



Crop Science



Ecole doctorale « Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement »

## THESE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du grade de :

**Docteur de l'Université de Lille**

Discipline : Ingénierie des Fonctions Biologiques

### **Résistances aux inhibiteurs de la déméthylation et *fitness* des souches *multi-drug resistant* dans une population de *Zymoseptoria tritici* du nord de la France**

Par

**Myriam Bomble**

Soutenue publiquement le 20 février 2020 devant le jury composé de :

**M. Jean-Louis HILBERT**, Institut Charles Viollette – Université de Lille (Lille), Président du jury

**Mme Marie-France CORIO-COSTET**, Directeur de recherche, INRA (Bordeaux), Rapporteur

**Mme Anne LEGRÈVE**, Université Catholique de Louvain (Louvain, Belgique), Rapporteur

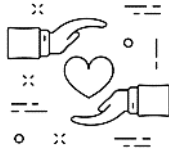
**M. Maxime DUVIVIER**, Centre Wallon de Recherches Agronomiques (Gembloux, Belgique), Examineur

**M. Ali SIAH**, Institut Charles Viollette – Yncréa Hauts-de-France (Lille), Directeur de thèse

**Mme Clarisse PAYET**, Bayer CropScience (Lyon), Membre invitée

**M. Patrice HALAMA**, Institut Charles Viollette – Yncréa Hauts-de-France (Lille), Membre invité





## ~ Remerciements ~

Je souhaite remercier mon encadrant et directeur de thèse, M. Ali Siah, de m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse CIFRE et accueilli au sein de l'équipe ASQV du site Yncrea Hauts-de-France, équipe d'accueil de l'institut Charles Viollette. Merci d'avoir corrigé le manuscrit ainsi que les articles.

J'adresse mes remerciements à M. Patrice Halama, qui a dirigé mes travaux de thèse durant les deux premières années. Je vous remercie de m'avoir choisi pour ce projet et m'avoir accordé toute votre confiance.

Je tiens également à remercier M. Philippe Reignault, ayant été présent au démarrage de ma thèse en tant que co-directeur. Nos échanges, bien qu'ils aient été peu nombreux étaient très pertinents et m'ont aidé à avancer.

Mes remerciements s'adressent aux membres constituant mon comité de thèse : Mme Marie France Corio-Costet, M. Jean-Louis Hilbert, Mme Christelle Leyronas, Mme Constance Tuffet et Mme Clarisse Payet. Merci d'avoir contribué à l'amélioration de ce travail grâce à vos conseils utiles et constructifs.

Je remercie Mme Marie-France Corio-Costet et Mme Anne Legrève de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapportrices de cette thèse. Merci d'avoir accordé du temps pour étudier ce manuscrit.

Mes remerciements vont également à M. Jean-Louis Hilbert et M. Maxime Duvivier pour leur participation au jury de la soutenance en tant qu'examineurs. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à contenu de ce manuscrit.

J'adresse mes remerciements à Mme Constance Tuffet et Mme Clarisse Payet pour leurs confiances vis-à-vis de ce projet de thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement M. Jean-Louis Hilbert ainsi que mes deux anciens tuteurs de stage de M2, M. Thierry Cadalen et M. Christophe Vuylsteker pour m'avoir permis d'effectuer un stage si riche et intéressant sur la chicorée et ses mystères. Vos enseignements et conseils passés m'ont donné des bases solides pour la thèse et je continuerai sans aucun doute à les appliquer dans mes travaux futurs. Un grand merci pour ce stage unique !!!

Je tiens à remercier spécialement Caroline Choma pour nos conversations scientifiques qui ont su me remonter le moral. Un merci aussi spécial à Caroline Deweer qui s'est montré très disponible face à mes questions techniques, pour mes premières inoculations en serre ainsi que pour les enseignements de TP sur la culture *in vitro* de l'endive. Je tiens à remercier Jérôme Muchembled et Ourida Hammouma pour leurs bonnes humeurs quotidiennes.

Je remercie également Jérôme Follet, Bertrand Vandoorme, Sitraka Andrianarisoa et tout le personnel de l'ISA pour leur bienveillance quotidienne.

