mL⁻¹ respectively were deposited as drops in columns on 12 cm square Petri dishes containing solid YPD medium supplemented with antibiotics (Kanamycin, Streptomycin, and Penicillin (Sigma-Aldrich) at 37.5 µg.mL⁻¹) and a range of terbinafine concentrations (0.015, 0.03, and 0.06 µg.mL⁻¹) or solvent (DMSO at 0.5% v/v). All fungicides were supplied as 200 X concentrated DMSO or ethanol solutions. Fungal growth was observed after 7 days. For each strain and each terbinafine concentration, a score was given ranging from 0 (no growth) to 4 (growth at the lowest spore concentration). The resistance profile was determined by concatenating the independent scores obtained for the tested modalities, starting at the lowest terbinafine concentration, ranging from 000 to 444. Strains with a resistance profile between 300 and 400 were categorized as highly resistant (HR), strains with a resistance profile between 200 and 300 were categorized as mid-resistant (MR), strains with a resistance profile between 100 and 200 were categorized as low-resistant (LR), and strains with a resistance profile below 100 were categorized as sensitive (S), prior to EC₅₀ establishment (following section).

Quantitative resistance assay to fungicide were also conducted with fungicide mefentrifluconazole (0.004 µg/mL ; 0.036 µg/mL) boscalid (2 µg/mL) and metyltetraprole (0.011 µg/mL).

Quantitative terbinafine resistance assessment (EC₅₀ determination through dose response curve)

After quantifying spore concentrations, pre-cultures of 138 field isolates and reference strains were adjusted to 1.25×10^6 spores/mL in 200 µL of YPD medium supplemented with antibiotics (Kanamycin, Streptomycin (Sigma-Aldrich) 37,5 µg/mL) supplemented with 0.5% v/v DMSO (Control) or terbinafine diluted in DMSO (0.5% of the final volume). Different terbinafine concentrations were used for high resistance (HR) and low resistance (LR) strains (table S1). A breathable film (Breathe-easy®; Diversified Biotech) was applied, and the isolates were incubated at 18°C and 150 rpm in a microplate shaker (Innova S44i, Eppendorf). Three biological replicates, each with three technical replicates, were performed for each isolate. After 7 days of growth, cell concentrations were determined by measuring the absorbance at 405 nm. Data were analyzed using R software (R core team, 2018; version 4.1.3) and a customized script (Ballu, unpublished), utilizing the drc package. Growth at each terbinafine concentration relative to the control medium was calculated using the formula:

(Cell concentration at dose x) / (Cell concentration in control medium)

The drm function was employed to model dose-response curves using a four-parameter Log-Logistic function, allowing determination of the EC₅₀ for terbinafine (the concentration inducing 50% of the maximum fungicidal effect) for all isolates and biological replicates. Comparisons between replicates were made using the EDcomp function to identify any significant differences. Average EC₅₀ values were analyzed via ANOVA (car package) on log-transformed data, and a Bonferroni post-hoc test was performed after confirming the normality and homoscedasticity of model residuals.

P_{MFS1} genotyping

After 7 days of growth on YPD agar media, 50 – 100 mg of fresh culture was harvested per strain, placed in a microtiter plate and immediately frozen at -80°C. Cell lysis was performed mechanically twice in AP1 buffer + Rnase A and reagent DX (Qiagen) using tungsten beads in MIXER MILL MM 400 homogenizer (RETSCH®) at 20 Hz for 20 seconds. DNA was precipitated with sodium acetate pH 5 at 0.5 M final concentration and the addition of 0.7 vol of isopropanol. After centrifugation, dry DNA was resuspended in AE buffer (Qiagen). Genotyping of the *MFS1* promotor was performed on all 398 strains by PCR using the primer pair *P_{MFS1_2F}* and *P_{MFS1_4R}* (Omrane et al 2017). All isolates with the *P_{MFS1}*-Type II, *P_{MFS1}*-Type III alleles, 16 isolates with *P_{MFS1}*-no insert allele and 21 isolates with *P_{MFS1}*-type I insert allele were sequenced with the Sanger protocol (by Eurofins Genomics, Köln, Germany).

Sequence analysis

Sequenced promoters of *MFS1* of field isolated were aligned using with the *P_{MFS1}* sequences of the reference strains IPO323, and the sequences of reference *P_{MFS1}*-types I, II, and III. Any inserts found that did not align with the known inserts in *P_{MFS1}* were aligned to the annotated reference genome of *Zymoseptoria tritici*, with transposable element annotation from (Badet et al., 2020; Oggenfuss et al., 2021), and were qualified as potential TEs if the 80-80-80 rule was met (Wicker et al., 2007).

MFS1 gene replacement constructs

To introduce the MFS1 type V - MDR allele into the sensitive IPO323 strain, a replacement cassette was constructed using the same strategy described in Omrane et al. (Omrane et al. 2017) with minor change. 5' promotor and 3' terminator sequence of MFS1 in TY3 *Z. tritici* strain were obtained by 2 PCR with primer seq_prom_for/ seq_prom_rev and seq_term_for/ seq_term_rev and sanger sequencing (Eurofins, Luxembourg) with same primers. For all PCR performed to obtain cloning fragments, the Taq polymerase Phusion® (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) was used under adapted PCR conditions using primers referenced in Table S.2. The MFS1 allele, 1,273 bp upstream until 510 bp downstream of the open reading frame (ORF), was amplified from TY3 strain DNA (4C6) with the primer pair MDR6-7_pKr_F/ Gibs_MDRIV_R. A 737-bp 3' flank of the MFS1 gene to facilitate homologous recombination was amplified from IPO323 genomic DNA with primers Ipo323_hyg_F and Ipo323_pKr_R. Finally, the hygromycin resistance marker gene hph was amplified from plasmid pCAMB-HPT-Hind (Kramer et al., 2009) with the primer pair Gibs_Hygro_for/Hygro_ipo323_R. The three fragments (0.05 pmol each) were assembled with XhoI-EcoRI-digested pCAMB-HPT-Hind (0.05 pmol) using the Gibson Assembly Cloning kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) according to the supplier's instructions. NEB 5-alpha competent *E. coli* (High Efficiency) (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) were transformed by heat shock with 2µl of the assembly reaction mixture. Successfully transformed colonies were selected on medium added with kanamycin (50mg.L⁻¹) then validated by PCR on colonies with 3 pairs of primers pCAMBIA_rev/MFS1_rev, MFS1_for/pHygro_rev and pHygro_for/pCAMBIA_for. Positive clones were picked for plasmid extractions and mini-prepped plasmid construct was validated by Sanger sequencing (Eurofins, Luxembourg) with primers listed on table S.2.

Agrobacterium tumefaciens strain AGL1 was transformed by heat shock with the generated plasmid pCAMBIA0380_RH_pMFS1_V_MFS1_hygro. Positive colonies were selected on YEB broth (beef extract 5g.L⁻¹, yeast extract 1g.L⁻¹, peptone 5g.L⁻¹, saccharose 5g.L⁻¹, MgCl₂ 0,5g.L⁻¹) with rifampicin (50mg.L⁻¹), kanamycin (50mg.L⁻¹), and ampicillin (100mg.L⁻¹) then screened by same colonies PCR as on *E. coli*.

ACKNOWLEDGEMENTS:

This work was supported by Anova-Plus Company. The authors would like to thank the Performance Network for supplying leaf samples in 2020-2021

References:

- Badet, T., Oggenfuss, U., Abraham, L., McDonald, B. A., & Croll, D. (2020). A 19-isolate reference-quality global pangenome for the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *BMC Biology*, 18(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-0744-3>
- Ballu, A., Deredec, A., Walker, A. S., & Carpentier, F. (2021). Are efficient-dose mixtures a solution to reduce fungicide load and delay evolution of resistance? An experimental evolutionary approach. *Microorganisms*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112324>
- Dhillon, B., Gill, N., Hamelin, R. C., & Goodwin, S. B. (2014). The landscape of transposable elements in the finished genome of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *BMC Genomics*, 15(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1132>
- Fones, H., & Gurr, S. (2015). The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: An EU

- perspective. *Fungal Genetics and Biology*, 79, 3–7. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2015.04.004>
- Fouché, G., Rosati, D., Venet, C., Josserand, H., Latorse, M. P., Debieu, D., & Fillinger, S. (2022). LC-MS/MS-Based Fungicide Accumulation Assay to Demonstrate Efflux Activity in the Wheat Pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Microorganisms*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081494>
- Fouché, S., Badet, T., Oggenfuss, U., Plissonneau, C., Francisco, C. S., & Croll, D. (2020). Stress-Driven Transposable Element De-repression Dynamics and Virulence Evolution in a Fungal Pathogen. *Molecular Biology and Evolution*, 37(1), 221–239. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz216>
- Fouché, S., Oggenfuss, U., Chanclud, E., & Croll, D. (2022). A devil's bargain with transposable elements in plant pathogens. *Trends in Genetics*, 38(3), 222–230. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.08.00>
- Garnault, M., Duplaix, C., Leroux, P., Couleaud, G., Carpentier, F., David, O., & Walker, A. (2019). Spatiotemporal dynamics of fungicide resistance in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in France. *Pest Management Science*, July 2018, ps.5360. <https://doi.org/10.1002/ps.5360>
- Grandaubert, J., Lowe, R. G. T., Soyer, J. L., Schoch, C. L., Van De Wouw, A. P., Fudal, I., Robbertse, B., Lapalu, N., Links, M. G., Ollivier, B., Linglin, J., Barbe, V., Mangenot, S., Cruaud, C., Borhan, H., Howlett, B. J., Balesdent, M. H., & Rouxel, T. (2014). Transposable element-assisted evolution and adaptation to host plant within the *Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa* species complex of fungal pathogens. *BMC Genomics*, 15(1), 1–27. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-891>
- Hu, M., & Chen, S. (2021). Non-target site mechanisms of fungicide resistance in crop pathogens: A review. *Microorganisms*, 9(3), 1–19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030502>
- Huf, A., Rehfus, A., Lorenz, K. H., Bryson, R., Voegelé, R. T., & Stammler, G. (2018). Proposal for a new nomenclature for CYP51 haplotypes in *Zymoseptoria tritici* and analysis of their distribution in Europe. *Plant Pathology*, 67(8), 1706–1712. <https://doi.org/10.1111/ppa.12891>
- Jørgensen, L. N., Matzen, N., Heick, T. M., O'Driscoll, A., Clark, B., Waite, K., Blake, J., Glazek, M., Maumene, C., Couleaud, G., Rodemann, B., Weigand, S., Bataille, C., R, B., Hellin, P., Kildea, S., & Stammler, G. (2022). Shifting sensitivity of septoria tritici blotch compromises field performance and yield of main fungicides in Europe. *Frontiers in Plant Science*, 13(November), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1060428>
- Kiiker, R., Juurik, M., Heick, T. M., & Mäe, A. (2021). Changes in dmi, sdhi, and qoi fungicide sensitivity in the estonian *zymoseptoria tritici* population between 2019 and 2020. *Microorganisms*, 9(4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040814>
- Klink, H., Verreet, J. A., Hasler, M., & Birr, T. (2021). Will Triazoles Still Be of Importance in Disease Control of *Zymoseptoria tritici* in the Future? *Agronomy* 2021, Vol. 11, Page 933, 11(5), 933. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY11050933>
- Kretschmer, M., Leroch, M., Mosbach, A., Walker, A. S., Fillinger, S., Mernke, D., Schoonbeek, H. J., Pradier, J. M., Leroux, P., De Waard, M. A., & Hahn, M. (2009). Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathogens*, 5(12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000696>
- Lapalu, N., Lamothe, L., Petit, Y., Genissel, A., Delude, C., Feurtey, A., Abraham, L. N., Smith, D., King, R., Renwick, A., Sucher, J., Steindorff, A. S., Goodwin, S. B., Grigoriev, I. V., Hane, J., Rudd, J., Croll, D., Scalliet, G., Lebrun, M., ... Genomics, E. (2023). *Zymoseptoria tritici*.
- Lavrukaitė, K., Heick, T. M., Ramanauskienė, J., Armonienė, R., & Ronis, A. (2023). Fungicide

- sensitivity levels in the Lithuanian *Zymoseptoria tritici* population in 2021. *Frontiers in Plant Science*, 13(January), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1075038>
- Leroux, P., Gredt, M., Remuson, F., Micoud, A., & Walker, A. S. (2013). Fungicide resistance status in French populations of the wheat eyespot fungi *Oculimacula acuformis* and *Oculimacula yallundae*. *Pest Management Science*, 69(1), 15–26. <https://doi.org/10.1002/ps.3408>
- Leroux, P., & Walker, A. S. (2011). Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science*, 67(1), 44–59. <https://doi.org/10.1002/ps.2028>
- Lucas, J. A., Hawkins, N. J., & Fraaije, B. A. (2015). The Evolution of Fungicide Resistance. In *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 90). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.001>
- Mäe, A., Fillinger, S., Sooväli, P., & Heick, T. M. (2020). Fungicide Sensitivity Shifting of *Zymoseptoria tritici* in the Finnish-Baltic Region and a Novel Insertion in the MFS1 Promoter. *Frontiers in Plant Science*, 11, 0–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00385>
- Matsuzaki, Y., Kiguchi, S., Suemoto, H., & Iwahashi, F. (2020). Antifungal activity of metyltetraprole against the existing Qol-resistant isolates of various plant pathogenic fungi: Metyltetraprole against Qol-R isolates. *Pest Management Science*, 76(5), 1743–1750. <https://doi.org/10.1002/ps.5697>
- Möller, M., & Stukenbrock, E. H. (2017). Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens. *Nature Reviews Microbiology* 2017 15:12, 15(12), 756–771. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.76>
- Oggenfuss, U., & Id, D. C. (2023). *Recent transposable element bursts are associated with the proximity to genes in a fungal plant pathogen*. 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011130>
- Omrane, S., Audéon, C., Ignace, A., Duplaix, C., Aouini, L., Kema, G., Walker, A.-S., & Fillinger, S. (2017). Plasticity of the MFS1 Promoter Leads to Multidrug Resistance in the Wheat Pathogen *Zymoseptoria tritici*. *MSphere*, 2(5), 1–18. <https://doi.org/10.1128/msphere.00393-17>
- Omrane, S., Sghyer, H., Audéon, C., Lanen, C., Duplaix, C., Walker, A. S., & Fillinger, S. (2015). Fungicide efflux and the MgMFS1 transporter contribute to the multidrug resistance phenotype in *Zymoseptoria tritici* field isolates. *Environmental Microbiology*, 17(8), 2805–2823. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12781>
- Sang, H., & Hulvey, J. P. (2018). *A Xenobiotic Detoxification Pathway through Transcriptional Regulation in Filamentous Fungi*. 9(4), 1–17.
- Singh, N. K., Badet, T., Abraham, L., & Croll, D. (2021). Rapid sequence evolution driven by transposable elements at a virulence locus in a fungal wheat pathogen. *BMC Genomics*, 22(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07691-2>
- Sun, X., Ruan, R., Lin, L., Zhu, C., Zhang, T., Wang, M., Li, H., & Yu, D. (2013). Genomewide investigation into DNA elements and ABC transporters involved in imazalil resistance in *penicillium digitatum*. *FEMS Microbiology Letters*, 348(1), 11–18. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12235>
- Torriani, S. F. F., Melichar, J. P. E., Mills, C., Pain, N., Sierotzki, H., & Courbot, M. (2015). *Zymoseptoria tritici*: A major threat to wheat production, integrated approaches to control. *Fungal Genetics and Biology*, 79, 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.010>
- Vestergård, N. F., Jørgensen, L. N., Hellin, P., & Heick, T. M. (2023). Fungicide spraying intensity in the

field drives the selection of amino acid alteration conferring resistance in *Zymoseptoria tritici*.
European Journal of Plant Pathology, 2050, 385–401. <https://doi.org/10.1007/s10658-023-02671-6>

III. Etude moléculaire des inserts de type I – III et leur implication dans la surexpression de *MFS1*

III.1. Introduction

Avant le début de cette thèse, le phénotype de résistance multi-drogues (MDR) chez *Zymoseptoria tritici* était décrit comme étant influencé par l'allèle *MFS1*, selon la présence ou non d'inserts modulant l'expression du gène *MFS1*. La corrélation entre la présence de ces insertes et l'expression de *MFS1* avait été confirmée, mais les mécanismes moléculaires sous-jacents restaient méconnus. L'analyse des séquences réalisée par Omrane et al. en 2017 a permis de proposer plusieurs hypothèses. Avant de les examiner, nous allons résumer l'état des connaissances sur la régulation de la transcription chez les eucaryotes.

III.1.1. La régulation de la transcription

La transcription d'une séquence ADN d'un gène en ARNm est réalisée par l'ARN polymérase II (Pol II) chez les eucaryotes. La modulation de la transcription d'un gène s'effectue donc par la modulation de l'activité de l'ARN polymérase vis-à-vis du gène, impliquant deux variables principales : le recrutement de l'ARN polymérase en amont du gène et l'accessibilité du gène à l'ARN polymérase.

Le recrutement de l'ARN polymérase II en amont d'un gène est modulé par des facteurs de transcription (TF) qui agissent en *trans*. Ils peuvent être activateurs ou répresseurs de la transcription (TA ou TR respectivement). Les séquences sur lesquelles les activateurs et les répresseurs de la transcription vont se lier sont appelées respectivement UAS (Upstream Activation Sequence) et URS (Upstream Repression Sequence) et sont tous les deux des éléments de régulation *cis*. Le recrutement de la Pol II est réalisé par l'intermédiaire d'un médiateur associé à des facteurs de transcription fixés les UAS qui permettront dans un premier temps de rapprocher la Pol II du gène (Figure 11). L'initiation de la transcription des gènes par la Pol II nécessitera systématiquement l'association avec des facteurs de transcription dits généraux reconnaissant également des séquences de régulation *cis* présentes dans le promoteur. Ces facteurs de transcription généraux vont permettre le recrutement de la Pol II au site d'initiation de la transcription et feront avec cette dernière partie du complexe de pré-initiation (Figure 11) au niveau du core promoteur. Le core promoteur est défini comme une séquence d'au moins 60 bp (Miller and Hahn, 2006), en contact avec les TF généraux et Pol II composant le PIC (Figure 11)

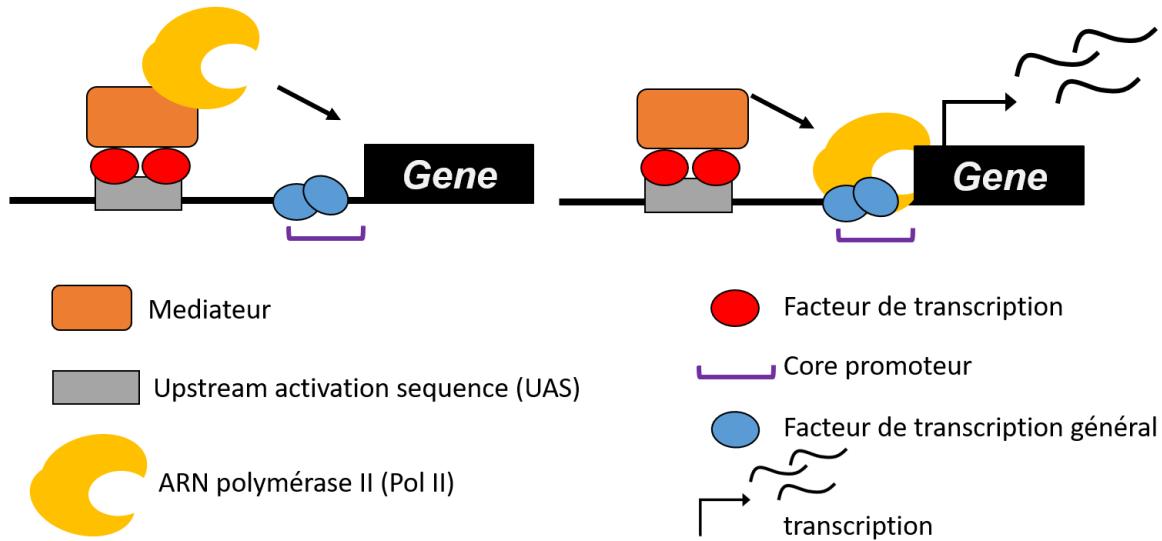


Figure 11 Interaction entre les éléments composant le complexe de pré-initiation (PIC), nécessaire à la transcription d'un gène par l'ARN polymérase II (Pol II). A/ Recrutement de Pol II par le complexe facteur de transcription-médiateur reconnaissant les UAS. B/ Initiation de la transcription par recrutement de la Pol II par les facteurs de transcription généraux.

L'effet de plusieurs UAS sur la transcription peut être additionnel. En effet, l'addition de plusieurs UAS situés en amont d'un gène pourra augmenter l'efficacité de la transcription de ce dernier.

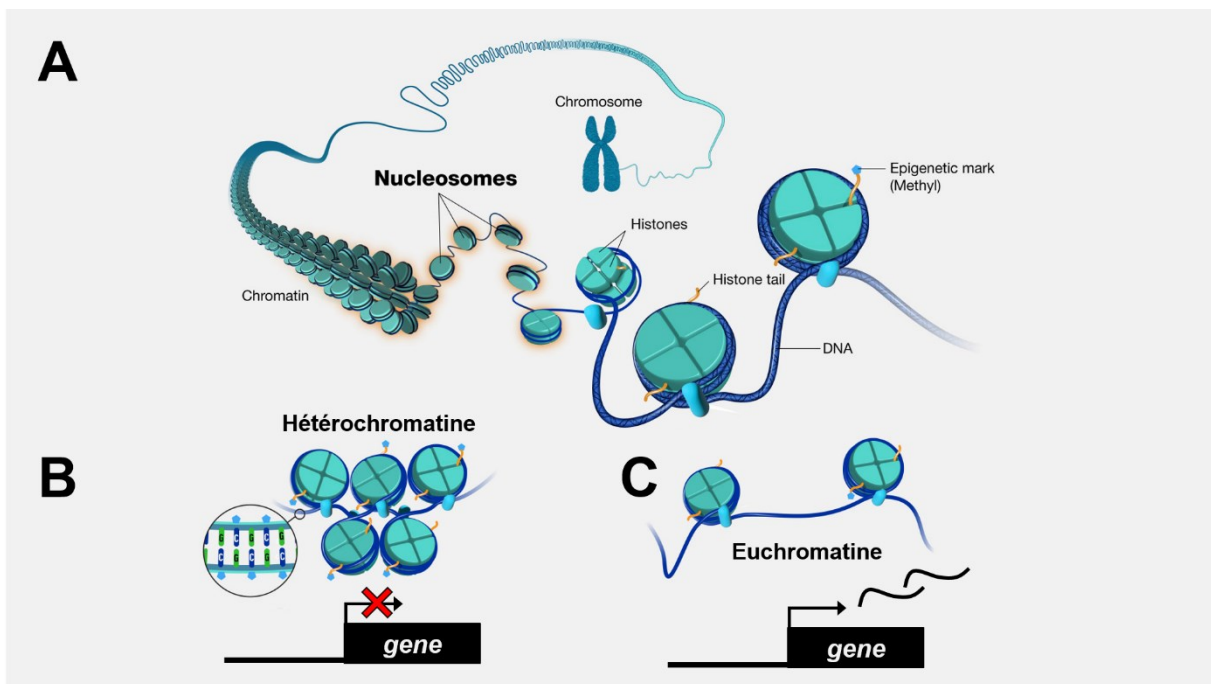


Figure 12 Impact de l'état de condensation de la chromatine sur la transcription. A/ Structure des chromosomes et de la chromatine issue composée d'ADN s'enroulant autour d'histones, formant les nucléosomes. B/ Chromatine condensée, hétérochromatine, résultant en la répression des gènes contenus dans les nucléosomes. C/ Chromatine décondensée, euchromatine, permettant l'expression des gènes contenus dans les nucléosomes.

L'accessibilité des séquences d'ADN à la mécanique transcriptionnelle est également modulée par l'accessibilité de la chromatine. Pour rappel, les chromosomes sont des structures composées de molécules d'ADN qui s'enroulent de façon régulière autour d'un complexe formé par des protéines appelées histones (H2A, H2B, H3, et H4) ; en général, ce sont environ 150 bp qui s'enroulent autour de cet ensemble de protéines. Le complexe histones + ADN est nommé nucléosome. Les nucléosomes s'enroulent entre eux et forment la chromatine (Figure 12A). L'état d'enroulement des nucléosomes peut être plus ou moins serré, modulant ainsi l'accès de l'ARN polymérase II aux molécules d'ADN et, par conséquent, l'expression des gènes (Figure 12B, 12C).

Plusieurs mécanismes peuvent moduler la densité de la chromatine, notamment par la méthylation de l'ADN ou les modifications post-traductionnelles des histones (Du *et al.*, 2015). Ces modifications chimiques impactent les interactions électrostatiques entre l'ADN et les histones, modifiant ainsi l'état de compaction du nucléosome.

Chez *Z. tritici*, comme chez les eucaryotes en général, la modulation de l'expression des gènes est liée à la méthylation des histones. En particulier la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) associée à l'état d'hétérochromatine, réprime l'expression des effecteurs en absence d'interaction avec la plante hôte (Meile *et al.*, 2020). Par conséquent, l'expression d'un gène dépend d'une multitude de paramètres *cis* et *trans*, ainsi que de l'accessibilité de la chromatine, et s'inscrit dans des réseaux complexes de cascades transcriptionnelles.

III.1.2. Etat de l'art concernant la régulation de la transcription de *MFS1* chez *Z. tritici*

L'expression de *MFS1* dans les souches de terrain de *Z. tritici* semble principalement influencée par la présence des inserts I, II et III. Avant d'explorer les mécanismes liés aux facteurs de transcription, aux amplificateurs, ou au niveau post-traductionnel, il est essentiel de comprendre la régulation de la transcription spécifique à ces inserts. Quelles sont les variables liées aux inserts I, II et III responsables de la modulation de la transcription ?

1) Les inserts pourraient influencer la transcription soit en perturbant, soit en éloignant des motifs de régulation initialement présents dans le promoteur de *MFS1* dans lequel elles se sont insérées. Ainsi, le site d'insertion et/ou la taille des inserts pourrait jouer un rôle clé dans la modulation de la transcription de *MFS1*.

2) Les inserts pourraient également moduler la transcription en attirant des facteurs de transcription grâce à la présence de motifs régulateurs spécifiques.

Il a été démontré que l'insert de type I, ainsi que ceux de type II et III, provenaient d'événements de transposition. Les éléments transposables sont des sources de motifs régulateurs *cis*. Ils peuvent intégrer dans leurs séquences des éléments régulateurs *-cis* nécessaires à leur propre réplication dans le génome de l'hôte (Feschotte, 2008). Ces éléments régulateurs *cis* peuvent influencer l'expression des gènes dans l'environnement génomique de l'élément transposable. Nous nous sommes donc interrogés sur la nature précise de ces inserts qui modulent la transcription de *MFS1* et sur les motifs régulateurs *cis* potentiellement impliqués.

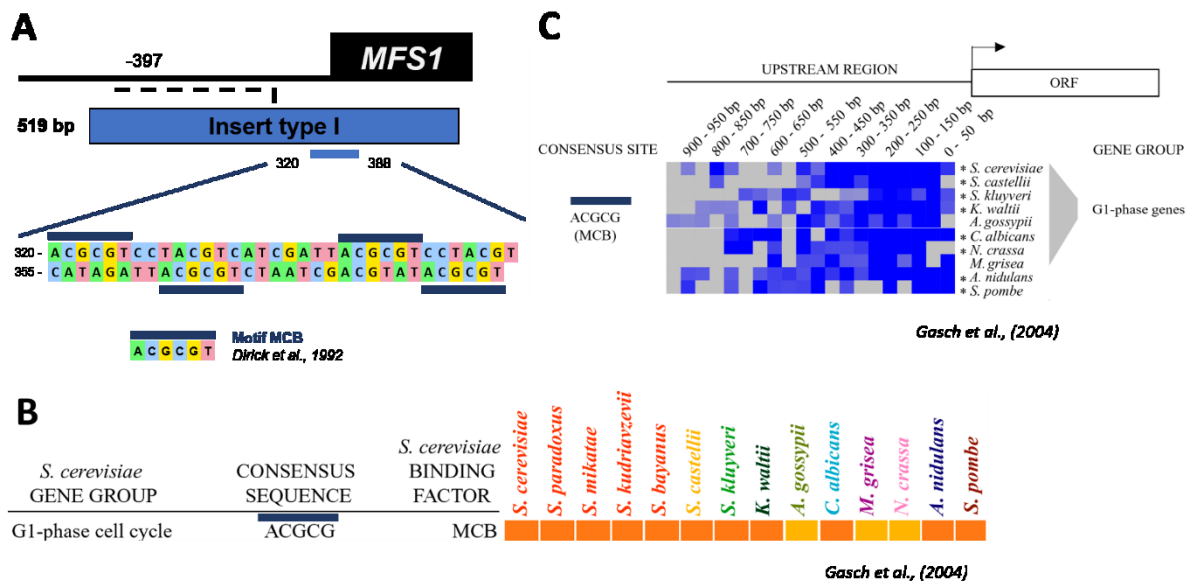


Figure 13 A / Motifs MCB retrouvés dans l'insert de type I chez *Z. tritici*, B/conservation de ces motifs chez les ascomycètes, C / proximité des éléments MCB ainsi que le nombre de répétitions en amont des gènes du cycle cellulaire chez les ascomycètes. (Gasch et al., 2004)

Omrane et al. (2017) ont émis l'hypothèse que la régulation de la transcription de *MFS1* par les inserts de type I était liée à la présence de motifs MCB (MluI Cell Cycle Box ou MBP element). Ces motifs, retrouvés quatre fois dans l'insert de type I (Fig 13A), ont été étudiés chez *Schizosaccharomyces pombe* (Dirick et al., 1992), où ils sont essentiels à l'induction de l'expression du gène *rhp51* durant la phase G1 du cycle cellulaire ou en réponse à un stress de réplication de l'ADN. Ces motifs MCB, hautement conservés chez les ascomycètes, se trouvent en amont des régions codantes des gènes ((Gasch et al., 2004) Fig 13 B et C). Ainsi, l'insert de type I pourrait favoriser la transcription de *MFS1* en recrutant un ou plusieurs facteurs de transcription homologues de MCB associés à la régulation de la phase G1 du cycle cellulaire.

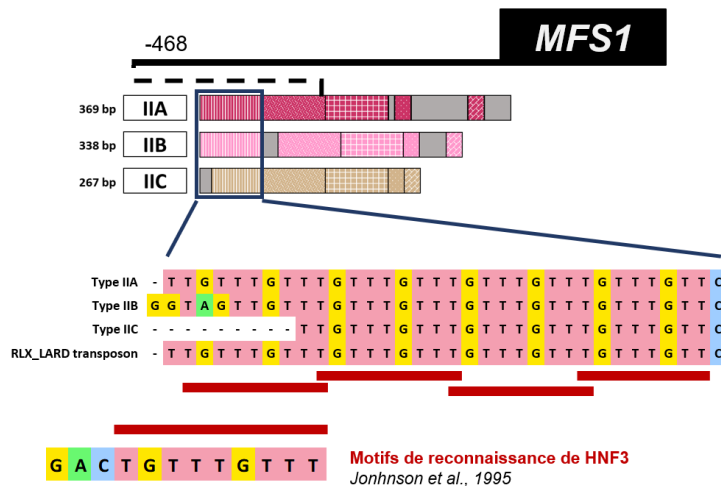


Figure 14 Identification des éléments de régulation potentiels retrouvés à l'extrémité 5' des inserts de type IIA, IIB et IIC. Le motif de reconnaissance HNF3 (Johnson et al., 1995) est souligné en rouge.

L'analyse des séquences des inserts de type II a révélé la présence de séquences similaires aux motifs reconnus par le facteur de transcription HNF3 du rat (Johnson *et al.*, 1997; Kaestner, 2000) , bien que ce facteur de transcription ne soit pas connu chez les ascomycètes. Néanmoins, les motifs HNF3 sont répétés trois fois à l'extrémité 5' des inserts de type IIA et IIB et deux fois dans l'insert de type IIC (Figure 14). Ces observations suggèrent leur implication dans la régulation de la transcription de *MFS1* à partir des inserts de type II.

En résumé, nous supposons que la surexpression de *MFS1* pourrait résulter d'une ou plusieurs variables liées aux inserts de type I, II, et III :

- La position et la taille des inserts.
- Le contenu des inserts :
 - o Motifs MCB pour l'inserts de type I.
 - o Motifs HNF3 pour les inserts de type II.
- Les séquences du promoteur *MFS1* en dehors des inserts

III.2. Démarche

L'objectif de notre démarche était d'identifier les variables influençant la modulation de la transcription par les inserts. Pour ce faire, nous avons choisi d'isoler chaque variable pouvant potentiellement expliquer la variation de transcription. Nous avons opté pour l'utilisation de fusions transcriptionnelles comportant un gène rapporteur fluorescent (la RFP), dont l'expression serait exclusivement modulée par l'allèle P_{MFS1} situé en amont. Les fusions transcriptionnelles

(Figure 15A) sont introduites dans une souche dénommée $\Delta KU70$ (HS1000) (Bowler et al., 2010), où le gène *KU70* a été délété et remplacé par un marqueur de sélection conférant la résistance à la généticine (G418R).

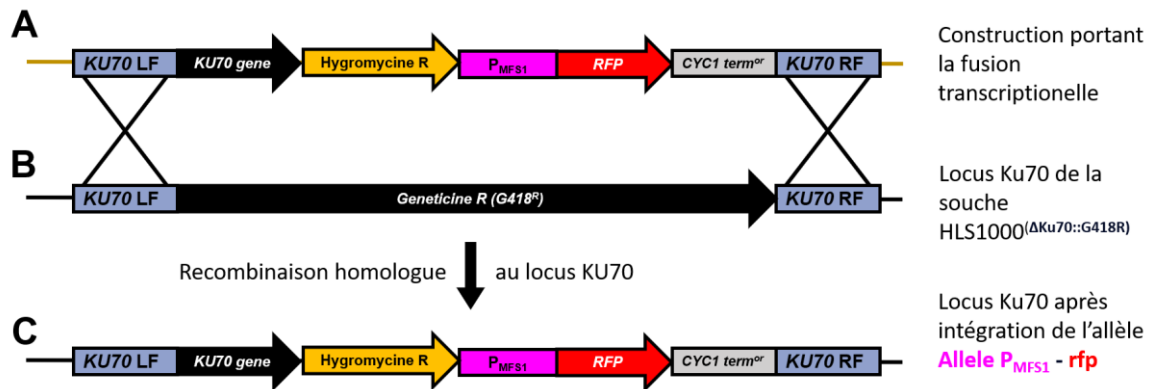


Figure 15 Principe de l'intégration de la fusion transcriptionnelle au locus *KU70*. L'intégration de la fusion transcriptionnelle (A) est réalisée par recombinaison homologue au locus *KU70* (B) de la souche HLS1000 grâce aux bords flanquants *KU70* LF et RF bordant la fusion transcriptionnelle. A/Construction comportant la fusion transcriptionnelle P_{MFS1} - *rfp* possédant le marqueur de sélection menant à la résistance à l'hygromycine, le gène *KU70* ainsi que les séquences flanquant les bords *KU70*. B/ Séquence présente entre les deux séquences flanquantes *KU70* LF et RF (en bleu) dans la souche de *Z. tritici* HLS1000, ici le gène de résistance à la généticine remplace le gène *KU70*. C) Séquence au locus *KU70* après intégration de la fusion transcriptionnelle dans la souche de *Z. tritici* HLS1000 transformée.

Ces souches présentent un fond génétique IPO323 et ne diffèrent que par la substitution du gène *KU70* par *G418R* (Figure 15B). La suppression du gène *KU70* réduit la recombinaison non homologue (NHEJ), guidant ainsi presque systématiquement les fusions transcriptionnelles possédant les séquences du gène *KU70* vers le locus du gène *KU70* qui sera restauré lors de l'intégration de la construction après transformation (Figure 5C), plutôt que de les insérer aléatoirement dans le génome. Cette approche nous permet d'estimer les modulations d'expression de *MFS1* par les allèles P_{MFS1} par l'intermédiaire de la mesure de la fluorescence. Puis, l'intégration des fusions transcriptionnelles au locus du gène *KU70* (sur le chromosome 3) nous permet d'avoir des souches dont l'expression du gène *MFS1* (sur le chromosome 7) n'est pas modulée par les inserts. Cela évite tout effet éventuel de l'activité du transporteur *MFS1* sur sa propre transcription. Ces transformants ne diffèrent donc que par le type d'allèle P_{MFS1} en amont du gène rapporteur fluorescent (RFP).

Les allèles P_{MFS1} -sans insert, P_{MFS1} -type_I, P_{MFS1} -type_IIA, P_{MFS1} -type_III retrouvés dans les souches du champ respectivement IPO323, 09-ASA-3apz, 12-VM5A-5 et 15-PQ-2B (Omrane et al 2017) ont été clonés en amont de la RFP. Les constructions correspondantes ont été appelées respectivement Sans_insert-rfp I-rfp, IIA-rfp, III-rfp (Figure 16).

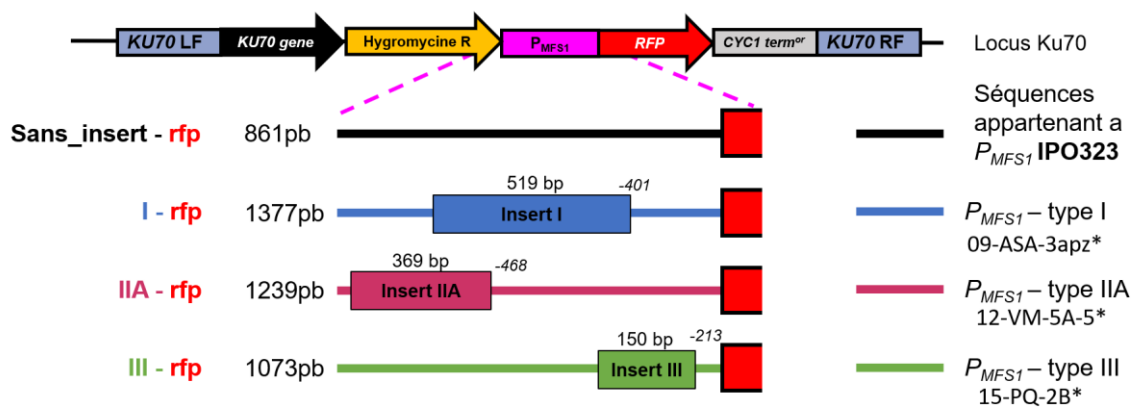


Figure 16 Allèle P_{MFS1} des différentes constructions intégrées au locus KU70 des transformants RFP. Les lignes de couleurs représentent les séquences propres aux promoteurs hors insert des souches de champ (*issues de Omrane et al., 2017) chez lesquelles les inserts ont été retrouvés (représentés sous forme de rectangle de la même couleur). En noir correspond la séquence P_{MFS1} sans insert issue de la souche IPO323.

Ces transformants permettent de voir l'influence des inserts dans le contexte de leur promoteur d'origine sur la modulation de l'expression de $MFS1$.

L'implication de l'événement d'insertion dans le promoteur de $MFS1$, par la taille de l'insert et de la zone d'insertion, a été investiguée grâce à la construction d'allèles P_{MFS1} pour lesquels des inserts neutres ont été intégrés dans le promoteur $MFS1$ de la souche IPO323 au site d'insertion et de même taille que les inserts I, II, et III appelé respectivement I-N-rfp, IIA-N-rfp et III-N-rfp (Figure 17).

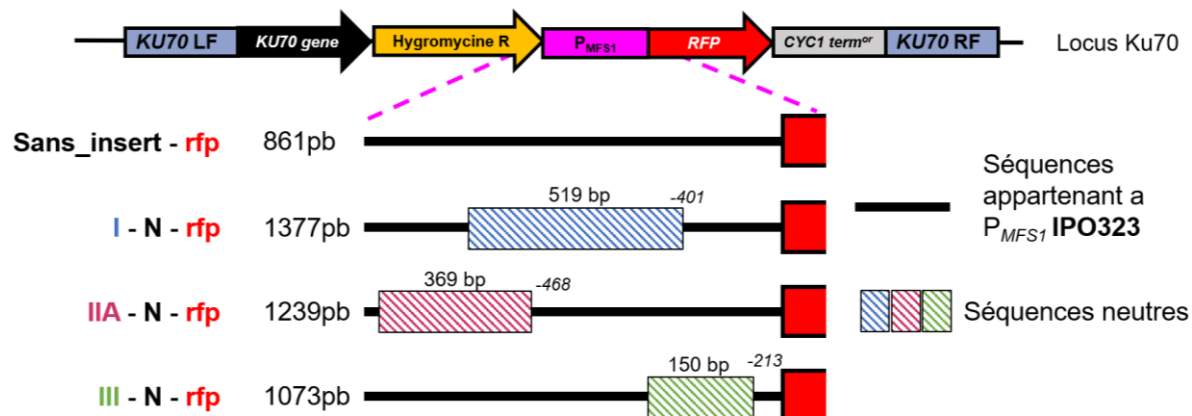


Figure 17 Allèle P_{MFS1} des différentes constructions intégrées au locus KU70 des transformant RFP « neutre ». Le trait noir correspond à la séquence du promoteur IPO323. Les rectangles hachurés correspondent aux inserts neutres au même lieu d'insertion et de la même taille que les inserts : bleu type I, rouge type IIA et vert type III.