Cette thèse m'a permis de découvrir et me lier d'amitié avec deux jeunes gens tout à fait extraordinaires ! Fraîchement débarquée au labo, ma rencontre avec Samara Mejri a été fabuleuse. Je n'ai jamais rencontré quelqu'un d'aussi débordante d'énergie que toi ! Sans toi, ma thèse aurait été bien morne !!!!! Merci de m'avoir appris autant de trucs et d'astuces !!!!!!! La deuxième personne n'est d'autre que mon premier vrai stagiaire dont j'ai eu la charge : Maxime Holvoet. Avec une petite peur d'avoir un boulet malgré ton stage chez Thierry, tu as su vite montrer de l'ardeur dans le travail proposé et j'ai enfin pu découvrir un véritable travail d'équipe avec toi. Merci pour les corrections et l'assistance 24h/24h apportée pour mes questions techniques. Merci à tout les deux d'avoir été présents à chaque instant, je vous souhaite le meilleure pour votre futur !!!!!

Je tiens à remercier mes chers amis et collègues du labo formant le « noyau central » : Rémi, Justine, Hélène, Marie-Astrid ! Merci d'avoir accepté de manger tôt ou tard ainsi que les pauses café programmée ou sauvages. Nos conversations vont me manquer mais ont rendu cette thèse plus chaleureuse. Je remercie aussi Claire J., Claire O., Marlon, Océane, Claire L.... et tout les gens qui ont été de passage avec qui je n'ai pu m'empêcher de papoter !

Je remercie les stagiaires Claire Ugazio et Julien Perrault que j'ai eu l'occasion de former et qui m'ont fait confiance. Ils m'ont apporté une aide non négligeable devant les travaux chronophages de cette thèse.

I would like to thank the 2 Brazilians who came from far away to help the overworked PhD student : Mathias Rockenbach for ghost stories during RNA extraction, and Mateus Brusco de Freitas for PCR revelations.

Je remercie le soutien « doctorant » : Laetitia Boquet, Alice Fourquez, Marie Hechelski, Xuan Nguyen, Alexandre Bricout, Audrey Damiens et tout ce que je n'ai pas cité 😊

Je remercie mes Zymo, mes petits potes champignons, d'être simple à cultiver et de m'avoir laissé vous étudier. Votre culture va beaucoup me manquer. J'aimais prendre soin de vous en compagnie de lectures comme Mme Bovary et les romans d'Edith Wharton. On a vécu de rebondissements dont on ne se remettra jamais !!! ;\_ ;

Je remercie pour son soutien au quotidien : mon Damien, l'homme qui partage ma vie. Tes bons petits plats, les apéros fromagers et les bières après une dure journée m'ont rendu plus forte, aussi bien moralement que physiquement ! Tu m'as beaucoup aidé grâce à ton support informatique personnalisé 24h/24h et Marvin (que j'ai bien maltraité) ! Maintenant, tu vas devoir me supporter encore plus, pour le meilleur et pour le pire !

Je remercie ma mère, mon père, mon frère et puis ma sœur, oh oh ! (et sa famille) ! Pour le soutien apporté, les frites et nos entrevues qui me faisaient oublier le stress de la semaine. J'espère que vous êtes fiers de votre fille/petite soeur ! :)

## TABLE DES MATIERES

---

~ Remerciements ~ .....	i
Table des figures .....	vi
Tables des tableaux.....	x
Liste des abréviations .....	xi
Introduction générale.....	1
<b>1 Le blé, la plante modèle .....</b>	<b>2</b>
1.1 Description et histoire .....	2
1.2 Cycle de développement du blé .....	5
1.3 Les bassins de production du blé tendre.....	6
1.4 Les variétés de blé .....	7
<b>2 <i>Zymoseptoria tritici</i>, l'agent de la septoriose .....</b>	<b>9</b>
2.1 Généralités et histoire de la maladie .....	9
2.2 Impact économique de la maladie.....	10
2.3 Reconnaître une infection causée par <i>Z. tritici</i> .....	11
2.4 Cycle épidémique .....	13
2.5 Génétique du champignon .....	15
2.6 Génétique des populations .....	16
<b>3 Interactions blé-<i>Zymoseptoria tritici</i> .....</b>	<b>18</b>
3.1 Réactions de défense du blé contre <i>Z. tritici</i> .....	18
3.1.1 La réponse induite.....	19
3.1.2 La réponse tardive.....	21
3.1.3 La résistance génétique du blé contre <i>Z. tritici</i> .....	23
3.2 Pouvoir pathogène et effecteurs de <i>Z. tritici</i> .....	25
3.2.1 La phase biotrophe.....	26
3.2.2 La phase nécrotrophe.....	29
3.2.3 Implications d'effecteurs non identifiés .....	30
<b>4 Lutter contre la septoriose .....</b>	<b>32</b>
4.1 Lutte prophylactique contre la septoriose .....	32
4.1.1 Les leviers agronomiques liés au travail du sol .....	32
4.1.2 Les leviers agronomiques liés aux cultures .....	33
4.2 La lutte chimique.....	35
4.2.1 Les multi-sites : toujours efficaces.....	36
4.2.2 Les uni-sites : une histoire de résistance .....	37
4.3 Produits de lutte alternative : le biocontrôle .....	62