Ces constructions à insert neutre permettent de voir si la fonction des éléments de régulation propres à P_{MFS1} est perturbée par les événements d'insertion et/ou si les inserts contiennent des éléments de régulation *vis*.

Enfin, afin de valider si les éléments de régulation MCB et HNF3 sont impliqués dans la régulation de la transcription, les motifs MCB et HNF3 ont été délétés ou remplacés par des séquences neutres dans les inserts I et IIA dans leurs promoteurs natifs respectifs en amont de la RFP (Figure 18).

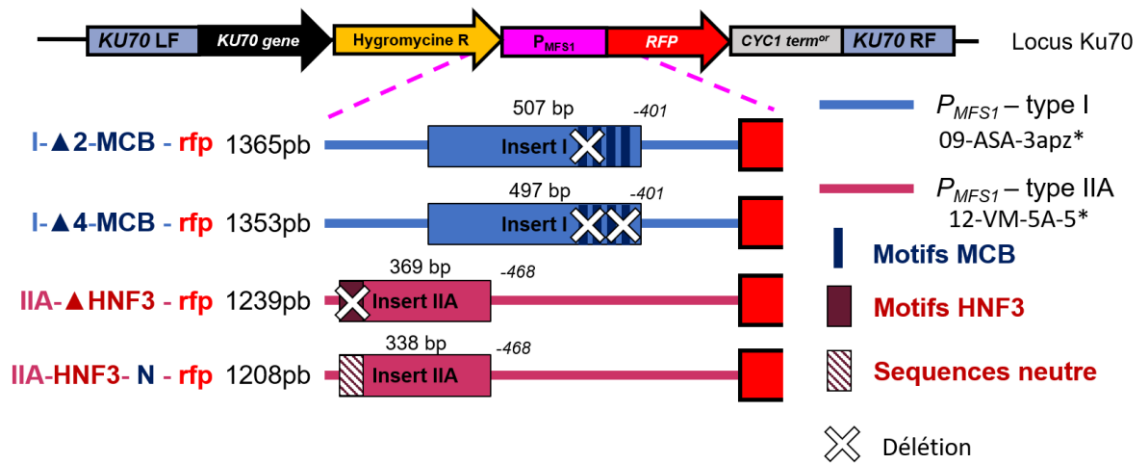


Figure 18 Allèle P_{MFS1} des différentes constructions intégrées au locus $KU70$ des transformants RFP possédant les motifs de régulation délétés ou remplacés. Les inserts concernés sont les inserts de type I et IIA. Les lignes de couleurs représentent les séquences propres aux promoteurs hors insert des souches du champ (*issues de Omrane et al., 2017) chez lesquelles les inserts ont été retrouvés (représentés sous forme de rectangle de la même couleur), trait bleu pour I, trait rouge pour IIA. Les rectangles représentent les inserts modifiés; bleu pour le type I, rouge pour le type II. Les motifs MCB, initialement au nombre de quatre, sont représentés chacun sous forme d'une barre verticale bleue foncée, et la délétion de ces inserts par une croix blanche. Les quatre motifs HNF3 sont représentés par un unique rectangle rouge pourpre. Leur délétion est représentée par une croix blanche et leur remplacement par une séquence neutre par un hachurage blanc/rouge pourpre.

Pour l'étude des motifs MCB, deux constructions ont été réalisées : l'une possédant l'insert de type I avec deux motifs sur quatre délétés, et l'autre avec les quatre motifs MCB délétés. Ces souches ont été nommées respectivement I-Δ2-MCB-rfp et I-Δ4-MCB-rfp. Dans les inserts de type IIA, les motifs HNF3 ont été délétés ou remplacés par une séquence neutre. les constructions correspondantes portent le nom IIA-ΔHNF3-rfp et IIA-HNF3-N-rfp.

La construction de fusions transcriptionnelles avec plusieurs versions de l'allèle P_{MFS1} a permis d'analyser l'implication des différents éléments de régulation potentiels dans la régulation de la transcription, par la mesure de fluorescence dans les transformants correspondants. Anaïs Pitarch, ingénieure du plateau de biologie moléculaire de BIOGER, a pris en charge la construction des plasmides et généré les transformants de *Z. tritici* correspondants. Au total, 11 fusions transcriptionnelles (Tableau III) ont été obtenues, avec un minimum de deux transformants par construction validée.

Tableau III Liste des 11 fusions transcriptionnelles RFP, Les transformants seront désignés selon la nomenclature suivante : type d'insert – modulation – rfp

Fusion transcriptionnelle	Type d'insert	Longueur totale du promoteur (pb)	Taille de l'insert (pb)	Promoteur sans insert (pb)	Matrice du promoteur (type d'insert associé)
sans_insert-rfp	Sans	861	0	861	IPO323 (sans insert)
I-rfp	I	1377	519	858	09-ASA-3apz (I)
I-N- rfp	I	1380	519	861	IPO323
I-▲2-MCB- rfp	I	1365	507	858	09-ASA-3apz (I)
I-▲4-MCB- rfp	I	1353	495	858	09-ASA-3apz (I)
IIA- rfp	IIA	1239	369	870	12-VM-5A-5 (IIA)
IIA-▲HNF3- rfp	IIA	1208	338	870	12-VM-5A-5 (IIA)
IIA-HNF3-N- rfp	IIA	1239	369	870	12-VM-5A-5 (IIA)
IIA-N- rfp	IIA	1230	369	861	IPO323
III- rfp	III	1073	149	924	15-PQ-2B (III)
III-N- rfp	III	1010	149	861	IPO323

III.3. Matériel et Méthodes

Matériel fongique et condition de culture

Les souches du champ possédant les allèles de *MFS1* sans insert, de type I, de type IIA et de type III, respectivement IPO323, 09-ASA-3apz, 12-VM5A-5 et 15-PQ-2B, ont été utilisées pour l'amplification des différentes parties du promoteur de *MFS1*. Ces souches, stockées à -80 °C dans

une solution de glycérol à 30 %, ont été mises en culture pendant 7 jours sur milieu solide YPD à 18 °C.

Extraction d'ADN

L'ADN des souches de *Z. tritici* utilisées lors du clonage a été extrait et purifié avec le kit DNeasy® 96 Plant Kit (Qiagen). La concentration et la pureté de l'ADN extrait ont été estimées par mesure de densité optique (NanoDrop™ One, Thermo Fisher) à 260, 230 et 280 nm.

Amplification de l'ADN à partir de *Z. tritici*.

L'amplification des fragments du promoteur MFS1 des souches du champ a été réalisée avec les amorces MFS1_2f/MFS1_4r, ainsi que les conditions PCR décrites par Omrane et al. 2017.

Vecteur

Le vecteur receveur utilisé pour le clonage des différents allèles du promoteur MFS1 est le plasmide pKu70_Hygro_PmeI_RFP. Ce plasmide est composé d'une cassette de résistance à la kanamycine comme marqueur de sélection bactérien, ainsi qu'une région à transférer comprise entre les bords gauche (LF) et droit (RB) de l'ADN-T d'*A. tumefaciens*. Cette région contient le gène RFP, l'enzyme de restriction PmeI, la cassette de résistance à l'hygromycine, ainsi que le gène Ku70 et ses bordures flanquantes gauche et droite.

Amplification des fragments

Les différents allèles du promoteur MFS1 à cloner ont été amplifiés avec des amorces possédant chacune une partie flanquante de 20 et 19 pb, homologue aux extrémités 5' et 3' du vecteur linéarisé pKu70_hygro_RFP_SgrD1.

Clonage

L'assemblage des fragments a été réalisé avec la technique d'assemblage Gibson et le kit Gibson Assembly (New England Biolabs).

Conditions de culture

Les différentes transformants RFP ont été mises en préculture liquide dans 10 mL de YPD liquide pendant 7 jours à 18 °C et 150 rpm. La concentration cellulaire a été évaluée par mesure de l'absorbance moyenne à 405 nm en utilisant la relation de Ballu et al., 2021.

$$Cf = e^{16,4241 + (1,5276 \times \ln(A-B)) + 0,0724 \times 2 \ln(A-B)}$$

Avec :

- Cf: la concentration en spores.mL⁻¹;
- A : l'absorbance moyenne d'une préculture ;
- B : l'absorbance moyenne du blanc (YPD liquide, moyenne de 6 puits).

Les concentrations ont ensuite été ajustées à 10⁴ spores.mL⁻¹ dans 10 mL de milieu **YPD** et mises en culture pendant 4 jours à 18 °C et 150 rpm

Mesure de la fluorescence et de l'absorbance

Après ces 4 jours, 200 µL de chaque culture liquide ont été placés dans les puits d'une microplaque 96 puits (Greiner black, clear bottom). L'absorbance a été mesurée à 405 nm avec le lecteur de microplaques (Clariostar). La mesure de la fluorescence a été réalisée au lecteur de microplaques (Clariostar) avec une longueur d'onde d'excitation de 570-15 nm et d'émission de 620-20 nm, un gain à 1250 et une distance focale de 8,7 mm, 20 points en spirale de mesure sur 6 mm de diamètre par puits.

Traitement des données

La concentration cellulaire des échantillons a été déterminée par la mesure des absorbances des échantillons et normalisée à l'absorbance du milieu de culture (A) (voir formule III.1). La fluorescence mesurée des échantillons a été normalisée à la fluorescence mesurée dans le milieu de culture (B) :

$$B = \text{flu}_{\text{échantillon}} - \text{Flu}_{\text{moyenne milieux}}$$

Cette fluorescence a ensuite été rapportée à la concentration cellulaire de l'échantillon (C).

$$C = \frac{B}{A}$$

Enfin, le rapport (C) de la fluorescence normalisée de l'échantillon a été comparé à la moyenne de la fluorescence normalisée des souches isogéniques rapportrices **RFP** sans insert. Nous appellerons cette valeur **D**, la fluorescence relative :

$$D = \frac{C \text{ échantillon}}{C \text{ moyenne IPO_RFP}}$$

Traitements statistiques

Les moyennes des valeurs de fluorescence relative (D) de chaque réplicat biologique (n=4) ont été analysées via une ANOVA après transformation (\sqrt{D}). La distribution normale des données a été validée par le test de Shapiro-Wilk.

III.4. Résultats

Validation de l'outil

Dans un premier temps, nous avons analysé la fluorescence des transformants RFP comportant les inserts étudiés par Omrane et al., 2017, à savoir les inserts I, IIA, et III, afin de valider si la fluorescence mesurée était bien le reflet d'une modulation de l'expression du gène RFP par les différents allèles de P_{MFS1} . Pour cela, nous avons comparé l'impact des inserts sur la modulation de la fluorescence dans les transformants correspondants, avec l'impact des mêmes promoteurs sur la transcription de $MFS1$ dans les souches MDR de type I, II, et III (Omrane et al. 2017).

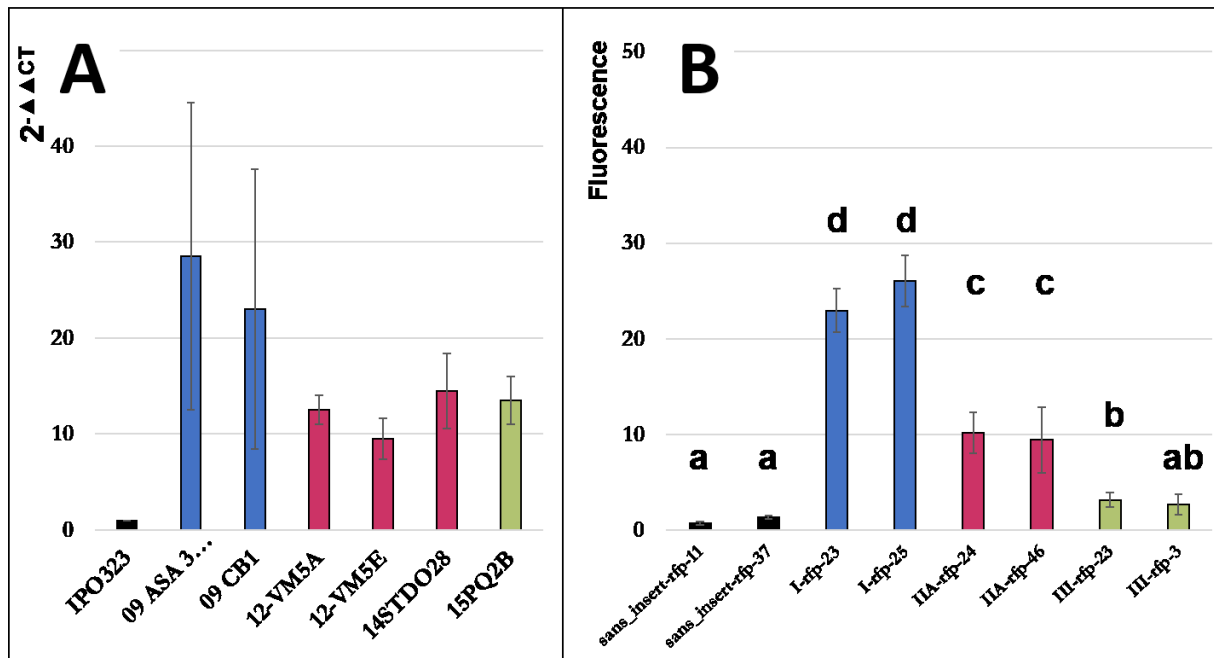


Figure 19 Comparaison entre l'analyse quantitative des ARNm de $MFS1$ et la variation de la fluorescence pour les mêmes allèles de P_{MFS1} . A/ Variation de l'expression de $MFS1$ mesurée par qRT-PCR dans des souches de champ possédant les inserts I, IIA, ou III comparée à la référence IPO323 (Omrane et al., 2017). B/ Variation de la fluorescence dans les transformants P_{MFS1} -RFP possédant les inserts I, IIA, ou III comparée aux transformants Sans_insert-rfp. En noir, les souches ne possédant pas d'insert. En bleu, les souches possédant l'insert de type I; en rouge, les souches possédant les inserts de type II; en vert, les souches possédant l'insert de type III. Les valeurs d'expression en A sont extrapolées des mesures issues de Omrane et al. 2017. Les valeurs de fluorescence en B proviennent de $n=4$ réplicats biologiques. Les lettres différencient les catégories significativement différentes. Statistiques / ANOVA sur données transformées (racine carrée de la fluorescence relative (F)) : p -value < 0,0001, comparaisons par paires post-hoc de Tukey, seuil de significativité des groupes : p -value > 0,05.)

Les inserts de type I et IIA, situés dans le promoteur P_{MFS1} en amont de la RFP, provoquent une augmentation significative de la fluorescence par rapport à l'allèle sans insert (Figure 19B). Parmi ceux-ci, I-rfp se distingue par une fluorescence 25 fois plus élevée que sans_insert-rfp, surpassant les souches avec les inserts de type IIA, qui ne présentent qu'un facteur d'augmentation de 10. Les

observations sur l'augmentation de la fluorescence induite par les inserts I et IIA sont cohérentes avec l'augmentation de la transcription de *MFS1* par ces mêmes inserts, comme retrouvé dans les souches de champ (Omrane et al., 2017) (Figure 19A). Toutefois, l'observation de la fluorescence relative des souches III-rfp n'est pas du même ordre que les mesures d'expression du gène *MFS1* dans la souche 15-PQ-2B: un facteur de 10 dans la souche de champ, contre un facteur de 3 pour les souches rapportrices III-rfp (Figure 19). En dernier de ce dernier, les mesures de la fluorescence dans ce contexte permettent d'analyser les éléments de régulation impliqués dans l'expression de *MFS1*, validant ainsi les souches rapportrices RFP comme outil.

La surexpression de *MFS1* est-elle due aux séquences spécifiques des inserts ou d'autres éléments dans le promoteur initial ?

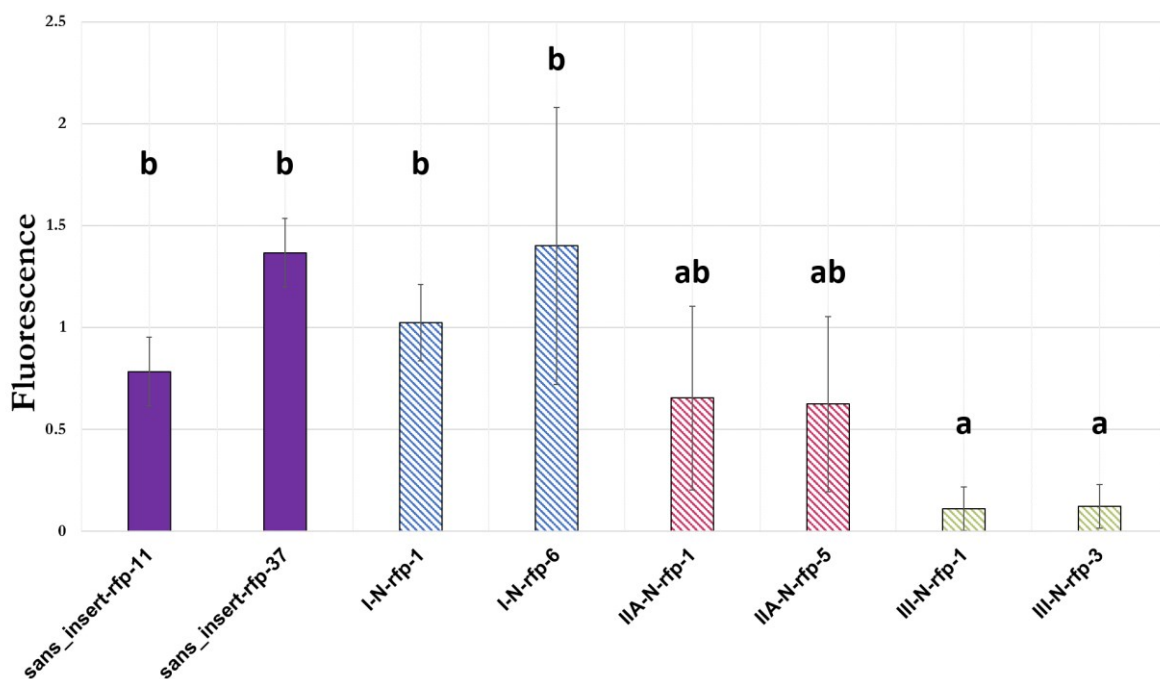


Figure 20 Variation de la fluorescence relative dans les transformants $P_{MFS1} - rfp$ possédant des inserts aux séquences neutres à la même position et de la même taille que les inserts type I, IIA et III. La fluorescence absolue a été mesurée dans chaque transformant, normalisée à la concentration cellulaire et rapportée à la fluorescence moyenne des transformants Sans_insert-rfp-11 et 37. Les moyennes des valeurs apparaissent sous forme d'histogramme, et les barres d'erreur correspondent aux écarts-types des répétitions biologiques ($n = 4$ pour tous les transformants). Statistiques : ANOVA sur données transformées (racine carrée de la fluorescence relative (F)) : p -value < 0,0001, comparaisons par paires post-hoc de Tukey, seuil de significativité des groupes : p -value > 0,05.

Afin de déterminer si les inserts I, IIA et III modifient l'expression en perturbant le promoteur initial dans lequel ils s'insèrent, nous avons comparé la fluorescence relative chez les transformants RFP avec les inserts neutres : I-N-rfp, IIA-N-rfp et III-N-rfp. La fluorescence des souches possédant les inserts neutres I et IIA est comparable à celle des souches sans insert (Figure 20). Cependant, le remplacement de l'insert de type III par un insert neutre réduit significativement la

fluorescence, étant 8 fois moins élevée par rapport aux génotypes sans insert. Ainsi, la taille et la zone d'insertion des inserts de type I et IIa n'ont pas d'impact sur la fluorescence, contrairement à l'insert de type III. Ces résultats montrent par ailleurs que les séquences propres des inserts de type I, IIa et III sont essentielles à la surexpression de *MFS1*.

Implication des motifs MCB dans la surexpression de *MFS1* (P_{MFS1} -Type-I).

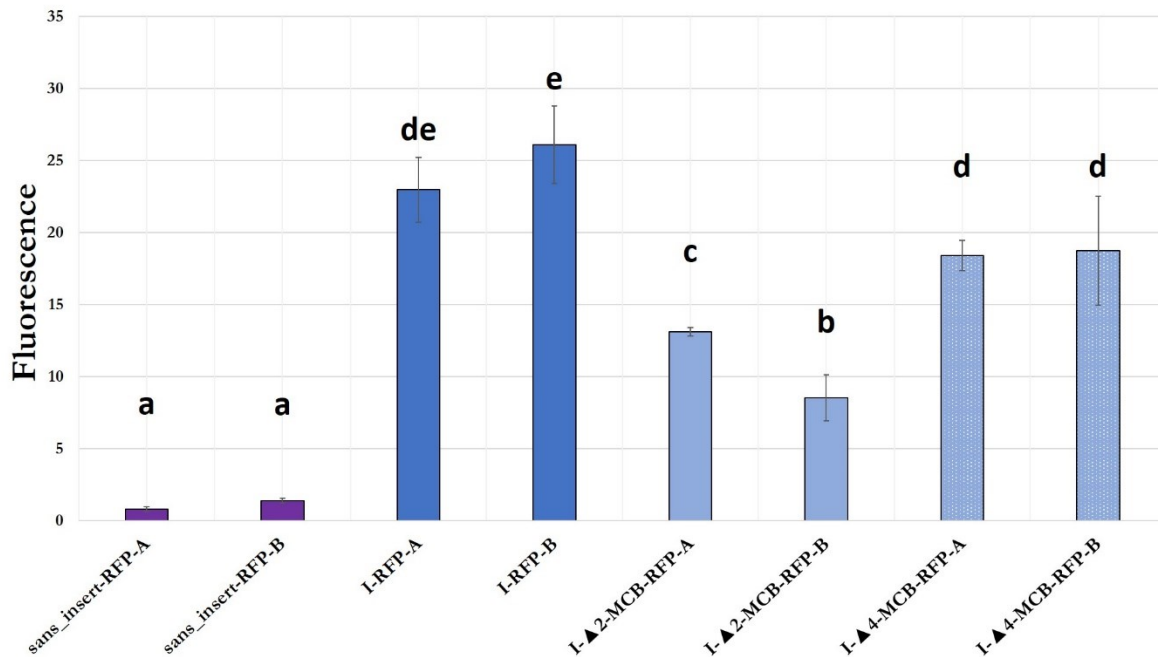


Figure 21 Impact de la mutation des éléments MCB sur la fluorescence dans les transformants P_{MFS1} -rfp possédant les inserts type I complets, et avec deux ou quatre éléments MCB délétés respectivement. La fluorescence absolue a été mesurée chez chaque transformant, normalisée à la concentration cellulaire et rapportée à la fluorescence moyenne des transformants Sans_insert-rfp-11 et 37. Les moyennes des valeurs apparaissent sous forme d'histogramme, et les barres d'erreur correspondent aux écarts-types des répétitions biologiques ($n = 4$ pour tous les transformants, sauf pour I-▲2_MCB-rfp-19, I-▲4_MCB-rfp-10, I-▲2_MCB-rfp-12, $n = 3$). Statistiques : ANOVA sur données transformées (racine carrée de la fluorescence relative (F)) : p -value < 0,0001, comparaisons par paires post-hoc de Tukey, seuil de significativité des groupes : p -value > 0,05.

Les motifs MCB, initialement retrouvés au nombre de quatre dans l'insert de type I, ont été supprimés soit partiellement (2 sur 4) soit totalement chez les transformants I-▲2-MCB-rfp et I-▲4-MCB-rfp. La comparaison de leur fluorescence par rapport au transformant possédant l'insert de type I complet, I-rfp, a permis de déterminer l'importance de ces motifs.

La suppression de deux ou quatre motifs MCB diminue (significativement) la fluorescence par rapport à ceux possédant l'insert de type I complet (Figure 21), sans toutefois éliminer complètement la surexpression. De façon surprenante, la suppression de deux motifs MCB entraîne une baisse plus prononcée de la fluorescence (facteur 2) que la suppression de quatre motifs (facteur 1.5), par rapport au transformant I-rfp possédant l'insert de type I dans son intégralité. Ces résultats suggèrent que les motifs MCB ne sont pas les seuls éléments de l'insert de

type I impliqués dans la surexpression de *MFS1* et que cette surexpression n'est pas directement corrélée au nombre de motifs MCB.

Implication des éléments HNF3 dans la surexpression de *MFS1* dans les souches P_{MFS1} -type II-rfp.

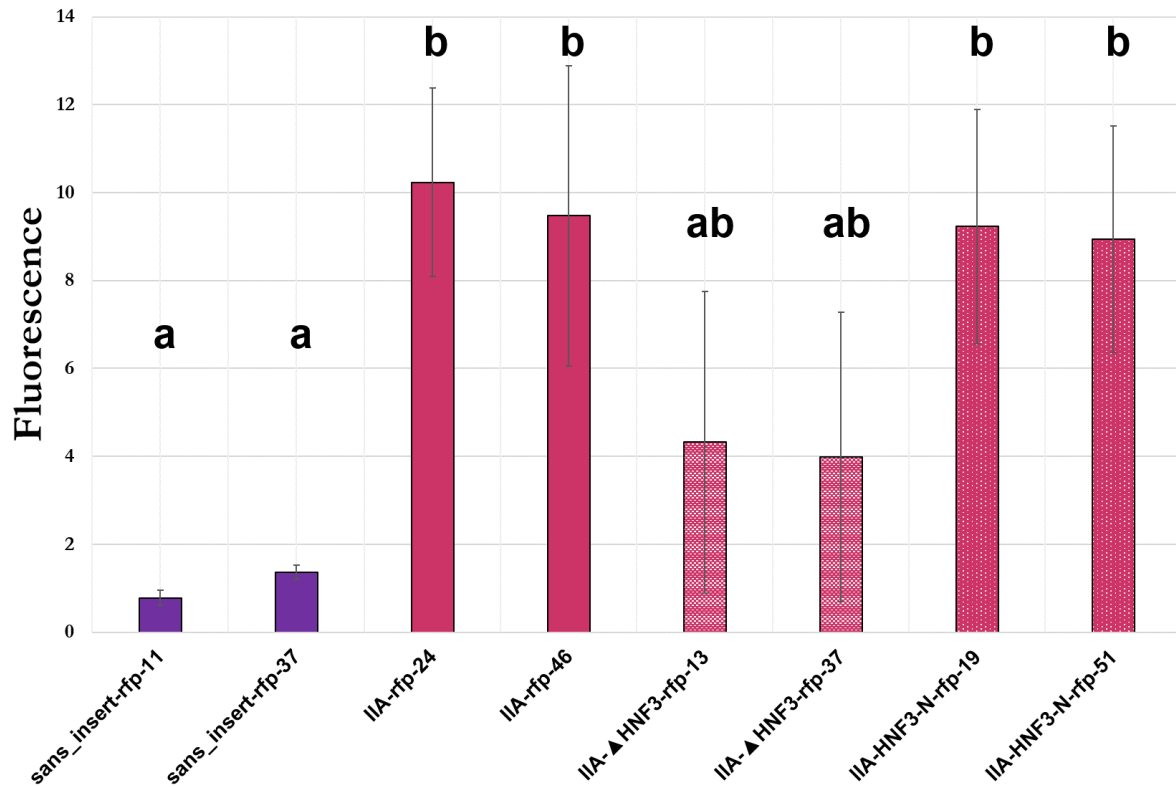


Figure 22 Variation de la fluorescence relative chez des transformants P_{MFS1} -rfp possédant les inserts Type IIA, IIC complet, et avec les éléments HNF3 du type IIA délévés ou remplacés par une séquence neutre. La fluorescence absolue a été mesurée chez chaque individu, normalisée à la concentration cellulaire et rapportée à la fluorescence moyenne des souches sans insert Sans_insert-rfp-11 et 37. Les moyennes des valeurs apparaissent sous forme d'histogramme, et les barres d'erreur correspondent aux écarts-types des répétitions biologiques ($n = 4$ pour tous les individus, sauf pour IIA-ΔHNF3-13, IIA-ΔHNF3-37 $n = 2$). Statistiques : ANOVA sur données transformées (racine carrée de la fluorescence relative (F)) : p -value < 0,0001, comparaisons par paires post-hoc de Tukey, seuil de significativité des groupes : p -value > 0,05.

Les motifs HNF3, identifiés dans les inserts de type IIA, B, C, et E en 5', ont été soit délévés soit remplacés par des séquences neutres chez les transformants IIA-ΔHNF3-rfp et IIA-HNF3-N-rfp. Le but de cette démarche était de déterminer si les inserts de type II dans P_{MFS1} conduisaient à la surexpression de *MFS1* par l'intermédiaire de ces motifs. La comparaison entre les transformants IIA-rfp, IIA-ΔHNF3-rfp, et IIA-HNF3-N-rfp n'a révélé aucune différence significative en termes de fluorescence (Fig. 22). Cependant, les transformants IIA-ΔHNF3-rfp ont une fluorescence qui semble plus faible que celle des transformants IIA-rfp et IIA-HNF3-N-rfp. Ces observations sont à mettre en regard de la forte variabilité entre les répliques biologiques pour IIA-ΔHNF3-rfp. Cette

observation suggère que la modulation de l'expression par les inserts de type IIa est due à d'autres éléments régulateurs que les motifs HNF3.

III.4.1. Discussion

Notre démarche pour étudier le rôle des éléments de transcription au moyen de fusions transcriptionnelles P_{MFS1} -rfp a pu être validée. En effet, les différences de fluorescence entre les souches possédant les fusions transcriptionnelles RFP avec les différents allèles P_{MFS1} du champ, étaient similaires aux différences d'expression de $MFS1$ mesurées chez les souches du champ possédant les mêmes allèles. Nous avons ainsi pu confirmer que les inserts de type I, IIA, et III influencent la surexpression de $MFS1$ par le contenu de leur séquence. Dans l'insert de type I, les motifs MCB sont partiellement impliqués dans la surexpression de $MFS1$, mais n'expliquent pas totalement cette surexpression. Dans notre cas, le nombre de motifs MCB ne corrèle pas avec le niveau de surexpression, comme observé chez *S. pombe* (Verma *et al.*, 1992).

Pour les inserts de type IIA, il semble que les motifs HNF3 ne soient pas les éléments *cis* expliquant la surexpression de $MFS1$. Toutefois, l'analyse des séquences conservées à travers les inserts IIA, B, C, D, et E, et communes avec d'autres transposons, suggère que ces derniers pourraient contenir d'autres motifs de régulation nécessaires à la surexpression de $MFS1$. Les séquences conservées des inserts de type II contiennent un cluster de motifs de régulation ABF1 et RAP1 (Figure 23) impliqués dans l'ouverture de la chromatine chez *S. cerevisiae* (Yarragudi *et al.*, 2004). L'implication de ces motifs de régulation dans la surexpression de $MFS1$ reste maintenant à confirmer.

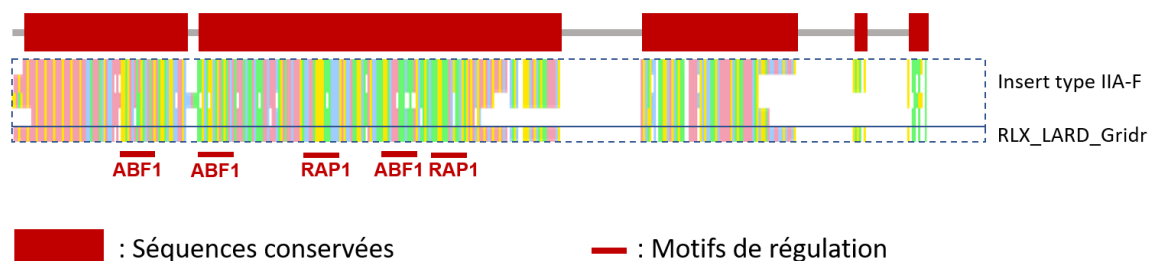


Figure 23 Alignement MAFFT des séquences des inserts de type II A, B, C, D, E, F et du retrotransposon *RLX_LARD_Gridr*. Les séquences conservées sont représentées sous formes de rectangles rouges. Les éléments-*cis* de régulation homologues à ceux décrits chez Gasch *et al.*, 2004, sont représentés sous formes de traits rouge.

Dans l'insert de type III, comme pour les inserts I et II, le contenu de sa séquence est essentiel pour la surexpression (Figure 24 – A) mais des éléments de régulation supplémentaires seraient en interaction avec cet insert. En effet, l'allèle P_{MFS1} -type_III introduite au chromosome 3 en amont de la RFP (Figure 24 – A) ne permet pas d'obtenir les mêmes niveaux d'expression que ceux atteints

par le gène *MFS1* chez la souche du champ d'origine (15-PQ-2B) possédant la même allèle (Figure 24B) ni ceux de la souche de référence isogénique P_{MFS1}-type_III (Figure 24C). Ces différences de niveau d'expression pour la même allèle P_{MFS1}-type_III située sur différents chromosomes, suggèrent que des éléments de régulation *cis*, peut-être des UAS, présentes sur le chromosome 7 agirait avec l'insert de type III dans l'augmentation de la transcription.

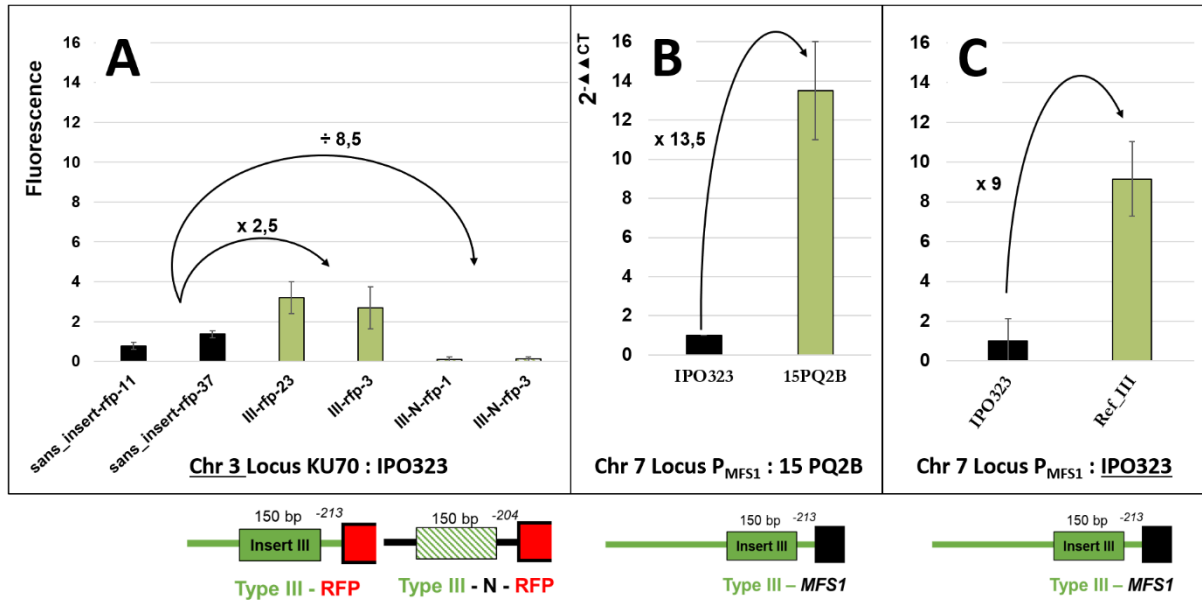


Figure 24 Niveaux d'expression relatifs liés à l'insert de type III en fonction du type d'allèle P_{MFS1}. A/ Expression de la RFP par mesure de la fluorescence dans les transformants RFP. B/ Expression de MFS1 par qRT-PCR dans les souches de champ PMFS1-Type_III. C/ Expression de MFS1 par qRT-PCR dans les souches isogéniques de référence (transformant IPO 323 avec remplacement d'allèle par PMFS1-Type_III). La composition des promoteurs portant l'insert de type III correspondant à chaque expérience (A, B, et C) se trouve en bas. Les traits verts correspondent à la séquence promotrice (hors insert) associée à l'insert de type III retrouvé dans la souche du champ 15-PQ-2B. Le trait noir correspond à la séquence promotrice MFS1 de IPO323. En aval des séquences promotrices figure le type de gène contrôlé, rectangle noir : MFS1, rectangle rouge : RFP

L'insertion d'un insert neutre de même taille et au même endroit (213 pb en amont du codon start) que l'insert de type III dans l'allèle P_{MFS1}-sans_insert réduit de façon significative (divisé par 8,5) le niveau d'expression par rapport à celui obtenue avec l'allèle P_{MFS1}-sans_insert (Figure 24A). Ces résultats suggèrent que des éléments de régulation *cis* propres à P_{MFS1}-sans_insert pourraient se trouver dans la zone située entre 204 pb et 401 pb en amont du codon start de *MFS1*. Ces éléments de régulation *cis* seraient essentiels à l'expression basale de *MFS1* (Figure 25) (Figure 26) et pourraient s'agir du motif de régulation HAP2 retrouvé chez *Aspergillus* sp. et *N. crassa* (Brakhage *et al.*, 1999; Steidl *et al.*, 1999) impliqués dans l'ouverture de la chromatine, ou le motif de régulation RME1 impliqué dans la croissance cellulaire et la régulation de la mitose (Van Dyk *et al.*, 2003) (Figure 26). Ainsi, on pourrait imaginer que dans l'allèle P_{MFS1}-type III, les éléments de régulation nécessaires à l'expression basale cités auparavant soient aussi éloignés de *MFS1* par l'insert de type III (Figure 25 B).

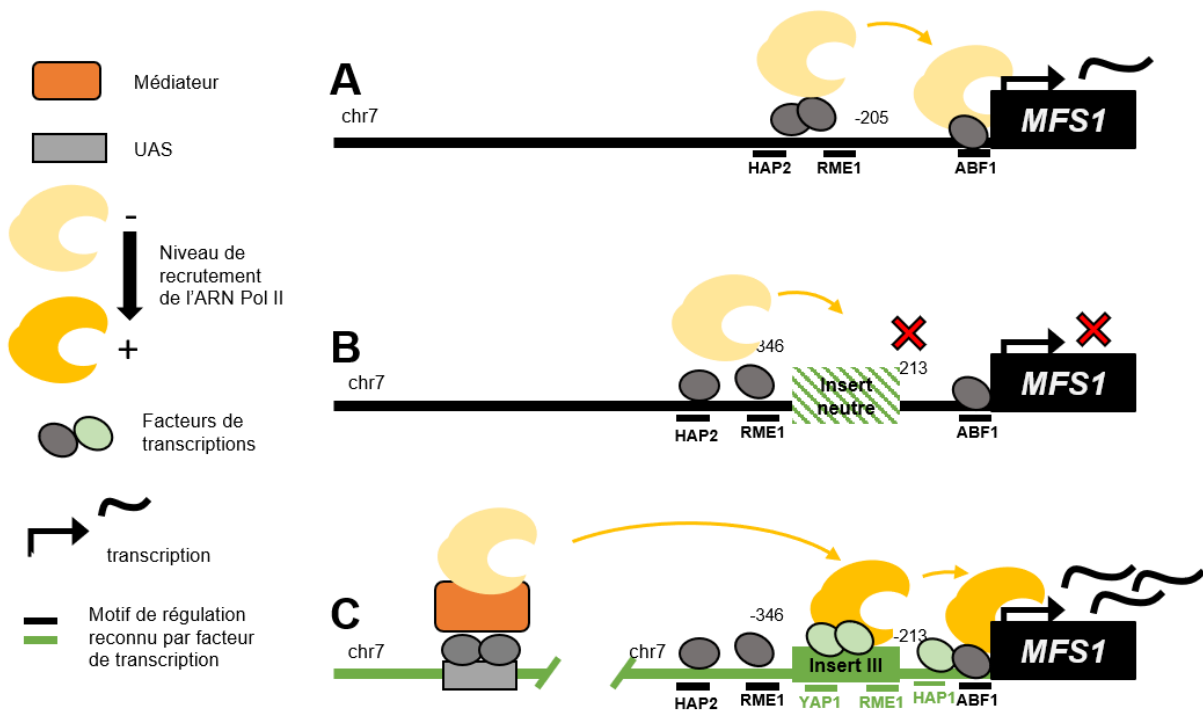


Figure 25 Scénarios sur l'implication des motifs de régulation cis et l'insert de type III sur l'expression de MFS1. A/ Expression basale de MFS1 chez IPO323. B/ Sous-expression de MFS1 par l'éloignement des motifs de régulation HAP2 et RME1 par l'insert neutre de 150 pb en position -213. C/ Surexpression de MFS1 par le recrutement de facteur(s) de transcription par les motifs de régulation cis présents dans l'allèle P_{MFS1}-type_III. Les motifs de régulation sont représentés sous forme de barres horizontales : en noir, les motifs de régulation initialement présents dans P_{MFS1}-sans_insert et en vert, les motifs de régulation apportés par les inserts III. Les facteurs de transcription (TF) sont représentés sous forme de cercles de couleurs : en gris, les TF recrutés par les motifs de régulation initialement présents dans P_{MFS1}-sans_insert ; en vert, ceux recrutés par les motifs de régulation apportés par les allèles P_{MFS1}-type_III

La surexpression, toutefois observée chez les souches du champ porteuses de l'allèle P_{MFS1}-type III, serait alors due à des éléments de régulation apportés par l'insert de type III qui compenseraient largement la perte des éléments de régulation cis éloignés (Figure 25 B). On ne peut néanmoins pas exclure l'implication d'autres éléments de régulation hors insert retrouvés dans les différents allèles P_{MFS1} – (type IIA et III) non présents dans l'allèle P_{MFS1}-sans_insert (Figure 26) comme l'élément HAP1, par exemple (Figure 25 C) (Figure 26).