4.4	Les outils d'aide à la décision (OAD) .....	64
<b>5</b>	<b>La fitness de <i>Z. tritici</i></b> .....	<b>65</b>
5.1	Définition et concept .....	65
5.2	<i>Z. tritici</i> face aux stress .....	66
5.3	Adaptation aux fongicides .....	67
5.4	Adaptation à la température .....	70
5.5	Fitness lié aux caractères quantitatifs de l'interaction hôte-pathogène.....	72
5.5.1	Etats des lieux des caractères .....	72
5.5.2	Sélection des caractères quantitatifs liée à l'infection.....	74
	<b>Contexte et objectifs de la thèse</b> .....	<b>77</b>
	Contexte de la thèse .....	78
	Objectifs .....	80
	<b>Résultats</b> .....	<b>81</b>
	Article 1 : Deciphering mechanisms underlying <i>Zymoseptoria tritici</i> resistance towards demethylation inhibitors in northern France .....	82
	Article 2 : Temperature variability did not affect the multidrug resistance mechanism towards demethylation-inhibitors in <i>Zymoseptoria tritici</i> .....	128
	Article 3 : Fitness of <i>Zymoseptoria tritici</i> isolates with different resistance mechanisms towards demethylation inhibitors .....	151
	<b>Abstract</b> .....	<b>153</b>
	<b>Conclusions et perspectives</b> .....	<b>184</b>
	La résistance aux IDM dans la Nord de la France .....	185
	L'expression de la résistance aux IDM en fonction de la température .....	188
	La fitness <i>in planta</i> des souches résistantes aux IDM .....	189
	<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>192</b>
	<b>Annexes</b> .....	<b>221</b>
	Annexe 1 : Matériels et méthodes.....	222
	Matériel biologique .....	222
	Caractérisation des mating-types et du polymorphisme génétique .....	224
	Evaluation génotypique et phénotypique de la résistance aux IDM.....	226
	Fitness des souches de <i>Z. tritici in planta</i> .....	230
	Effet de la température sur la résistance aux IDM.....	232
	Traitement des données et analyses statistiques .....	232
	Effet de la température sur la résistance aux IDM .....	234
	Annexe 2 : Short communication .....	235
	Annexe 3 : Article 4 .....	239

<b>Annexe 4 : Valorisation des travaux de thèse .....</b>	<b>250</b>
<b>Résumé de la thèse.....</b>	<b>252</b>