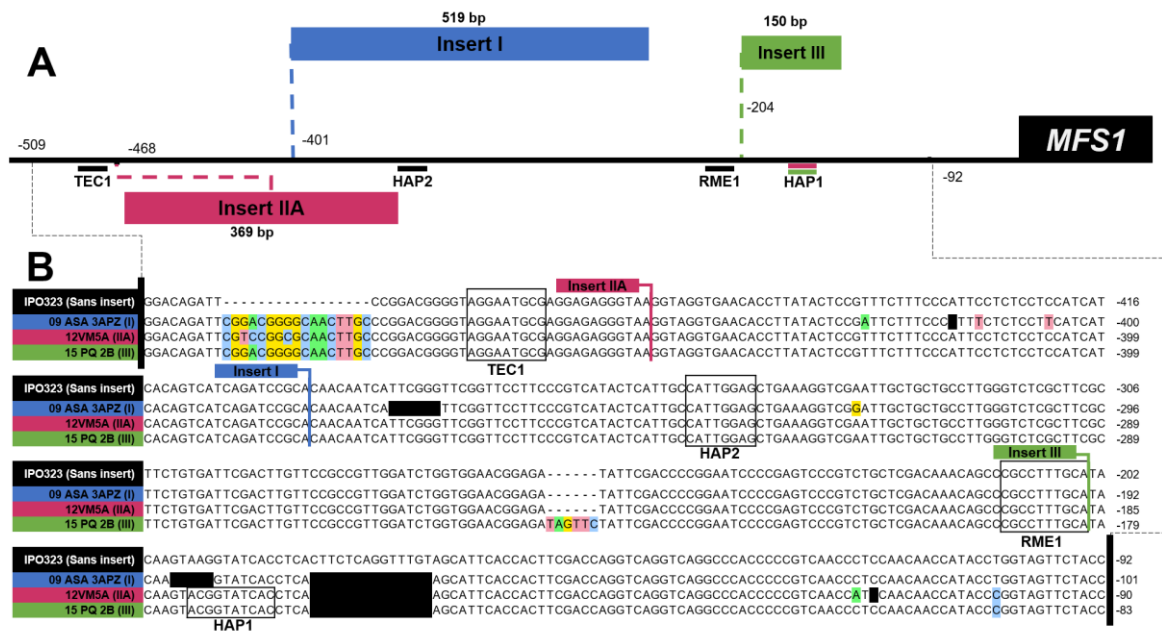


Figure 26 Comparaison des séquences de P_{MFS1} chez les souches de champ de référence issues de la publication Omrane et al., 2017. A/ Schéma global représentant le promoteur de $MFS1$ avec la position des inserts par rapport au codon start de $MFS1$. Les motifs de régulation putatifs présents dans P_{MFS1} hors insert sont représentés sous forme de barre horizontale en noir si présents chez toutes les souches de champ, en rouge et vert si présents dans les souches 12-VM-5A (IIA) et 15-PQ-2B (III). B/ Alignement MAFFT des séquences promotrices hors insert des souches de champ de référence, en noir pour IPO323, en bleu pour 09-ASA-3apz (I), en rouge pour 12-VM-5A (IIA), et en vert pour 15-PQ-2B (III). Les motifs de régulation putatifs sont encadrés en noir.

Ainsi, les fusions transcriptionnelles ont permis de déchiffrer plus finement comment les inserts I, IIA et III agissaient sur la surexpression de $MFS1$. Les motifs de régulation présents dans chacun de ces inserts sont les composantes essentielles à la surexpression de $MFS1$ et peuvent agir par le recrutement des facteurs de transcription non mutés présents chez IPO323. Néanmoins, d'autres éléments *cis* peuvent entrer en jeu comme c'est le cas de l'allèle P_{MFS1} -type III. Les fusions transcriptionnelles pourront donc permettre d'analyser les éléments *cis* de régulation ainsi que les éléments *trans* associés. On pourrait, par la technologie CRISPR, muter les éléments *cis* potentiels dans P_{MFS1} ou muter les potentiels facteurs de transcription. La mesure des dynamiques d'expression en fonction des conditions de culture pourra aussi être mesurée en temps réel par l'intermédiaire de la mesure de la fluorescence.

IV. Discussion générale

La lutte contre *Zymoseptoria tritici*, un pathogène majeur du blé, repose largement sur l'usage de fongicides. Cependant, l'efficacité de ces traitements est compromise par l'émergence de populations résistantes. Alors que les mécanismes de résistance liée à la cible des fongicides sont bien caractérisés, les mécanismes moléculaires responsables du phénotype de résistance multidrogue (MDR) restent mal compris. En 2017, les inserts I, II et III dans le promoteur *MFS1* avaient été décrits comme responsables de la surexpression de *MFS1*, conduisant à la MDR (Omrane *et al.*, 2017). Toutefois, la découverte en 2020 d'un insert dans P_{MFS1} non lié à la MDR (Mäe *et al.*, 2020) a soulevé des questions sur les mécanismes associés aux inserts liés à la MDR. Durant cette thèse, nous avons donc voulu savoir si les inserts du promoteur *MFS1* étaient les uniques acteurs de la MDR. Puis, quels étaient les motifs de régulation présents dans ces inserts entraînant la surexpression et quels étaient les facteurs de transcription liés.

1- Le phénomène MDR chez *Z. tritici* est plus complexe.

Dans les cas cliniques des champignons pathogènes de l'homme, des modifications dans des facteurs de transcription résultant en la surexpression de transporteurs ABC expliquent la majorité des cas de MDR (Sanglard *et al.*, 1995; Niimi *et al.*, 2004; Hagiwara *et al.*, 2017). La MDR chez les champignons phytopathogènes est également liée à des mutations dans des facteurs de transcription qui vont influencer l'expression de transporteurs MFS et ABC (Hayashi *et al.*, 2001; Kretschmer *et al.*, 2009). Chez *Z. tritici*, la MDR est surtout liée à la surexpression du gène *MFS1* par la présence d'inserts dans son promoteur. Toutefois, la présence d'inserts dans P_{MFS1} n'entraîne pas systématiquement la MDR. En effet, nous avons montré dans cette étude que sur les 13 inserts retrouvés dans les populations de *Z. tritici* au champ, seuls 8 inserts sont liés à la MDR. Estimer précisément la MDR au champ par PCR nécessite donc de comprendre quels sont les éléments de régulation *cis* réellement impliqués.

1.1 - Les inserts agissent de plusieurs manières sur la régulation de la transcription de *MFS1*.

Précédemment, Omrane *et al.* avaient (2017) émis plusieurs hypothèses concernant les mécanismes liés aux inserts I, II et III résultant en la surexpression de *MFS1* :

- Chez l'insert de type I, les éléments de régulation MCB présents dans l'insert, au nombre de quatre, seraient impliqués, par le recrutement d'un facteur de transcription.
- Chez les inserts de type II, les motifs HNF3 présents dans l'insert recruteraient les facteurs de transcription.

- Chez l'insert de type III, l'événement d'insertion en lui-même serait impliqué. Par l'éloignement d'un élément de régulation réprimant initialement la transcription de *MFS1*.

Par l'utilisation de fusions transcriptionnelles, nous avons montré que la présence d'inserts dans P_{MFS1} en soi n'entraîne pas de surexpression de *MFS1* : les inserts n'éloigneraient pas des motifs de régulation qui inhiberaient initialement la transcription. La surexpression de *MFS1* est bel et bien une conséquence de l'insertion de séquences spécifiques contenues dans les inserts.

Pour la séquence de l'insert de type I, nous avons pu confirmer que les motifs MCB étaient nécessaires pour la surexpression de *MFS1* dans les souches avec l'allèle P_{MFS1} -type_I, mais que le nombre de motifs n'était pas directement corrélé à la surexpression comme c'est le cas chez *S. pombe*. Les motifs MCB ne sont pas les seuls éléments de régulation permettant la surexpression de *MFS1* par l'insert de type I. En effet, d'autres motifs potentiels de régulation ont été identifiés dans l'insert de type I, comme une séquence de 18 pb située dans la partie 3' de l'insert I qui pourrait être reconnue par un homologue du facteur de transcription GAL4. Ce facteur de transcription, impliqué dans le métabolisme du sucre chez les ascomycètes (Choudhury & Whiteway, 2018), pourrait être impliqué dans la surexpression de *MFS1* par l'insert de type I. Une séquence de 21 pb a aussi été identifiée dans l'insert de type I et pourrait être reconnue par un homologue du facteur de transcription HSF1 (Heat Shock Factor 1), un facteur de transcription impliqué dans la réponse au stress thermique et dont l'activité est directement corrélée à l'acidification intracellulaire chez *S. cerevisiae* (Triandafillou *et al.*, 2020). Ainsi, l'insert de type I permet la surexpression constitutive de *MFS1* grâce aux motifs MCB et à d'autres motifs de régulation. Ces nouveaux motifs de régulation potentiels identifiés dans l'insert de type I (Figure 27B) pourraient être confirmés par différentes approches : par mutagenèse de ces différents motifs ; par mesure de l'expression des souches possédant l'insert de type I lors de stress nutritifs (pour le motif GAL4) ou thermique (pour le motif HSF1).

Concernant les inserts de type II, nos résultats n'ont pas validé l'implication du motif HNF3 dans la surexpression de *MFS1*. Ces inserts doivent contenir un ou plusieurs autres éléments de régulation, puisque l'insertion d'autres séquences au même locus (-468 pb en amont de l'ATG) dans P_{MFS1} ne conduit pas à la surexpression de *MFS1* (Insert de type IIA neutre) ni au phénotype MDR (insert de type VII). L'analyse des séquences conservées entre ces inserts a permis de montrer la présence de motifs potentiels de régulation sur lesquels se lieraient les facteurs de transcription RAP1 et ABF1. Ces facteurs de transcription, impliqués dans la régulation de l'expression des gènes nécessaires à la synthèse des ribosomes chez *S. cerevisiae*, pourraient être responsables de la surexpression de *MFS1* dans les souches possédant les inserts de type II (Figure 27C). La

mutagenèse ou la délétion de ces motifs potentiels de régulation, retrouvés dans la fusion transcriptionnelle IIA-rfp, permettraient de les valider.

La surexpression de *MFS1* est avant tout dépendante des motifs présents dans les inserts I, II et III, mais d'autres composantes *cis* peuvent également intervenir. En effet, l'analyse des éléments de régulation liés à la surexpression de *MFS1* par l'insert III a révélé la présence d'autres éléments de régulation en dehors de l'insert. Contrairement aux autres types d'insertion (par l'insert I ou IIA), l'insertion de séquences autres que celles du type III, en position -213 pb en amont de l'ATG start, diminue significativement l'expression, indiquant la perturbation de la transcription normale de *MFS1*. Il est donc fort probable que la séquence à la position -213 à -401 pb en amont de l'ATG du promoteur *MFS1* soit une position clé pour l'installation de facteurs de transcription recrutant l'ARN polymérase II. Des éléments de régulation potentiels HAP2 et RME1 ont été identifiés dans cette zone et leur implication reste à être validée.

La perte ou l'éloignement de ces éléments de régulation potentiels HAP2 et RME1, pourraient néanmoins être compensés par de nouvelles séquences présentes chez les inserts les perturbant ou les éloignant. En effet, chez l'insert de type III, des éléments de régulation potentiels RME1 et YAP1 par exemple, ont été identifiés et pourraient compenser l'éloignement des éléments présents à la position -213 à -401 (Figure 27 D).

Notre outil d'analyse d'expression, utilisant la fusion transcriptionnelle III-rfp au locus ku 70 (chromosome 3), a par ailleurs révélé la présence d'éléments potentiels d'activation de la transcription (UAS) sur le chromosome 7. Ces éléments seraient plus éloignés ou absents de la séquence P_{MFS1} comprise dans la fusion transcriptionnelle III-rfp au locus ku 70 (chromosome 3).

En conclusion, l'expression normale de *MFS1* nécessite des éléments de régulation propres au promoteur *MFS1* sans insert RME1 ou HAP2 (Figure 27A). Mais ces éléments de régulation *cis* pourraient être substitués ou associés à des éléments de régulation se trouvant sur les inserts, ce qui permettrait la surexpression de *MFS1* (Figure 27).

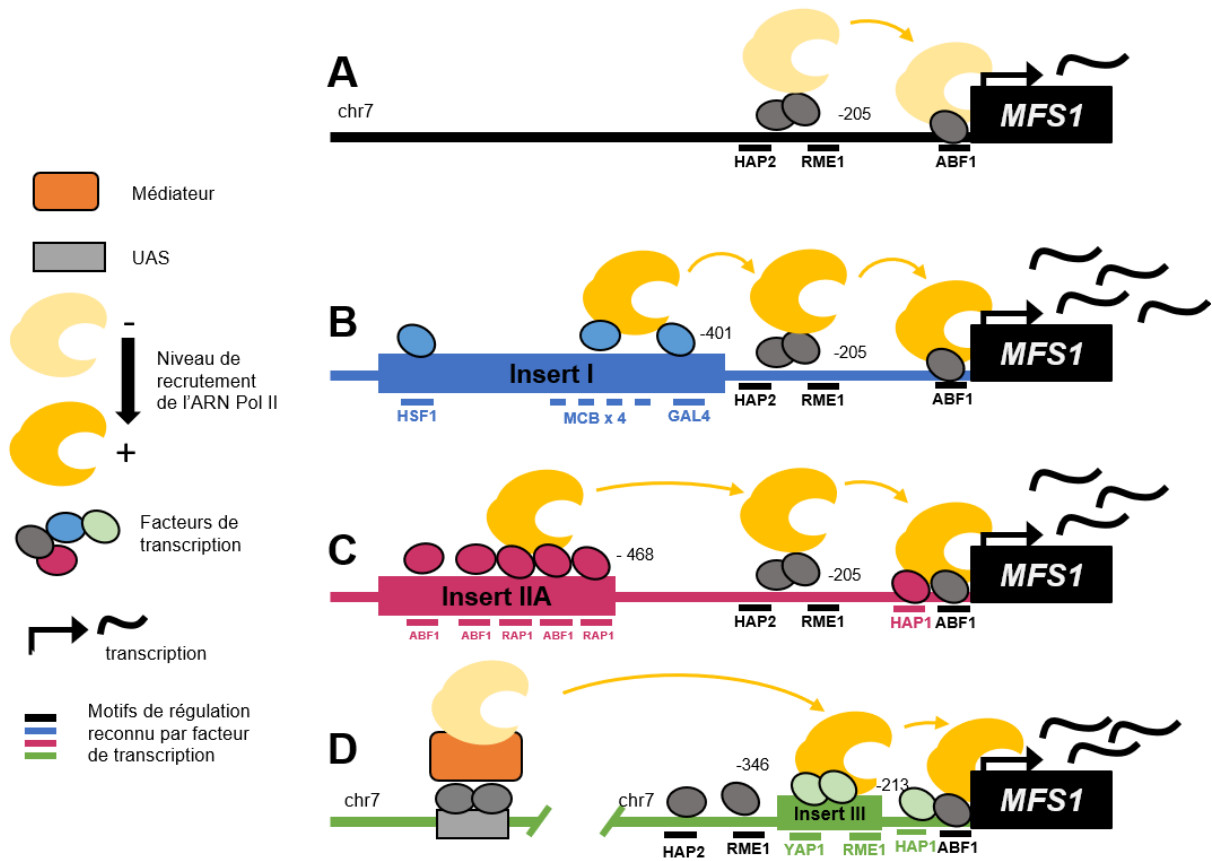


Figure 27 Éléments de régulation présents dans les différents allèles P_{MFS1} et interaction **supposée** avec les facteurs de transcription exprimés chez IPO323 : A/ Transcription basale de $MFS1$ par l'allèle P_{MFS1} -sans_insert. B/ Transcription chez l'allèle P_{MFS1} -type_I. C/ Transcription chez l'allèle P_{MFS1} -type_IIA. D/ Transcription chez l'allèle P_{MFS1} -type_III. Les motifs de régulation sont représentés sous forme de barres horizontales : en noir, les motifs de régulation initialement présents dans P_{MFS1} -sans_insert et en bleu, rouge, vert, les motifs de régulation apportés par les inserts I, IIA et III respectivement. Les facteurs de transcription (TF) sont représentés sous forme de cercles de couleurs : en gris, les TF recrutés par les motifs de régulation initialement présents dans P_{MFS1} -sans_insert ; en bleu, rouge, vert, ceux recrutés par les motifs de régulation apportés par les allèles P_{MFS1} -type_I, IIA et III respectivement.

1.2 – Après les éléments de régulation cis, vers l'identification des facteurs de transcription associés

Toutes les conclusions tirées sur les éléments de régulation agissant en *cis* sont valables dans un contexte génomique propre à IPO323. Or, la collection de souches MDR 2020-2021 constitue une source potentielle pour identifier les facteurs agissant en *trans* sur l'expression de $MFS1$.

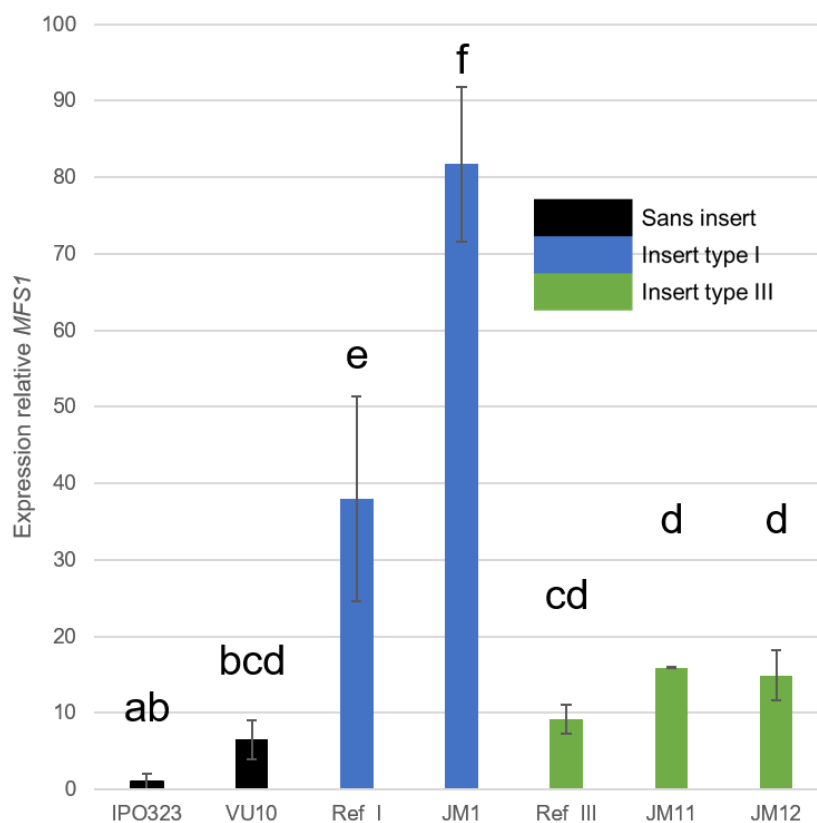


Figure 28 Expression relative de *MFS1* chez les souches du champs de *Z. tritici* par rapport aux souches isogéniques de référence possédant les différentes allèles P_{MFS1} dans la souche IPO32 (P_{MFS1} -sans_insert, P_{MFS1} -type_I, et P_{MFS1} -type_III) . Le type d'allèle est représenté en noir pour P_{MFS1} -sans insert ; bleu pour P_{MFS1} -type_I ; vert pour P_{MFS1} -type_III. répétitions biologiques (n=2). Statistiques : ANOVA sur données transformées, comparaisons par paires post-hoc de Tukey, seuil de significativité des groupes : p-value > 0,05

En effet, parmi les souches présentées dans le chapitre I, la souche JM1 possédant l'allèle P_{MFS1} - type I présente un niveau de résistance à la terbinafine significativement plus élevé que la souche de référence du même allèle P_{MFS1} type I. Ce niveau de résistance est corrélé avec une différence significative d'expression de *MFS1* (Figure 28). Une ou des mutation(s) gain de fonction dans un facteur de transcription, lié ou non aux inserts, pourrait être à l'œuvre, comme c'est le cas chez *B. cinerea* où une mutation dans le facteur de transcription Mrr1 permet la surexpression du transporteur ABC *AtrB* (Kretschmer *et al.*, 2009).

1.4 - Il existe d'autres mécanismes de MDR en dehors de de la surexpression de *MFS1*.

Dans cette thèse, nous avons défini la MDR comme la résistance aux fongicides par le mécanisme d'efflux accru par les transporteurs membranaires. Pour un même allèle de P_{MFS1} , nous avons vu que les niveaux de résistance MDR étaient variables dans les populations du champ. Nous avons également détecté des niveaux de MDR différents, sans que cela soit associé à des différences de

niveaux d'expression de *MFS1* chez des souches possédant le même allèle P_{MFS1} , soit sans insert soit de type III (Figure 28). Ainsi, la résistance à la terbinafine pourrait être issue de mécanismes additionnels de résistance. Il pourrait s'agir de mécanismes de résistance liés à des transporteurs ABC comme chez *B. cinerea* (Kretschmer *et al.*, 2009) ou des mécanismes de détoxification comme chez *Clarireedia homoeocarpha* (Sang *et al.*, 2018) qui pourraient également être à l'œuvre. La recherche de ces mécanismes additionnels constitue le projet de recherche de la thèse de Elza Neau.

2. La MDR chez *Z. tritici* serait issue de processus adaptatifs de défenses impliquant des événements de transposition.

Avec 7 nouveaux inserts retrouvés dans le promoteur *MFS1*, c'est au total 13 inserts qui ont été décrits jusque-là dans le promoteur de *MFS1*, répartis sur 7 locis d'insertion et présentant pour la plupart une signature d'événement de transposition (11 sur 13). L'allèle P_{MFS1} -indel_VIII pourrait également être issu d'un événement de transposition dans le promoteur *MFS1* qui aurait conduit au remplacement de ce dernier par un autre allèle lors d'un réarrangement chromosomique (Gray *et al.*, 2000; Daboussi & Capy, 2003). En effet, il a été montré que les INDEL et duplications de gènes étaient principalement issus d'événements de rétrotransposition chez *Z. tritici* (Badet *et al.*, 2021). Le promoteur de *MFS1* serait donc particulièrement propice à l'accueil d'éléments transposables (Figure 29).

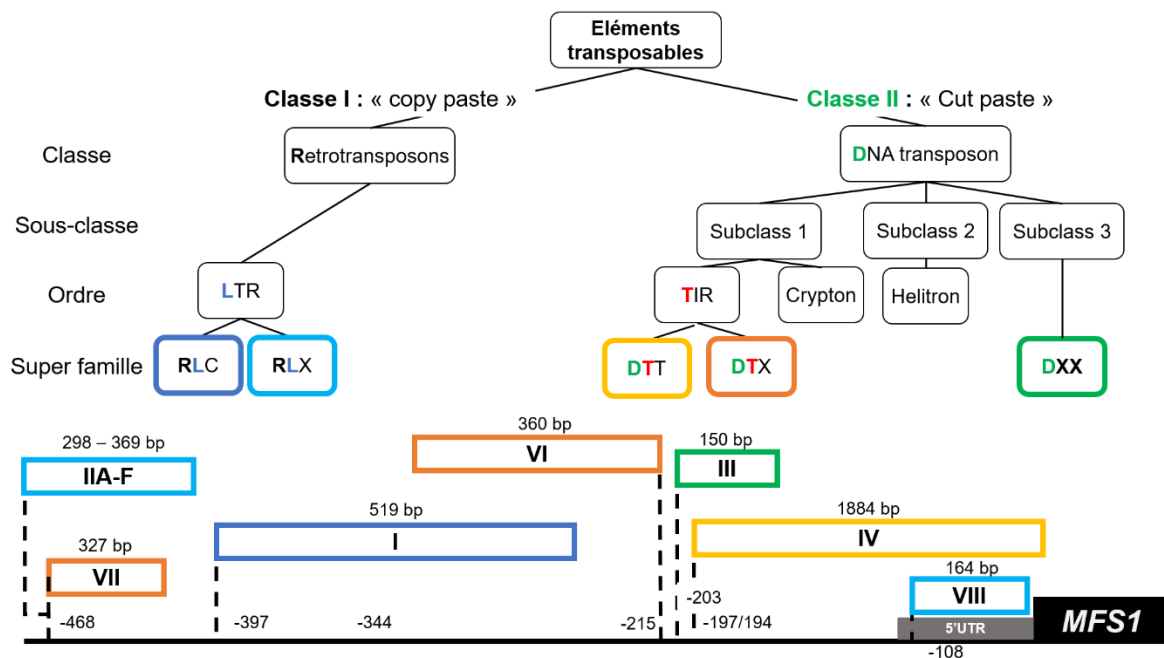


Figure 29 Figure 30 Les inserts retrouvés dans P_{MFS1} auraient pour origine des événements de transposition. Les inserts possédant des similarités avec des éléments transposables ont été encadrés avec la couleur correspondant à la super-famille à laquelle ils appartiennent. La classification des éléments transposables simplifiée est adaptée de Wickers *et al.*, 2007.

Parmi les 13 core chromosomes du génome de *Z. tritici*, le chromosome 7, sur lequel se trouve le gène *MFS1*, fait partie des core chromosomes les plus denses en TE (Oggenfuss *et al.*, 2021). La présence d'éléments transposables dans *PMFS1* serait donc inhérente à la position du gène occupée au sein du génome de *Z. tritici*.

Les éléments transposables peuvent agir de façon multiple dans l'adaptation aux fongicides chez *Z. tritici*. En effet, comme pour le gène *MFS1*, la surexpression du gène *ZtSDHC3*, un paralogue du gène *SDHC*, a également été observée dans des populations européennes contemporaines et est liée à la présence de différents éléments transposables retrouvés dans son promoteur (Steinhauer *et al.*, 2019). La présence d'éléments transposables est également liée à la surexpression de gènes codant pour la voie de biosynthèse de la mélanine, qui, en s'accumulant dans la paroi, limiterait l'influx de fongicides (Krishnan *et al.*, 2018).

2.1 - Les inserts présents dans P_{MFS1} seraient plus ou moins récents.

L'analyse de la diversité des éléments transposables permet de retracer leur origine ; chez les populations récentes de *Z. tritici*, un « burst » de TE aurait eu lieu et différencierait *Zymoseptoria tritici* des autres espèces *Zymoseptoria* (Badet *et al.*, 2020; Oggenfuss *et al.*, 2021; Oggenfuss & Id, 2023). Ces analyses reposent notamment sur la densité des TE, leur diversité, et les marques de défenses du génome contre ces derniers (Lorrain *et al.*, 2021). Ces dernières ont montré que l'invasion récente de TE était représentée particulièrement par les superfamilles LTR et TIR appartenant respectivement aux rétrotransposons (classe I) et aux transposons ADN (classe II). Dans notre population MDR analysée, au locus -468 du promoteur *MFS1*, sont retrouvées 6 variants de l'insert de type II similaire à un rétrotransposon de type RLX ainsi qu'un insert appelé type VII similaire à un transposon ADN TIR de type DTX. Les variants des inserts de type II suggèrent que ces derniers pourraient être issus d'un événement de transposition d'un rétrotransposon RLX, qui aurait muté par la suite, tandis que l'insert de type VII retrouvé au même locus serait issu d'un événement de transposition plus récent. L'analyse phylogénétique des séquences en dehors des inserts de type II pourrait nous renseigner plus précisément sur leurs liens. L'insert de type I est aussi un rétrotransposon LTR. Cet insert est très fortement conservé dans nos populations analysées, suggérant l'implication d'un événement récent de transposition, ou que cet insert échapperait aux mécanismes de défense du génome comme cela a été montré par un autre transposon appelé Stix (Badet *et al.*, 2024).

2.2 Les individus possédant les inserts dans P_{MFS1} menant à la surexpression de *MFS1* se seraient généralisés au champ à cause des stratégies antifongiques déployées durant les dernières années.

Plusieurs études ont montré l'influence des stratégies de traitement antifongiques sur la sélection de mutations résultant en des résistances liées à la cible chez *Z. tritici* (Garnault et al., 2019). Au laboratoire, la génération et la sélection d'individus possédant des résistances liées à la cible peuvent être réalisées par l'utilisation d'évolution expérimentale (Fouché *et al.*, 2022). L'évolution expérimentale repose sur l'utilisation de régimes de sélection (exposition sublétale à un ou plusieurs fongicides) sur plusieurs générations d'une population, qui permettra de sélectionner des individus présentant des avantages de fitness et d'analyser les mutations de novo impliquées (Fisher & Lang, 2016; McDonald, 2019).

Au laboratoire, l'utilisation de l'alternance de fongicides ou de mélanges de fongicides avec un mode d'action différent a permis de sélectionner des phénotypes de résistance généralistes, qui ne sont pas liés à la surexpression de *MFS1* et encore moins à la présence d'inserts (Ballu *et al.*, 2021, 2023). Parallèlement, des individus présentant une surexpression d'un transporteur ABC ont pu être sélectionnés en étant exposés à des doses graduelles d'un fongicide (Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2017) sans qu'aucune mutation ne soit détectée dans le gène et le promoteur du gène *ABCt-2*. La surexpression du gène *ABCt-2* pourrait être due à une mutation dans un facteur de transcription, comme il a été montré chez *S. cerevisiae* après une évolution expérimentale également (Anderson *et al.*, 2003). Ces études permettent de confirmer que des mécanismes additionnels de MDR en dehors de *MFS1* sont possibles et peuvent être générés *de novo* et sélectionnés par les stratégies d'utilisation des fongicides sur les populations de *Z. tritici*. L'absence de mobilisation d'éléments transposables dans ces évolutions expérimentales permet de faire l'hypothèse que les événements de transposition sont dépendants de variables comme le temps, l'échelle des populations, la reproduction sexuée, et l'interaction du pathogène *Z. tritici* avec la plante. En effet, la transcription des éléments transposables est normalement réprimée par des mécanismes épigénétiques. La transcription des éléments transposables peut être stimulée par des stress nutritifs ou au cours du cycle d'infection (Fouché *et al.*, 2020).

La présence des éléments transposables dans P_{MFS1} retrouvée au champ pourrait donc être le résultat de plusieurs conditions qu'il serait judicieux de tester :

- L'état du génome de l'espèce *Z. tritici* où les éléments transposables sont présents et actifs.
- Le mode de vie de *Z. tritici* associé à son hôte, avec le cycle infectieux qui stimule la mobilité des éléments transposables.
- Les conditions de traitement des cultures sélectionnant les individus MDR.

Ces conditions pourraient être testées au moyen d'évolution expérimentale in planta de populations de *Z. tritici* en présence de plusieurs conditions de traitements utilisant des fongicides.

V. Conclusion

Notre étude a permis de montrer que les niveaux de résistance MDR observables entre 2020 et 2021 étaient plus élevés qu'en 2017. Ajouté à cela, nous avons pu montrer que la diversification de la MDR était fortement liée à la mobilité des TE dans les populations contemporaines de *Z. tritici*. Nous avons pu démontrer l'existence de mécanismes MDR au champ, additionnels aux inserts dans P_{MFS1} . Ainsi, nous montrons que les populations de *Z. tritici* portent le potentiel pour l'émergence de phénotypes MDR plus élevés que ceux observés auparavant et que la MDR ne peut se résumer à la présence d'inserts dans le promoteur de *MFS1*. La détection moléculaire d'élément transposable en amont de P_{MFS1} ne permet donc pas d'estimer la MDR de façon précise. La prévention de la MDR reposerait donc sur plusieurs leviers. D'une part, l'estimation précise du phénomène MDR au champ par la détection systématique par phénotypage en utilisant la terbinafine. D'autre part, l'élucidation des mécanismes additionnels à la MDR, notamment les éléments de régulation trans, qui pourraient être étudiés grâce aux outils comme les fusions transcriptionnelles de cette thèse. En effet l'estimation précise de la MDR au champ par des outils de détection moléculaire nécessite de connaître toutes les mutations impliquées.

Références bibliographiques

- Alarco AM, Balan I, Talibi D, Mainville N, Raymond M (1997) Ap1-mediated multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae* requires FLR1 encoding a transporter of the major facilitator superfamily. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 19304–19313.
- Anderson JB, Sirjusingh C, Parsons AB, Boone C, Wickens C, Cowen LE, Kohn LM (2003) Mode of selection and experimental evolution of antifungal drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **163**, 1287–1298.
- Ansar M, Cheema NM, Leitch MH (2010) Effect of agronomic practices on the development of Septoria leaf blotch and its subsequent effect on growth and yield components of wheat. *Pakistan Journal of Botany* **42**, 2125–2138.
- Baccar R, Fournier C, Dornbusch T, Andrieu B, Gouache D, Robert C (2011) Modelling the effect of wheat canopy architecture as affected by sowing density on Septoria tritici epidemics using a coupled epidemic-virtual plant model. *Annals of Botany* **108**, 1179–1194.
- Badet T, Fouché S, Hartmann FE, Zala M, Croll D (2021) Machine-learning predicts genomic determinants of meiosis-driven structural variation in a eukaryotic pathogen. *Nature Communications* **12**.
- Badet T, Oggenfuss U, Abraham L, McDonald BA, Croll D (2020) A 19-isolate reference-quality global pangenome for the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *BMC Biology* **18**, 1–18.
- Badet T, Tralamazza SM, Feurtey A, Croll D (2024) Recent reactivation of a pathogenicity-associated transposable element is associated with major chromosomal rearrangements in a fungal wheat pathogen. *Nucleic Acids Research* **52**, 1226–1242.
- Ballu A, Deredec A, Walker AS, Carpentier F (2021) Are efficient-dose mixtures a solution to reduce fungicide load and delay evolution of resistance? An experimental evolutionary approach. *Microorganisms* **9**.
- Ballu A, Ugazio C, Duplaix C, Noly A, Wullschleger J, Torriani SFF, Dérédec A, Carpentier F, Walker A-S (2023) Preventing multiple resistance above all: new insights for managing fungal adaptation. *bioRxiv* 2022.12.17.520869.
- Balzi E, Wang M, Leterme S, Dyck L Van, Goffeau A (1994) PDR5, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator PDR1. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 2206–2214.
- Berman J, Krysan DJ (2020) Drug resistance and tolerance in fungi. *Nature Reviews Microbiology* **18**, 319–331.
- Brakhage AA, Andrianopoulos A, Kato M, Steidl S, Davis MA, Tsukagoshi N, Hynes MJ (1999) HAP-

- like CCAAT-binding complexes in filamentous fungi: Implications for biotechnology. *Fungal Genetics and Biology* **27**, 243–252.
- Brauner A, Fridman O, Gefen O, Balaban NQ (2016) Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology* **14**, 320–330.
- Brôco N, Tenreiro S, Viegas CA, Sá-Correia I (1999) FLR1 gene (ORF YBR008c) is required for benomyl and methotrexate resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and its benomyl-induced expression is dependent on Pdr3 transcriptional regulator. *Yeast* **15**, 1595–1608.
- Chapeland F, Fritz R, Lanen C, Gredt M, Leroux P (1999) Inheritance and mechanisms of resistance to anilinopyrimidine fungicides in *Botrytis cinerea* (*Botryotinia fuckeliana*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **64**, 85–100.
- Charlesworth B, Charlesworth D (1983) The population dynamics of transposable elements. *Genetical Research* **42**, 1–27.
- Chartrain L, Brading PA, Makepeace JC, Brown JKM (2004) Sources of resistance to septoria tritici blotch and implications for wheat breeding. *Plant Pathology* **53**, 454–460.
- Choudhury BI, Whiteway M (2018) Evolutionary Transition of GAL Regulatory Circuit from Generalist to Specialist Function in Ascomycetes. *Trends in Microbiology* **26**, 692–702.
- Coleman JJ, Mylonakis E (2009) Efflux in fungi: La pièce de résistance. *PLoS Pathogens* **5**.
- Daboussi MJ, Capy P (2003) Transposable Elements in Filamentous Fungi. *Annual Review of Microbiology* **57**, 275–299.
- Dean M, Moitra K, Allikmets R (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Human Mutation* **43**, 1162–1182.
- Dhillon B, Gill N, Hamelin RC, Goodwin SB (2014) The landscape of transposable elements in the finished genome of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *BMC Genomics* **15**, 1–17.
- Dirick L, Moll T, Auer H, Nasmyth K (1992) A central role for SW/6 in modulating cell cycle Start-specific transcription in yeast **357**.
- Drew D, North RA, Nagarathinam K, Tanabe M (2021) Structures and General Transport Mechanisms by the Major Facilitator Superfamily (MFS). *Chemical Reviews* **121**, 5289–5335.
- Du J, Johnson LM, Jacobsen SE, Patel DJ (2015) DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **16**, 519–532.
- Dyk D Van, Hansson G, Pretorius IS, Bauer FF (2003) Cellular Differentiation in Response to Nutrient Availability: The Repressor of Meiosis, Rme1p, Positively Regulates Invasive Growth in *Saccharomyces*

cerevisiae. *Genetics* **165**, 1045–1058.

Ehrenhofer-Murray AE, Keller Seitz MU, Sengstag C (1998) The Sge1 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is a membrane-associated multidrug transporter. *Yeast* **14**, 49–65.

Engler C, Youles M, Gruetzner R, Ehnert TM, Werner S, Jones JDG, Patron NJ, Marillonnet S (2014) A Golden Gate modular cloning toolbox for plants. *ACS Synthetic Biology* **3**, 839–843.

Feschotte C (2008) Transposable elements and the evolution of regulatory networks. *Nature Reviews Genetics* **9**, 397–405.

Feurtey A, Lorrain C, Croll D, Eschenbrenner C, Freitag M, Habig M, Haueisen J, Möller M, Schotanus K, Stukenbrock EH (2020) Genome compartmentalization predates species divergence in the plant pathogen genus *Zymoseptoria*. *BMC Genomics* **21**, 1–15.

Finnegan D (1989) Eukariotic Transposable Elements and Genome Evolution. *Trends in genetics* **5**, 103–107.

Fisher KJ, Lang GI (2016) Experimental evolution in fungi: An untapped resource. *Fungal Genetics and Biology* **94**, 88–94.

Fisher MC, Hawkins NJ, Sanglard D, Gurr SJ (2018) Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science* **742**, 739–742.

Fones H, Gurr S (2015) The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genetics and Biology* **79**, 3–7.

Fouché G, Michel T, Lalève A, Wang NX, Young DH, Meunier B, Debieu D, Fillinger S, Walker AS (2022) Directed evolution predicts cytochrome b G37V target site modification as probable adaptive mechanism towards the Qil fungicide fenpicoxamid in *Zymoseptoria tritici*. *Environmental Microbiology* **24**, 1117–1132.

Fouché S, Badet T, Oggenfuss U, Plissonneau C, Francisco CS, Croll D (2020) Stress-Driven Transposable Element De-repression Dynamics and Virulence Evolution in a Fungal Pathogen. *Molecular Biology and Evolution* **37**, 221–239.

Fraczek MG, Bromley M, Buied A, Moore CB, Rajendran R, Rautemaa R, Ramage G, Denning DW, Bowyer P (2013) The *cdr1B* efflux transporter is associated with non-*cyp51a*-mediated itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **68**, 1486–1496.

Francisco CS, Ma X, Zwysig MM, McDonald BA, Palma-Guerrero J (2019) Morphological changes in response to environmental stresses in the fungal plant pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Scientific Reports* **9**, 1–18.