## Table des figures

- Figure 1.** Domestication des plantes au niveau du croissant fertile. Les précurseurs du blé moderne sont indiqués sous le nom de « einkorn » correspondant au blé diploïde connu sous le nom de *Triticum monococcum* spp. *monococcum* (génome AA,  $2n = 14$ ) et « emmer » correspondant au blé dur tétraploïde connu sous le nom de *Triticum turgidum* L. *subsp. Dicocum* (génome AABB,  $2n=28$ ). Trois périodes avant notre ère sont représentées (before present ; BP). Carte issue de Weiss et al. (2012)..... 2
- Figure 2.** Evolution historique des espèces de blé avant et après leur domestication. Les espèces actuelles de blé sont issues du genre *T. turgidum* ssp. *durum* (blé dur) et *T. aestivum* (blé tendre) (Chantret et al., 2005)..... 3
- Figure 3.** Expansion des cultures du blé dans l'Europe Néolithique. Seuls les premiers sites d'implantation des différentes cultures sont représentés (Weiss et al., 2012)..... 4
- Figure 4.** Cycle de développement du blé complété par l'échelle de Zadoks. Le stade 0 correspond à la germination de la graine, le 1 au développement des feuilles (10-19), le 2 à la formation de thalles (20-29), le 3 à l'allongement de la tige (30-39), le 4 à la montaison (40-49), le 5 à l'émergence de l'inflorescence (50-59), le 6 à la floraison (60-69), le 7 au développement des graines (70-79), le 8 à la maturation des graines (80-89) et le 9 à la sénescence (Zadocks et al., 1974)..... 5
- Figure 5.** Carte des rendements moyens du blé tendre par hectare observés dans le monde (Monfreda et al., 2008)..... 6
- Figure 6.** Répartition selon les départements français des surfaces de blé tendre en milliers d'hectares en 2013 (Agreste, 2013). ..... 7
- Figure 7.** Morphologie des pycnidiospores de *Parastagonospora nodorum*(a) et de *Zymoseptoria tritici* (b) (source : Arvalis-Institut du végétal)..... 9
- Figure 8.** Proposition de division de l'Europe selon Bouma (2005). Les zones agro-climatiques sont réparties en 4 avec la zone maritime, méditerranéenne, centrale et du nord-Est. La zone maritime est favorable au développement de *Z.tritici*..... 10
- Figure 9.** Carte de France représentant les pertes moyennes en quintaux par hectare (q/ha) engendrées par la septoriose selon les régions pendant les années 2000 à 2012 (Arvalis-Institut du végétal). Entre régions, on observe une forte variabilité notamment dans l'est de la France (Alsace : 10q/ha) et l'ouest, régions au climat plus humide, favorable au développement de la septoriose (Bretagne : 24.1q/ha)..... 11
- Figure 10.** Symptômes de la septoriose du blé causé par l'ascomycète *Zymoseptoria tritici*. Après une phase de latence d'une durée d'environ 14 jours, le champignon entre en phase nécrotrophe. Les tâches chlorotiques puis nécrotiques se forment sur les feuilles contaminées. La forme de reproduction asexuée de *Z. tritici* apparaît sous forme de ponctuations noires appelées pycnides (Arvalis-Institut du végétal)..... 12
- Figure 11.** (a) Lésions présentant des pycnides matures de *Zymoseptoria tritici*, exsudant le cirrhe, une matrice extracellulaire contenant les pycnidiospores (Arvalis-Institut du végétal). (b) Vue en



coupe d'une pycnide mature située dans la cavité substomatale contenant des pycnidiospores (Kema *et al.*, 1996). ..... 12

**Figure 12.** Cycle de vie de *Zymoseptoria tritici* adapté de Palmer et Skinner (2002). L'inoculum primaire, majoritairement composé d'ascospores présent dans les débris, contamine les jeunes plants de blé. Après développement et croissance, le champignon produit des ascospores issues de la reproduction sexuée qui sont alors disséminées par le vent. Les pycnidiospores, issues de la reproduction asexuée, sont quant à elles dispersées vers les étages foliaires supérieurs via le « splashing ». Elles sont responsables de la propagation de la maladie à courte distance alors que les ascospores peuvent contaminer des cultures très éloignées par le biais du vent. .... 14

**Figure 13.** Pénétration des tubes germinatifs de *Z. tritici* via l'ostiole d'un stomate après 24 heures post inoculation vue par cryo-microscopie électronique à balayage (Duncan et Howard, 2000) ..... 26

**Figure 14.** Colonisation d'une feuille de blé via les stomates durant la phase biotrophe de *Zymoseptoria tritici*. Après germination des ascospores et/ou des pycnidiospores, les hyphes pénètrent dans le mésophylle via les stomates. A partir de 5 à 9 jours post inoculation (jpi), la formation des pré-pycnides se fait dans la cavité stomatique colonisée. Les dates résultent de la moyenne de plusieurs études (adapté de Steinberg *et al.*, 2015) ..... 28

**Figure 15.** Phase nécrotrophe correspondant à la maturation des pycnides. Elle se situe entre 10-21 jours après inoculation (jpi). Les pycnidiospores produites se propagent grâce aux éclaboussures de pluie et infectent les étages foliaires supérieurs ainsi que les plantes voisines (adaptée de Steinberg, 2015). ..... 29

**Figure 16.** Classement des variétés en fonction de la tolérance à la septoriose, notée de 1 (variété sensible) à 9 (variété tolérante) de la saison 2017-2018. Les notes sont assignées en fonction des symptômes observés sur les feuilles de blé dans des parcelles non traitées par des fongicides (source : Arvalis-Institut du végétal). ..... 34

**Figure 17.** Formule chimique des fongicides à mode d'action multi-sites : le chlorothalonil (a), le folpet (b) et le mancozèbe (c et d). Source : Pubchem. .... 37

**Figure 18.** Distribution des deux types de résistance : bimodale (a) et unimodale (b) chez *Zymoseptoria tritici*. Chaque modèle est illustré par la distribution de la sensibilité de souches de *Z. tritici* isolées à Rothamsted de 2003 à 2007 pour (c) l'azoxystrobine (Qol) et (d) l'époxiconazole (IDM) (Lucas *et al.*, 2015). .... 38

**Figure 19.** Action des antimétabolites sur la division cellulaire. La présence d'une molécule antimétabolite conduit à l'arrêt du processus de mitose dans les cellules en cours de division. Les cellules peuvent mourir ou se diviser inégalement pour produire des cellules filles aneuploïdes. Dans certains cas, les cellules peuvent sortir de division ; elles peuvent poursuivre leur cycle cellulaire, rester bloquées à l'interphase ou mourir (Gascoigne et Taylor, 2009). .... 39

**Figure 20.** Formule chimique des fongicides à mode d'action antimétabolite. Le carbenzamine (famille des benzimidazoles ; a), le thiophanate (famille des thiophanates ; b), le diéthofencarbe (famille des N-phényl carbamates ; c) et zoxamide (famille des benzamides ; d). Source : Pubchem. .... 40

<b>Figure 21.</b> Formule chimique des inhibiteurs externes de la quinone (« <i>quinone outside inhibitor</i> » Qol) : l'azoxystrobine (a), le pyraclostrobine (b), le dimoxystrobine (c), le trifloxystrobine (d) et le fluoxastrobine (e). Source : Pubchem.....	42
<b>Figure 22.</b> Impact des inhibiteurs externes de la quinone (Qol) sur la chaîne de transport d'électrons des mitochondries. Les cinq complexes respiratoires sont représentés : la NADH-déshydrogénase (NADH-DH), la succinate déshydrogénase (SDH), le cytochrome bc1 (bc1) et cytochrome oxydase (COX) et ATP synthase (complexe V). Les Qol bloquent le transfert d'électrons entre le cytochrome <i>b</i> et <i>c1</i> au niveau du complexe III, inhibant ainsi la production d'ATP. Modifié de Ritov <i>et al.</i> (2005).....	43
<b>Figure 23.</b> Formule chimique des fongicides inhibiteurs de la 14-alpha déméthylase (IDM) : l'époxiconazole (a), le tébuconazole (b), le metconazole (c), le prothioconazole (d) et le prochloraz (e). Source : Pubchem.....	45
<b>Figure 24.</b> Mode d'action des inhibiteurs de la biosynthèse des azoles. Adapté de Ziogas et Markoglou (2010). .....	46
<b>Figure 25.</b> Réaction de déméthylation par la CYP51 et son inhibition par les IDM (Ziogas et Malandrakis, 2015).....	47
<b>Figure 26.</b> Fréquence (%) de six principales altérations de CYP51 en Europe durant les années 2015 et 2016. Les fréquences sont exprimées sous forme de heatmap : vert correspond à un intervalle 0-4%, jaune-orange : 5-50% et orange-rouge pour 51-100%.....	51
<b>Figure 27.</b> Distribution et fréquence en Europe des neufs haplotypes de CYP51 les plus présents en 2016. Le nombre d'haplotypes analysé est indiqué pour chaque pays (n). Les séquences de CYP51 pour chaque haplotype sont indiquées (modifié de Huf <i>et al.</i> , 2018).....	52
<b>Figure 28.</b> Région promotrice de <i>cyp51</i> ( <i>MgCYP51</i> ) chez <i>Z. tritici</i> . La figure montre les 269 pb en amont du codon start du gène. Les flèches A et B indiquent la position des primers qui ont servi à identifier l'insert de 120 pb inséré en position -83 pb, responsable de la surexpression de <i>cyp51</i> (Cools <i>et al.</i> , 2012).....	53
<b>Figure 29.</b> Structure moléculaire des trois inserts identifiés dans le promoteur de <i>MgMFS1</i> chez <i>Z. tritici</i> . Les figures indiquent l'emplacement, la longueur et les sites d'insertions des inserts de types I (a), IIa/b (b) et III (c). Les séquences répétées entre les deux insertions sont indiquées en gras. Les séquences consensus de potentiels éléments régulateurs sont indiquées par des triangles et des carrés. Les longues séquences répétées sont représentées par des flèches noires (Omrane <i>et al.</i> 2017). .....	55
<b>Figure 30.</b> Relations entre génotype et phénotype de résistance aux IDM basées sur le polymorphisme présent au sein de la protéine CYP51. Deux types sont représentés : le type a (aucune substitution entre les positions 458 et 462) et le type b (délétions d'une tyrosine (Y) et d'une glycine (G) aux positions 459 et 460). Les mutations accumulées influençant le phénotype sont indiquées entre chaque type, faisant progresser le niveau de résistance (Tri S : sensible aux IDM, TriLR : faiblement résistant aux IDM, TriMR : moyennement résistant aux IDM et TriHR : hautement résistant aux IDM). Cette dernière catégorie contient les individus possédant le phénotype <i>multi-drug resistant</i> , appelé aussi MDR (Leroux <i>et al.</i> , 2011). .....	56