- Garnault M, Duplaix C, Leroux P, Couleaud G, Carpentier F, David O, Walker A (2019) Spatiotemporal dynamics of fungicide resistance in the wheat pathogen *Zygomycetozoria tritici* in France. *Pest Management Science* ps.5360.
- Gasch AP, Moses AM, Chiang DY, Fraser HB, Berardini M, Eisen MB (2004) Conservation and evolution of cis-regulatory systems in ascomycete fungi. *PLoS Biology* **2**.
- Gladyshev E (2017) Repeat-induced point mutation and other genome defense mechanisms in fungi. *The Fungal Kingdom* 687–699.
- Godinho CP, Sá-Correia I (2019) *Physiological Genomics of Multistress Resistance in the Yeast Cell Model and Factory: Focus on MDR/MXR Transporters*. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*. Springer International Publishing.
- Goodwin SB, M'Barek S Ben, Dhillon B, Wittenberg AHJ, Crane CF, Hane JK, Foster AJ, Lee TAJ van der, Grimwood J, Aerts A, Antoniw J, Bailey A, Bluhm B, Bowler J, Bristow J, Burgt A van der, Cantocanché B, Churchill ACL, Conde-Ferràez L, Cools HJ, Coutinho PM, Csukai M, Dehal P, Wit P de, Donzelli B, Geest HC van de, Ham RCHJ van, Hammond-Kosack KE, Henrissat B, Kilian A, Kobayashi AK, Koopmann E, Kourmpetis Y, Kuzniar A, Lindquist E, Lombard V, Maliepaard C, Martins N, Mehrabi R, Nap JPH, Ponomarenko A, Rudd JJ, Salamov A, Schmutz J, Schouten HJ, Shapiro H, Stergiopoulos I, Torriani SFF, Tu H, Vries RP de, Waalwijk C, Ware SB, Wiebenga A, Zwiers LH, Oliver RP, Grigoriev I V., Kema GHJ (2011) Finished genome of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* reveals dispensome structure, chromosome plasticity, and stealth pathogenesis. *PLoS Genetics* **7**.
- Grandaubert J, Lowe RGT, Soyer JL, Schoch CL, Wouw AP Van De, Fudal I, Robbertse B, Lapalu N, Links MG, Ollivier B, Linglin J, Barbe V, Mangenot S, Cruaud C, Borhan H, Howlett BJ, Balesdent MH, Rouxel T (2014) Transposable element-assisted evolution and adaptation to host plant within the *Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa* species complex of fungal pathogens. *BMC Genomics* **15**, 1–27.
- Gray YHM, Genetics M, Group E, Sciences B, National A (2000) Since the first description of mobile genetic elements. *Trends in Genetics* **16**, 461–8.
- Gutiérrez-Alonso O, Hawkins NJ, Cools HJ, Shaw MW, Fraaije BA (2017) Dose-dependent selection drives lineage replacement during the experimental evolution of SDHI fungicide resistance in *Zygomycetozoria tritici*. *Evolutionary Applications* **10**, 1055–1066.
- Hagiwara D, Miura D, Shimizu K, Paul S, Ohba A, Gonoï T, Watanabe A, Kamei K, Shintani T, Moye-Rowley WS, Kawamoto S, Gomi K (2017) *A Novel Zn²⁺-Cys⁶ Transcription Factor AtrR Plays a Key Role in an Azole Resistance Mechanism of Aspergillus fumigatus by Co-regulating cyp51A and cdr1B Expressions*. *PLoS Pathogens*.

- Hane JK, Williams AH, Taranto AP, Solomon PS, Oliver RP (2015) Repeat-Induced Point Mutation: A Fungal-Specific, Endogenous Mutagenesis Process. In: *Genetic Transformation Systems in Fungi, Volume 2* (eds. Berg MA van den, Maruthachalam K). Springer International Publishing, Cham, pp. 55–68.
- Hayashi K, Schoonbeek H J, Sugiura H, Waard MA De (2001) Multidrug resistance in *Botrytis cinerea* associated with decreased accumulation of the azole fungicide oxpoconazole and increased transcription of the ABC transporter gene BcatrD. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **70**, 168–179.
- Hayashi K, Schoonbeek HJ, Waard MA De (2002) Expression of the ABC transporter BcatrD from *Botrytis cinerea* reduces sensitivity to sterol demethylation inhibitor fungicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **73**, 110–121.
- Hernando-Amado S, Blanco P, Alcalde-Rico M, Corona F, Reales-Calderón JA, Sánchez MB, Martínez JL (2016) Multidrug efflux pumps as main players in intrinsic and acquired resistance to antimicrobials. *Drug Resistance Updates* **28**, 13–27.
- John Clutterbuck A (2011) Genomic evidence of repeat-induced point mutation (RIP) in filamentous ascomycetes. *Fungal Genetics and Biology* **48**, 306–326.
- Johnson JL, Raney AK, McLachlan A (1997) Characterization of the hepatitis B virus major surface antigen promoter hepatocyte nuclear factor 3 binding site. *Journal of General Virology* **78**, 3029–3038.
- Joseph-Horne T, Hollomon DW (1997) Molecular mechanisms of azole resistance in fungi. *FEMS Microbiology Letters* **149**, 141–149.
- Kaestner KH (2000) The hepatocyte nuclear factor 3 (HNF3 or FOXA) family in metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **11**, 281–285.
- Kanazawa S, Driscoll M, Struhl K (1988) ATR1, a *Saccharomyces cerevisiae* Gene Encoding a Transmembrane Protein Required for Aminotriazole Resistance. *Molecular and Cellular Biology* **8**, 664–673.
- Kawano-Kawada M, Pongcharoen P, Kawahara R, Yasuda M, Yamasaki T, Akiyama K, Sekito T, Kakinuma Y (2016) Vba4p, a vacuolar membrane protein, is involved in the drug resistance and vacuolar morphology of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **80**, 279–287.
- Khunweeraphong N, Kuchler K (2021) Multidrug resistance in mammals and fungi—from mdr to pdr: A rocky road from atomic structures to transport mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences* **22**.
- Kolaczkowski M, Kolaczowska A, Luczynski J, Witek S, Goffeau A (1998) In vivo characterization of the drug resistance profile of the major ABC transporters and other components of the yeast pleiotropic drug resistance network. *Microbial Drug Resistance* **4**, 143–158.
- Kretschmer M, Leroch M, Mosbach A, Walker AS, Fillinger S, Mernke D, Schoonbeek HJ, Pradier JM,

- Leroux P, Waard MA De, Hahn M (2009) Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathogens* **5**.
- Krishnan P, Meile L, Plissonneau C, Ma X, Hartmann FE, Croll D, McDonald BA, Sánchez-Vallet A (2018) Transposable element insertions shape gene regulation and melanin production in a fungal pathogen of wheat. *BMC Biology* **16**, 1–18.
- Kumar A, Bennetzen JL (1999) Plant Retrotransposons. *Annual Reviews Genet* **33**, 479–532.
- Lavrukaitė K, Heick TM, Ramanauskienė J, Armonienė R, Ronis A (2023) Fungicide sensitivity levels in the Lithuanian *Zymoseptoria tritici* population in 2021. *Frontiers in Plant Science* **13**, 1–10.
- Leitch MH, Jenkins PD (1995) Influence of nitrogen on the development of septoria epidemics in winter wheat. *The Journal of Agricultural Science* **124**, 361–368.
- Leroux P, Walker AS (2011) Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science* **67**, 44–59.
- Lisch D, Bennetzen JL (2011) Transposable element origins of epigenetic gene regulation. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 156–161.
- Lorrain C, Feurtey A, Ller MM, Haueisen J, Stukenbrock E (2021) Dynamics of transposable elements in recently diverged fungal pathogens: Lineage-specific transposable element content and efficiency of genome defenses. *G3: Genes, Genomes, Genetics* **11**.
- Mäe A, Fillinger S, Sooväli P, Heick TM (2020) Fungicide Sensitivity Shifting of *Zymoseptoria tritici* in the Finnish-Baltic Region and a Novel Insertion in the MFS1 Promoter. *Frontiers in Plant Science* **11**, 0–10.
- Mahé Y, Parle-McDermott A, Nourani A, Delahodde A, Lamprecht A, Kuchler K (1996) The ATP-binding cassette multidrug transporter Snq2 of *Saccharomyces cerevisiae*: A novel target for the transcription factors Pdr1 and Pdr3. *Molecular Microbiology* **20**, 109–117.
- McDonald MJ (2019) Microbial Experimental Evolution – a proving ground for evolutionary theory and a tool for discovery. *EMBO reports* **20**, 1–14.
- Meile L, Peter J, Puccetti G, Alassimone J, McDonald BA, Sánchez-Vallet A (2020) Chromatin dynamics contribute to the spatiotemporal expression pattern of virulence genes in a fungal plant pathogen. *mBio* **11**, 1–18.
- Mernke D, Dahm S, Walker AS, Lalève A, Fillinger S, Leroch M, Hahn M (2011) Two promoter rearrangements in a drug efflux transporter gene are responsible for the appearance and spread of multidrug resistance phenotype MDR2 in *Botrytis cinerea* isolates in French and German vineyards. *Phytopathology* **101**, 1176–1183.

- Möller M, Stukenbrock EH (2017) Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens. *Nature Reviews Microbiology* 2017 15:12 **15**, 756–771.
- Morschhäuser J, Barker KS, Liu TT, Blaß-Warmuth J, Homayouni R, Rogers PD (2007) The transcription factor Mrr1p controls expression of the MDR1 efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. *PLoS Pathogens* **3**, 1603–1616.
- Niimi K, Harding DRK, Parshot R, King A, Lun DJ, Decottignies A, Niimi M, Lin S, Cannon RD, Goffeau A, Monk BC (2004) Chemosensitization of Fluconazole Resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and Pathogenic Fungi by a D-Octapeptide Derivative. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**, 1256–1271.
- Oggenfuss U, Badet T, Wicker T, Hartmann FE, Singh NK, Abraham L, Karisto P, Vonlanthen T, Mundt C, McDonald BA, Croll D (2021) A population-level invasion by transposable elements triggers genome expansion in a fungal pathogen. *eLife* **10**, 1–25.
- Oggenfuss U, Id DC (2023) Recent transposable element bursts are associated with the proximity to genes in a fungal plant pathogen 1–25.
- Omrane S, Audéon C, Ignace A, Duplaix C, Aouini L, Kema G, Walker A-S, Fillinger S (2017) Plasticity of the MFS1 Promoter Leads to Multidrug Resistance in the Wheat Pathogen *Zymoseptoria tritici*. *mSphere* **2**, 1–18.
- Omrane S, Sghyer H, Audéon C, Lanen C, Duplaix C, Walker AS, Fillinger S (2015) Fungicide efflux and the MgMFS1 transporter contribute to the multidrug resistance phenotype in *Zymoseptoria tritici* field isolates. *Environmental Microbiology* **17**, 2805–2823.
- Pao SS, Paulse IT, Saier MH (1998) Major Facilitator superfamily. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **1**, 257–279.
- Paul S, Stamnes M, Thomas GH, Liu H, Hagiwara D, Gomi K, Filler SG, Moye-Rowley WS (2019) AtrR is an essential determinant of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *mBio* **10**, 1–19.
- Pedersen EA, Hughes GR (1992) The effect of crop rotation on development of the septoria disease complex on spring wheat in Saskatchewan. *Canadian Journal of Plant Pathology* **14**, 152–158.
- Petrov DA, Aminetzach YT, Davis JC, Bensasson D, Hirsh AE (2003) Size matters: Non-LTR retrotransposable elements and ectopic recombination in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution* **20**, 880–892.
- Raffaele S, Kamoun S (2012) Genome evolution in filamentous plant pathogens: Why bigger can be better. *Nature Reviews Microbiology* **10**, 417–430.

- Roohparvar R (2008) The drug transporter MgMfs1 can modulate sensitivity of field strains of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* to the strobilurin fungicide trifloxystrobi. *Critical Reviews in Plant Sciences* **35**, 610–616.
- Roohparvar R, Huser A, Zwiers LH, Waard MA De (2007a) Control of *Mycosphaerella graminicola* on wheat seedlings by medical drugs known to modulate the activity of ATP-binding cassette transporters. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 5011–5019.
- Roohparvar R, Waard MA De, Kema GHJ, Zwiers LH (2007b) MgMfs1, a major facilitator superfamily transporter from the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*, is a strong protectant against natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genetics and Biology* **44**, 378–388.
- Rouzic A Le, Capy P (2005) The first steps of transposable elements invasion: Parasitic strategy vs. genetic drift. *Genetics* **169**, 1033–1043.
- Saag MS, Dismukes WE (1988) MINIREVIEW Azole Antifungal Agents: Emphasis. *In Vivo* **32**, 1–8.
- Sabot F, Schulman AH (2006) Parasitism and the retrotransposon life cycle in plants: A hitchhiker's guide to the genome. *Heredity* **97**, 381–388.
- Sang H, Hulvey JP, Green R, Xu H, Um J, Chang T, Jung G (2018) A Xenobiotic Detoxification Pathway through Transcriptional Regulation in Filamentous Fungi. *mBio* **9**, 1–17.
- Sanglard D (2019) Finding the needle in a haystack: Mapping antifungal drug resistance in fungal pathogen by genomic approaches. *PLoS Pathogens* **15**, 1–9.
- Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J (1995) Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**, 2378–2386.
- Schubert S, Barker KS, Znaidi S, Schneider S, Dierolf F, Dunkel N, Aïd M, Boucher G, Rogers PD, Raymond M, Morschhäuser J (2011) Regulation of efflux pump expression and drug resistance by the transcription factors Mrr1, Upc2, and Cap1 in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**, 2212–2223.
- Seidl MF, Thomma BPHJ (2017) Transposable Elements Direct The Coevolution between Plants and Microbes. *Trends in Genetics* **33**, 842–851.
- Servos J, Haase E, Brendel M (1993) Gene SNQ2 of *Saccharomyces cerevisiae*, which confers resistance to 4-nitroquinoline-N-oxide and other chemicals, encodes a 169 kDa protein homologous to ATP-dependent permeases. *MGG Molecular & General Genetics* **236**, 214–218.
- Shimazu M, Itaya T, Pongcharoen P, Sekito T, Kawano-Kawada M, Kakinuma Y (2012) Vba5p, a novel

plasma membrane protein involved in amino acid uptake and drug sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **76**, 1993–1995.

Soyer JL, Clairet C, Gay EJ, Lapalu N, Rouxel T, Stukenbrock EH, Fudal I (2021) Genome-wide mapping of histone modifications during axenic growth in two species of *Leptosphaeria maculans* showing contrasting genomic organization. *Chromosome Research* **29**, 219–236.

Soyer JL, Ghalid M El, Glaser N, Ollivier B, Linglin J, Grandaubert J, Balesdent MH, Connolly LR, Freitag M, Rouxel T, Fudal I (2014) Epigenetic Control of Effector Gene Expression in the Plant Pathogenic Fungus *Leptosphaeria maculans*. *PLoS Genetics* **10**.

Steidl S, Papagiannopoulos P, Litzka O, Andrianopoulos A, Davis MA, Brakhage AA, Hynes MJ (1999) AnCF, the CCAAT Binding Complex of *Aspergillus nidulans*, Contains Products of the hapB, hapC, and hapE Genes and Is Required for Activation by the Pathway-Specific Regulatory Gene amdR. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 99–106.

Steinberg G (2015) Cell biology of *Zymoseptoria tritici*: Pathogen cell organization and wheat infection. *Fungal Genetics and Biology* **79**, 17–23.

Steiner B, Buerstmayr M, Michel S, Schweiger W, Lemmens M, Buerstmayr H (2017) Breeding strategies and advances in line selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Tropical Plant Pathology* **42**, 165–174.

Steinhauer D, Salat M, Frey R, Mosbach A, Luksch T, Balmer D, Hansen R, Widdison S, Logan G, Dietrich RA, Kema GH, Bieri S, Sierotzki H, Torriani SF, Scalliet G (2019) A dispensable paralog of succinate dehydrogenase subunit C mediates standing resistance towards a subclass of SDHI fungicides in *Zymoseptoria tritici*. *PLoS Pathogens* **15**, 1–35.

Stergiopoulos I, Nistelrooy JGM Van, Kema GHJ, Waard MA De (2003) Multiple mechanisms account for variation in base-line sensitivity to azole fungicides in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science* **59**, 1333–1343.

Suffert F, Sache I, Lannou C (2011) Early stages of septoria tritici blotch epidemics of winter wheat: Build-up, overseasoning, and release of primary inoculum. *Plant Pathology* **60**, 166–177.

Teixeira MC, Sá-Correia I (2002) *Saccharomyces cerevisiae* resistance to chlorinated phenoxyacetic acid herbicides involves Pdr1p-mediated transcriptional activation of TPO1 and PDR5 genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **292**, 530–537.

Torriani SFF, Melichar JPE, Mills C, Pain N, Sierotzki H, Courbot M (2015) *Zymoseptoria tritici*: A major threat to wheat production, integrated approaches to control. *Fungal Genetics and Biology* **79**, 8–12.

Triandafillou CG, Katanski CD, Dinner AR, Allan Drummond D (2020) Transient intracellular

acidification regulates the core transcriptional heat shock response. *eLife* **9**, 1–30.

Valle Matta MA Do, Jonniaux JL, Balzi E, Goffeau A, Hazel B Van Den (2001) Novel target genes of the yeast regulator Pdr1p: A contribution of the TPO1 gene in resistance to quinidine and other drugs. *Gene* **272**, 111–119.

Verma R, Smiley J, Andrews B, Campbell JL (1992) Regulation of the yeast DNA replication genes through the Mlu I cell cycle box is dependent on SWI6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 9479–9483.

Vermeulen T, Schoonbeek H, Waard MA De (2001) The ABC transporter BcatrB from *Botrytis cinerea* is a determinant of the activity of the phenylpyrrole fungicide fludioxonil. *Pest Management Science* **57**, 393–402.

Wilkens S (2015) Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Reports* **7**, 1–9.

Wolfger H, Mahé Y, Parle-McDermott A, Delahodde A, Kuchler K (1997) The yeast ATP binding cassette (ABC) protein genes PDR10 and PDR15 are novel targets for the Pdr1 and Pdr3 transcriptional regulators. *FEBS Letters* **418**, 269–274.

World Health Organization (2022) *WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action*. World Health Organization.

Xiong J, Feng J, Yuan D, Zhou J, Miao W (2015) Tracing the structural evolution of eukaryotic ATP binding cassette transporter superfamily. *Scientific Reports* **5**, 1–15.

Yarragudi A, Miyake T, Li R, Morse RH (2004) Comparison of ABF1 and RAP1 in Chromatin Opening and Transactivator Potentiation in the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 9152–9164.

Zwiers LH, Stergiopoulos I, Gielkens MMC, Goodall SD, Waard MA De (2003) ABC transporters of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* function as protectants against biotic and xenobiotic toxic compounds. *Molecular Genetics and Genomics* **269**, 499–507.