**Figure 31.** Effet *in vitro* des IDM sur la longueur du tube germinatif pour 15 phénotypes de résistance aux IDM chez *Z. tritici* (12 TriR et 3 MDR). a : moyenne des EC<sub>50</sub> calculée pour 6 isolats sensibles (TriS). b : moyenne des facteurs de résistance (EC<sub>50</sub> souches TriR / EC<sub>50</sub> souches TriS). c : ND correspond à non déterminé (Leroux et Walker, 2011)..... 57

**Figure 32.** Fréquence moyenne de six mutations portées par CYP51 (en %) en 2015 et 2016 détectées sur des isolats provenant de parcelles non traitées de pays européens (Danemark (DNK), France (FRA), Allemagne (DEU), Royaume-Uni (GRB), Irlande (IRL) Pologne (POL), LVA (Lettonie) et Hongrie (HUN)). Les facteurs de résistance sont renseignés pour quatre azoles testés : époxiconazole (EPX), metconazole (MCA), tébuconazole (TCA) et le desthio-prothioconazole (PTH-desthio). Un code couleur a été appliqué sur les fréquences de mutations ; vert : aucune mutation, jaune : basse fréquence (1-10%), orange : fréquence moyenne (11-50%) et rouge : haute fréquence (> 50%). NA = aucune donnée disponible. Issu de Jorgensen *et al.*, 2018..... 59

**Figure 33.** Formule chimique des fongicides inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI) : le boscalid (a), le bixafen (b), le fluxapyroxad (c), l'isopyrazam (d) et le benzovindiflupyr (e). Source : Pubchem. .... 60

**Figure 34.** Mode d'action des inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI) au niveau de la respiration cellulaire. Les fongicides bloquent la réaction de synthèse du fumarate et toute la chaîne enzymatique. Modifié de Ritov *et al.*, (2005)..... 61

**Figure 35.** Mode de fonctionnement des outils d'aide à la décision dans le positionnement du premier traitement fongicide (adapté d'ARVALIS – institut du végétal)..... 64

**Figure 36.** Dynamique des populations dans le cas de résistances aux fongicides de type monogénique (a) et polygénique (b). La sélection disruptive ou directionnelle est observée en cas d'usage de fongicides ayant le même mode d'action. La stabilisation est due potentiellement en cas de réduction de *fitness* des souches résistantes (De Miccolis Angelini *et al.*, 2015)..... 68

**Figure 37.** Effet du *fitness cost* sur la sélection de la résistance aux fongicides. Deux conditions sont représentées : dans le cas d'une résistance totale à un fongicide (a) et dans le cas d'une résistance partielle (b). La courbe de croissance de la souche sensible est indiquée en trait continu, alors que les souches résistantes sont représentées en traits discontinus. Trois types de croissance de souches résistantes sont indiqués : une sans *fitness cost* (1) et deux avec des *fitness cost* différents (2 et 3). (Mirakeridze et Mc Donald, 2015)..... 69

## Tables des tableaux

**Tableau 1.** Gènes impliqués dans la résistance qualitative du blé tendre contre la septoriose. Les stades de croissance du blé sont notés S pour plantule et A pour plante adulte (Brown *et al.*, 2015) ..... 23

**Tableau 2.** Liste des gènes codant pour des effecteurs chez *Z. tritici* (modifié de Mirzadi Gohari, 2015) ..... 25

**Tableau 3.** Altérations de la 14-alpha-déméthylase reportées dans la littérature chez *Z. tritici*. Adapté de Cools *et al.* (2013)..... 50

## Liste des abréviations

°C : degré Celsius

6-fam : 6-Carboxyfluoresceine

ABC : ATP- binding cassette

ACT : Actine

ADN : Acide DéoxyriboNucléique

ANOVA : Analysis of variance

AMOVA : Analysis of MOlecular Variance (ANOVA)

ATP : Adenosine trophosphate

Avr : Avirulent

CYP51 : 14-alpha déméthylase

DAMP : Damage associated molecular pattern

dNTP : DesoxyNucléotide Tri-Phosphate

DMSO : Dimethyl sulfoxide

Dpi : Day post inoculation

ETI : Effector triggered immunity

ETS : Effector triggered susceptibility

FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations

FRAC : Fungicide Resistance Action Committee

Hex : 6-Carboxy-1,4-dichloro-2',4',5',7'-tétrachlorofluoresceine

HR : Réponse hypersensible

HSP : Protéine de choc thermique

IBS : Inhibiteur de la biosynthèse des stérols

IDM : Inhibiteur de la 14-alpha déméthylase

IFT : Indicateur de fréquence de traitement

Jpi : Jour post inoculation

LOX : Lipoxygénase

LysM : Lysine motif

MAMP : Microbial associated molecular pattern

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MAT : Mating Type

MDR : Multi Drug Resistance

MFS : Major Facilitator Superfamily  
NEP1 : Necrosis and ethylene-inducing peptide  
NIP : Necrosis inducing protein  
Nm : Nanomètre  
OAD : Outils d'aide à la décision  
PAL : Phenylalanine ammonia-lyase  
PAMP : Pathogen associated molecular pattern  
Pb : Paire de bases  
PCD : Programmed Cell Death  
PCR : Polymérase chain reaction  
PDA : Potatoes dextrose agar  
PM : Poids moléculaire  
POX : Peroxydases  
PR : Pathogenesis related  
PTI : Pathogen trigger immunity  
q/ha : Quintaux par hectare  
Qol : Quinone outside inhibitor  
qPCR : PCR quantitative  
QTL : Quantitative trait loci  
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism  
ROS : Reactive Oxygen Species  
SDHI : Inhibiteur de la succinate déshydrogénase  
Sdh : Succinate déshydrogenase  
SDP : Stimulateur de défense des plantes  
SPP : Small secreted protein  
SREBP : Sterol regulatory element binding protein  
STB : Septoria tritici blotch  
Taq : Thermus aquaticus  
Tm : Temperature melting  
UE : Union européenne  
UV : Ultraviolets