VI. Annexe

Annexe Tableau S1 Partie 1 sur 7 Souches utilisées dans l'étude de la diversité génotypique et phénotypique de la MDR dans des populations récentes de *Z. tritici* d'Europe de l'ouest

Isolate	Insert type	Origin	Terbinafine growth assay rank	Terbinafine resistance score on qualitative growth assay	EC50 mean	Ecartype EC50	Resistance Factor	ANOVA - Bonferroni	Significativity	MDR Phenotype
1746	no-insert	Germany	NA	NA	0.0130	6.24E-03	0.71	6.45E+00	NO	NO
1747	no-insert	Germany	NA	NA	0.0456	3.51E-03	2.50	2.10E-01	NO	NO
1749	I	Irelande	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
1750	I	Irelande	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
1752	I	Irelande	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
1753	I	Irelande	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
1754	I	Irelande	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
1755	I	Irelande	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
1756	I	Irelande	443	HR	0.1210	1.21E-02	6.63	8.88E-06	***	YES
1759	no-insert	Irelande	100	S	0.0496	1.43E-02	2.72	4.88E-03	**	YES
1760	no-insert	Irelande	100	S	0.0297	1.13E-02	1.63	2.89E+00	NO	NO
1763	no-insert	Irelande	200	LR	0.0356	5.80E-03	1.95	4.49E-01	NO	NO
1764	no-insert	Irelande	410	HR	0.0284	7.15E-03	1.56	3.31E+00	NO	NO
1765	I	Irelande	403	HR	0.1889	8.15E-02	10.36	2.47E-11	***	YES
1766	I	Irelande	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
1767	I	Irelande	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
1768	I	Irelande	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
09ASA3apz	I	Germany	444	HR	0.2297	5.61E-02	12.60	9.60E-15	***	YES
21_ZT_401	V	Lithuania	NA	NA	0.0163	4.92E-03	0.90	4.29E-01	NO	NO
ASA	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
BG17	IIF	Belgium	NA	NA	0.0519	2.90E-02	2.85	3.45E-02	*	YES
BG2	I	Belgium	NA	NA	0.0559	3.82E-03	3.06	1.34E-02	*	YES
BG22	no-insert	Belgium	NA	NA	0.0476	2.38E-02	2.61	7.54E-02	NO	NO
BG44	no-insert	Belgium	NA	NA	0.0333	1.03E-02	1.83	3.06E-01	NO	NO
BG48	no-insert	Belgium	NA	NA	0.0513	2.02E-02	2.81	2.84E-03	**	YES
BG52	no-insert	Belgium	NA	NA	0.1087		5.96	4.12E-05	***	YES
ED1	I	France	442	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
ED3	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
ED5	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
ED6	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
EE2	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
EE3	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
EG4	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
EG5	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
EI1	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
EI4	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
EI5	I	France	442	HR	0.1562	7.32E-02	8.57	2.94E-07	***	YES
EI6	no-insert	France	442	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
EI7	no-insert	France	320	MR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
GG1	IIB	France	442	HR	0.0811	1.20E-02	4.45	2.00E-05	***	YES
GG2	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
GG3	IIB	France	442	HR	0.0864	3.01E-02	4.74	1.35E-05	***	YES
GQ1	IIB	France	442	HR	0.0349	4.86E-03	1.91	3.73E+00	NO	NO
GQ2	IIB	France	442	HR	0.0580	2.45E-02	3.18	6.78E-03	**	YES
HB1	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
HB2	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
HB3	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
HJ1	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
HJ2	I	France	444	HR	0.2022	5.32E-02	11.09	2.96E-11	***	YES
HL2	I	France	444	HR	0.0521	3.31E-02	2.86	2.18E-02	*	YES
HL4	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
HW1	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
HW2	I	France	443	HR	0.1432	1.11E-01	7.85	7.63E-07	***	YES
HW3	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
HW5	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES

Annexe Tableau S1 Partie 2 sur 7 Souches utilisées dans l'étude de la diversité génotypique et phénotypique de la MDR dans des populations récentes de *Z. tritici* d'Europe de l'ouest

Isolate	Insert type	Origin	Terbinafine growth assay rank	Terbinafine resistance score on qualitative growth assay	EC50 mean	Ecartype EC50	Resistance Factor	ANOVA - Bonferroni	Significativity	MDR Phenotype
IC1	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
IC2	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
II1	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
IPO323	no-insert	France	200	LR	NA	NA	NA	NA	NA	NO
IV1	I	France	444	HR	0.2447	3.74E-02	13.42	1.16E-12	***	YES
JM1	I	France	444	HR	0.5823	1.93E-01	31.93	9.60E-15	***	YES
JM10	III	France	443	HR	0.0906	1.64E-02	4.97	2.07E-04	***	YES
JM11	III	France	443	HR	0.1683	4.19E-02	9.23	6.57E-09	***	YES
JM12	III	France	443	HR	0.1247	1.46E-02	6.84	7.35E-08	***	YES
JM13	III	France	443	HR	0.1360	6.08E-02	7.46	2.03E-07	***	YES
JM14	IIB	France	444	HR	0.1404	3.30E-03	7.70	7.49E-07	***	YES
JM15	III	France	443	HR	0.1590	6.77E-02	8.72	2.28E-08	***	YES
JM16	III	France	443	HR	0.1054	3.48E-03	5.78	4.29E-05	***	YES
JM17	III	France	443	HR	0.1355	7.12E-02	7.43	3.06E-07	***	YES
JM18	III	France	443	HR	0.1475	6.85E-02	8.09	8.46E-08	***	YES
JM2	III	France	442	HR	0.0799	1.01E-02	4.38	6.69E-04	***	YES
JM3	III	France	441	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
JM4	III	France	441	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
JM5	III	France	441	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
JM6	no-insert	France	320	MR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
JM7	IIB	France	444	HR	0.1246	2.90E-02	6.83	1.11E-08	***	YES
JM8	III	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
JM9	III	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
KK1	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
KK2	IIB	France	444	HR	0.1089	7.57E-03	5.97	1.01E-07	***	YES
KK3	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
KK4	IIB	France	443	HR	0.0936	2.93E-02	5.13	2.96E-06	***	YES
KL1	I	France	444	HR	0.1658	3.65E-02	9.09	5.81E-10	***	YES
KL2	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
KL3	IIB	France	443	HR	0.0905	1.08E-02	4.96	3.40E-04	***	YES
KL4	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
KL5	IIB	France	443	HR	0.0587	5.90E-03	3.22	2.72E-03	**	YES
KZ2	IIA	France	444	HR	0.1301	3.17E-02	7.13	2.81E-11	***	YES
KZ4	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
LK1	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
LK2	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
LK3	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
LK4	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
LK5	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
LM2	IIB	France	444	HR	0.0599	1.27E-02	3.29	2.65E-04	***	YES
LM3	IIA	France	444	HR	0.0769	8.87E-03	4.21	1.20E-03	**	YES
LM5	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
LM6	IIB	France	444	HR	0.0588	2.82E-02	3.22	8.33E-03	**	YES
LQ1	I	France	442	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
LQ2	III	France	240	LR	0.0260	1.14E-02	1.42	2.01E+00	NO	NO
LV1	I	France	443	HR	0.1986	4.20E-02	10.89	5.76E-10	***	YES
LV4	IIA	France	440	HR	0.0590	1.71E-02	3.24	1.27E-05	***	YES
LV5	IIA	France	441	HR	0.0697	2.96E-02	3.82	4.85E-06	***	YES
MM1	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
MM2	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
MQ1	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
MQ2	I	France	444	HR	0.1791	5.06E-02	9.82	2.07E-10	***	YES
MQ3	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
MQ4	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
MS1	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES

Annexe Tableau S1 Partie 3 sur 7 Souches utilisées dans l'étude de la diversité génotypique et phénotypique de la MDR dans des populations récentes de *Z. tritici* d'Europe de l'ouest

Isolate	Insert type	Origin	Terbinafine growth assay rank	Terbinafine resistance score on qualitative growth assay	EC50 mean	Ecartype EC50	Resistance Factor	ANOVA - Bonferroni	Significativity	MDR Phenotype
MY1	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
NB2	I	France	442	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
NB4	I	France	442	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
NB5	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
NE1	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
NG1	I	France	444	HR	0.1590	6.32E-02	8.72	1.86E-09	***	YES
NG2	I	France	444	HR	0.0823	1.35E-02	4.51	2.04E-05	***	YES
NG3	I	France	444	HR	0.1378	4.08E-03	7.56	8.02E-09	***	YES
NG4	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
NG5	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
NG6	I	France	444	HR	0.0777	8.72E-03	4.26	1.50E-03	**	YES
NM1	no-insert	France	211	LR	NA	NA	NA	NA	NA	NO
NV2	I	France	444	HR	0.1698	9.50E-02	9.31	2.65E-08	***	YES
NV3	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
OY1	I	France	444	HR	0.1352	5.30E-04	7.42	4.46E-06	***	YES
OY2	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
OY3	I	France	444	HR	0.1840	9.05E-02	10.09	3.96E-10	***	YES
QJ1	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
QJ2	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
QJ3	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
QJ4	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
QJ6	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
QJ7	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
QK1	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
QK2	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
QM1	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
QM2	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
QM3	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
QM4	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
QM5	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
QM6	no-insert	France	400	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
QM7	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
QN1	IIA	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
QN2	I	France	442	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
QN3	IIA	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
QN5	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
QN6	IIA	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
QN7	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
QN8	no-insert	France	210	LR	NA	NA	NA	NA	NA	NO
Ref_I	I	Laboratory	444	NA	0.1281	4.89E-02	7.02	3.25E-14	***	YES
Ref_IIA	IIA	Laboratory	432	NA	0.0883	2.62E-02	4.84	8.35E-11	***	YES
Ref_III	III	Laboratory	NA	NA	0.0453	1.48E-02	2.48	1.01E-02	*	YES
RX1	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
RX2	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
RX3	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
RX4	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
RX5	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
SB1	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
SB3	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
SB4	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
SB5	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
SB6	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
SB7	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
Sensitive	no-insert	Pooled	NA	NA	0.0182	9.17E-03	1.00	NA	NO	NO
SK10	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES

Annexe Tableau S1 Partie 4 sur 7 Souches utilisées dans l'étude de la diversité génotypique et phénotypique de la MDR dans des populations récentes de *Z. tritici* d'Europe de l'ouest

Isolate	Insert type	Origin	Terbinafine growth assay rank	Terbinafine resistance score on qualitative growth assay	EC50 mean	Ecartype EC50	Resistance Factor	ANOVA - Bonferroni	Significativity	MDR Phenotype
SK11	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
SK12	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
SK13	IIB	France	442	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
SK14	no-insert	France	110	S	NA	NA	NA	NA	NA	NO
SK15	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
SK16	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
SK17	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
SK18	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
SK2	no-insert	France	410	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
SK3	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
SK4	no-insert	France	0	S	NA	NA	NA	NA	NA	NO
SK6	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
SK8	no-insert	France	442	HR	0.0175	8.24E-03	0.96	3.42E+01	NO	NO
SK9	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
SL1	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
SL2	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
T13	IIA	Lithuania	443	HR	0.0921	5.02E-02	5.05	2.72E-04	***	YES
T15	IIC	Lithuania	420	HR	0.0369	1.43E-02	2.02	2.79E-01	NO	NO
T16	IIA	Lithuania	442	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
T18	IIB	Lithuania	430	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
T19	IIB	Lithuania	440	HR	0.0920	9.51E-02	5.04	1.70E-04	***	YES
T3	IIC	Lithuania	300	MR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
T5	IIA	Lithuania	441	HR	0.1666	6.93E-02	9.14	2.96E-14	***	YES
T6	IIA	Lithuania	444	HR	0.0738	2.83E-02	4.05	7.12E-04	***	YES
T7	IIC	Lithuania	430	HR	0.0487	6.56E-03	2.67	4.99E-01	NO	NO
T8	IIA	Lithuania	441	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
TR2	I	France	442	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
TR3	I	France	442	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
TX2	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
TX3	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
TX4	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
TX5	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
TX6	IIB	France	432	HR	0.2534	7.68E-02	13.89	2.96E-14	***	YES
TX7	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
TX8	IIB	France	432	HR	0.0515	3.39E-02	2.82	5.24E-02	NO	NO
TY1	IIA	France	444	HR	0.2053	#DIV/0!	11.26	NA	NA	YES
TY11	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
TY12	no-insert	France	100	S	NA	NA	NA	NA	NA	NO
TY13	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
TY14	IID	France	210	LR	0.0677	3.94E-02	3.71	1.81E-03	**	YES
TY15	IIC	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
TY16	no-insert	France	100	S	0.0238	5.78E-03	1.30	4.20E+00	NO	NO
TY17	III	France	444	HR	0.0755	2.73E-02	4.14	3.15E-04	***	YES
TY18	IIB	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
TY19	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
TY2	IIA	France	444	HR	0.1181	2.15E-04	6.47	4.80E-05	***	YES
TY21	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
TY22	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
TY3	VI	France	100	S	0.0464	2.50E-02	NA	NA	NA	NO
TY4	IIA	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
TY5	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
TY6	IIA	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
TY9	IIC	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
TZ1	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
TZ10	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES

Annexe Tableau S1 Partie 5 sur 7 Souches utilisées dans l'étude de la diversité génotypique et phénotypique de la MDR dans des populations récentes de *Z. tritici* d'Europe de l'ouest

Isolate	Insert type	Origin	Terbinafine growth assay rank	Terbinafine resistance score on qualitative growth assay	EC50 mean	Ecartype EC50	Resistance Factor	ANOVA - Bonferroni	Significativity	MDR Phenotype
TZ4	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
TZ9	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
UW1	VIII	France	431	HR	0.1754	7.41E-02	9.62	6.52E-07	***	YES
UW11	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
UW2	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
UW2s	IIC	Germany	NA	NA	0.0582	2.43E-02	3.19	NA	NA	NO
UW3	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
UW3s	IIA	Germany	420	HR	0.1656	6.91E-02	9.08	NA	NA	YES
UW6	IIB	France	443	HR	0.0714	3.03E-02	3.92	2.5752E-05	***	YES
UX1	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
UX10	no-insert	Germany	443	HR	0.0261	2.19E-02	1.43	39.36136	NO	NO
UX11	no-insert	Germany	444	HR	0.0388	1.97E-02	2.12	0.32024	NO	NO
UX2	IIE	Germany	444	HR	0.0394	2.55E-02	2.16	2.28E-02	*	YES
UX2s	no-insert	France	421	HR	0.0744	3.69E-03	4.08	NA	NA	YES
UX3	I	France	432	HR	0.0967	1.82E-03	5.30	0.0006576	***	YES
UX4	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
UX5	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
UX5s	IIA	Germany	444	HR	0.0188	9.72E-03	1.03	NA	NA	YES
UX6	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
UX7	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
UX7s	IIA	Germany	410	HR	0.1294	3.59E-02	7.09	NA	NA	YES
UX8	IIA	Germany	441	HR	0.0656	5.04E-02	3.60	5.106E-09	***	YES
UX9	IIA	Germany	443	HR	0.2011	8.42E-02	11.03	2.96E-14	***	YES
UY1	IIB	France	443	HR	0.0890	1.32E-02	4.88	5.93E-06	***	YES
UY10	no-insert	France	300	MR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
UY2	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
UY3	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
UY4	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
UY5	no-insert	France	310	MR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
UY6	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
UY7	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
UY8	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
UY9	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
UZ2	IIA	Germany	420	HR	0.0685	7.81E-04	3.76	1.6724E-12	***	YES
UZ4	I	Germany	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
UZ5	IIA	Germany	NA	NA	0.1237	5.16E-02	6.78	2.1164E-09	***	YES
VB2	I	Germany	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VB4	IIA	Germany	NA	NA	0.0435	2.39E-02	2.39	0.0035816	**	YES
VC2	IIC	Germany	NA	NA	0.0780	4.56E-02	4.28	0.0001776	***	YES
VCD1	IIB	England	430	HR	0.1163	5.46E-02	6.38	3.02E-06	***	YES
VCD10	IIB	England	430	HR	0.1910	1.52E-02	10.47	1.4326E-07	***	YES
VCD11	IIB	England	430	HR	0.1819	1.13E-01	9.97	2.50E-09	***	YES
VCD12	I	England	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VCD13	IIB	England	430	HR	0.2413	1.37E-01	13.23	4.4844E-12	***	YES
VCD14	IIB	England	430	HR	0.2001	8.72E-02	10.97	7.9328E-11	***	YES
VCD15	IIB	England	430	HR	0.1280	3.87E-02	7.02	2.59E-07	***	YES
VCD16	IIB	England	431	HR	0.1377	2.74E-02	7.55	4.8248E-08	***	YES
VCD17	IIB	England	430	HR	0.1243	2.70E-02	6.82	3.0044E-05	***	YES
VCD18	IIB	England	430	HR	0.1646	3.66E-02	9.02	1.66E-09	***	YES
VCD19	I	England	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VCD2	I	England	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VCD20	IIB	England	440	HR	0.1080	2.70E-02	5.92	4.662E-06	***	YES
VCD21	IIB	England	430	HR	0.0864	1.08E-02	4.74	0.00013438	***	YES
VCD22	IIB	England	431	HR	0.1040	3.37E-02	5.70	1.187E-05	***	YES
VCD23	I	England	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES

Annexe Tableau S1 Partie 6 sur 7 Souches utilisées dans l'étude de la diversité génotypique et phénotypique de la MDR dans des populations récentes de *Z. tritici* d'Europe de l'ouest

Isolate	Insert type	Origin	Terbinafine growth assay rank	Terbinafine resistance score on qualitative growth assay	EC50 mean	Ecartype EC50	Resistance Factor	ANOVA - Bonferroni	Significativity	MDR Phenotype
VCD24	IIB	England	430	HR	0.1066	4.53E-02	5.84	1.32E-05	***	YES
VCD25	I	England	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VCD26	IIB	England	430	HR	0.0983	2.59E-02	5.39	2.37E-05	***	YES
VCD3	IIB	England	430	HR	0.0976	2.68E-02	5.35	2.58E-05	***	YES
VCD4	IIB	England	430	HR	0.1577	5.25E-02	8.65	6.29E-09	***	YES
VCD5	IIA	England	442	HR	0.1110	1.48E-02	6.09	1.51E-05	***	YES
VCD6	IIB	England	431	HR	0.1158	4.43E-02	6.35	2.62E-06	***	YES
VCD7	IIB	England	431	HR	0.1020	3.02E-02	5.59	1.41E-05	***	YES
VCD8	I	England	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VCD9	IIB	England	430	HR	0.2004	2.21E-02	10.99	6.94E-08	***	YES
VD3	I	Germany	442	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VD4	III	Germany	210	LR	0.0589	3.54E-02	3.23	2.55E-03	**	YES
VE4	I	Germany	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VF2	no-insert	Germany	210	LR	NA	NA	NA	NA	NA	NO
VG2	IIB	Germany	321	MR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VG3	no-insert	Germany	442	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VG4	IIE	Germany	210	LR	0.1295	5.42E-02	7.10	2.96E-14	***	YES
VG5	I	Germany	442	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VH1	no-insert	Germany	100	S	NA	NA	NA	NA	NA	NO
VK1	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VK2	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VK3	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VK4	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VK5	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VK6	IIB	France	432	HR	0.1198	1.71E-03	6.57	1.15E-04	***	YES
VK7	IIB	France	432	HR	0.0918	1.49E-02	5.03	1.32E-05	***	YES
VK8	IIB	France	432	HR	0.1170	4.70E-02	6.42	2.53E-06	***	YES
VM1	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VM2	I	France	433	HR	0.1271	1.33E-02	6.97	2.16E-07	***	YES
VM3	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VM4	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VM5	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VM6	no-insert	France	410	HR	0.0752	3.12E-02	4.13	1.86E-02	*	YES
VM7	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VN1	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VN10	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VN11	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VN12	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VN2	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VN3	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VN4	no-insert	France	300	MR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VN5	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VN6	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VN7	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VN8	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VN9	IIA	France	431	HR	0.0548	7.65E-03	3.01	5.53E-01	NO	NO
VO1	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VO10	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VO11	no-insert	France	200	LR	NA	NA	NA	NA	NA	NO
VO12	NA	France	430	HR	0.1057	7.69E-03	5.80	7.00E-05	***	YES
VO13	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VO14	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VO15	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VO16	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VO2	IIA	France	442	HR	0.0837	1.10E-03	4.59	6.04E-04	***	YES

Annexe Tableau S1 Partie 7 sur 7 Souches utilisées dans l'étude de la diversité génotypique et phénotypique de la MDR dans des populations récentes de *Z. tritici* d'Europe de l'ouest

Isolate	Insert type	Origin	Terbinafine growth assay rank	Terbinafine resistance score on qualitative growth assay	EC50 mean	Ecartype EC50	Resistance Factor	ANOVA - Bonferroni	Significativity	MDR Phenotype
VO3	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VO4	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VO5	IIB	France	442	HR	0.0546	9.23E-03	3.00	8.02E-03	**	YES
VO6	no-insert	France	431	HR	0.0704	1.53E-02	3.86	2.49E-02	*	YES
VO7	no-insert	France	310	MR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VO8	IIF	France	410	HR	0.0964	4.31E-02	5.29	5.67E-05	***	YES
VO9	IIA	France	442	HR	0.0868	6.37E-03	4.76	7.07E-06	***	YES
VU1	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VU10	no-insert	France	430	HR	0.1068	4.03E-02	5.86	1.16E-04	***	YES
VU11	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VU12	IIA	France	442	HR	0.0848	8.98E-03	4.65	7.59E-04	***	YES
VU13	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VU14	VII	France	311	MR	0.0428	3.65E-03	2.35	3.06E-01	NO	NO
VU15	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VU16	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VU17	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VU18	no-insert	France	300	MR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VU19	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VU2	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VU21	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VU22	I	France	443	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VU23	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VU3	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VU4	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VU5	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VU6	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VU7	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VU8	no-insert	France	310	MR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VU9	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VX1	no-insert	France	400	HR	0.0745	1.51E-02	4.09	1.34E-02	*	YES
VX2	I	France	310	MR	0.0939	4.28E-02	5.15	3.96E-05	***	YES
VX3	no-insert	France	400	HR	0.0735	9.22E-03	4.03	1.41E-02	*	YES
VX4	no-insert	France	300	MR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VX5	no-insert	France	320	MR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VX6	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VX7	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VY1	no-insert	France	300	MR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VY2	I	France	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VY3	I	France	441	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
VY4	no-insert	France	442	HR	0.0928	4.66E-02	5.09	1.00E-04	***	YES
WA1	III	Irlande	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
WA2	I	Irlande	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
WA3	no-insert	Irlande	440	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
WB1	III	Irlande	441	HR	0.0548	2.14E-02	3.01	1.32E-03	**	YES
WK1	III	Irlande	441	HR	0.1916	5.06E-02	10.51	8.37E-09	***	YES
WK2	III	Irlande	441	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
WK3	III	Irlande	441	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
WL1	I	Irlande	444	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
WP1	IIA	Estonia	442	HR	NA	NA	NA	NA	NA	YES
WQ3	IIA	Estonia	443	HR	0.0729	1.51E-02	4.00	1.91E-02	*	YES
WR1	IIB	Denmark	441	HR	0.0711	1.27E-02	3.90	1.06E-02	*	YES