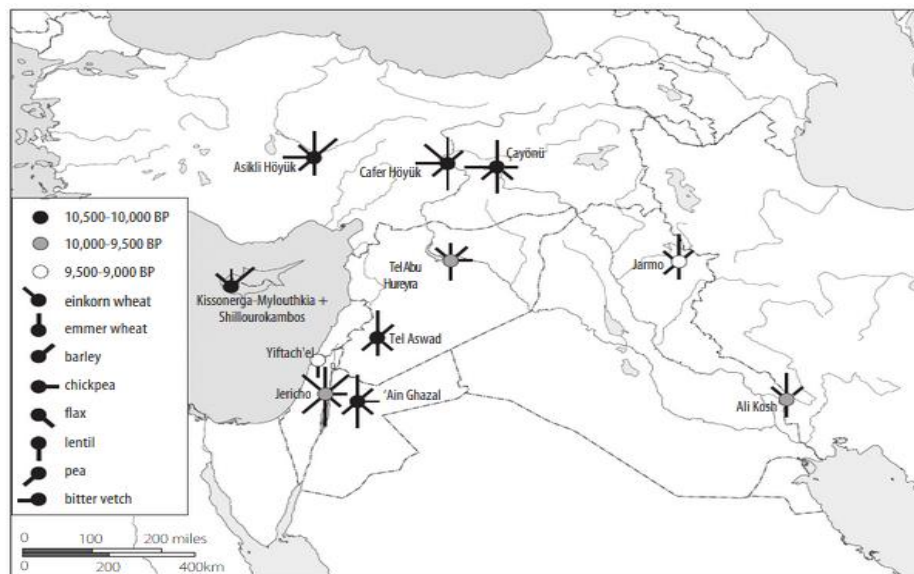
# Introduction générale



# 1 LE BLE, LA PLANTE MODELE

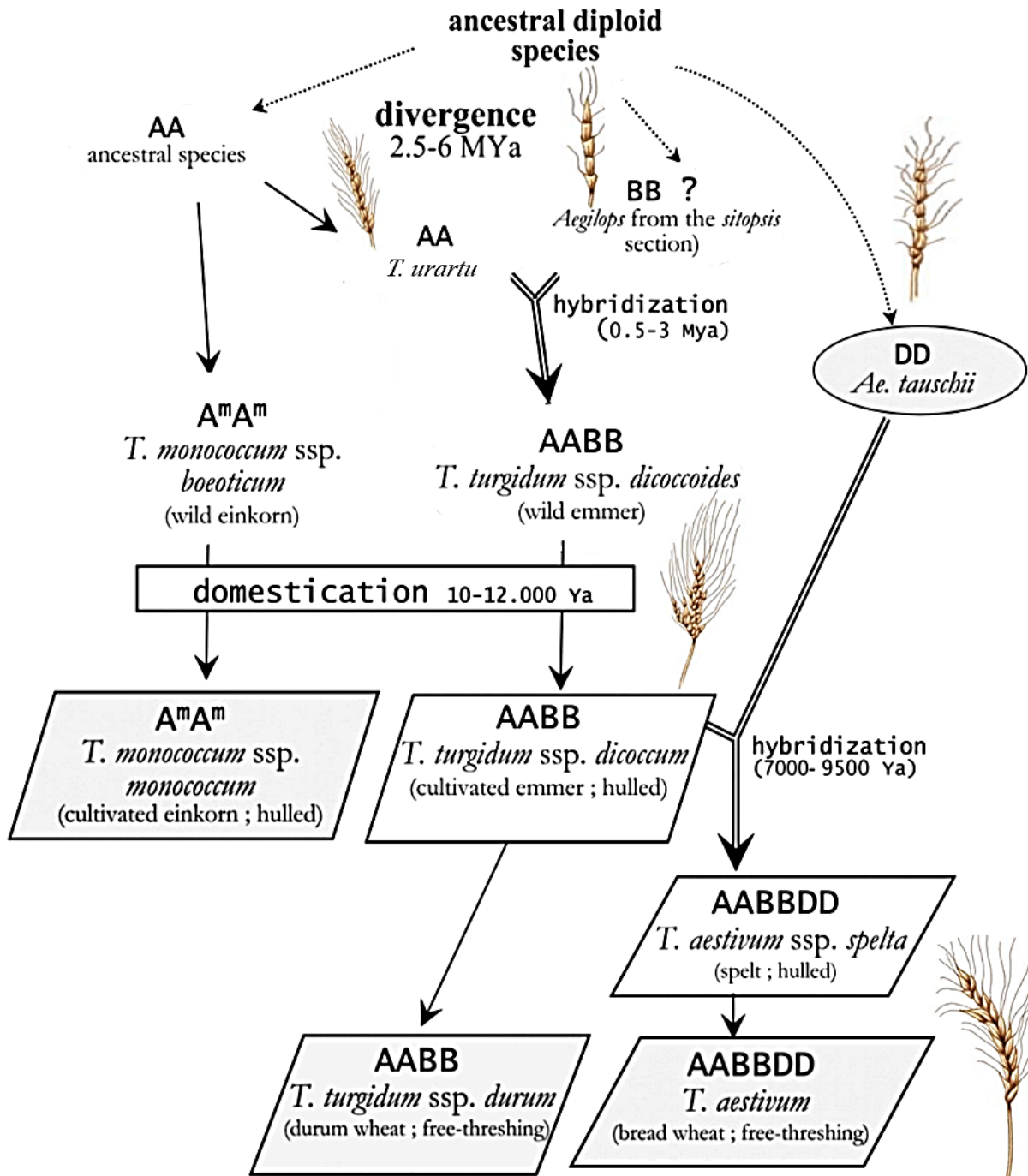
## 1.1 DESCRIPTION ET HISTOIRE

Le blé est une céréale annuelle de la famille des *Poaceae*, elle appartient au genre *Triticum* qui regroupe environ 300 espèces différentes (Matsuoka, 2011). Originaire du croissant fertile, le blé est l'une des premières céréales à avoir été domestiquée par l'homme, il y a plus de 10.000 ans lors de la période appelée « Révolution Néolithique » (Lev-Yadun *et al.*, 2000 ; Tanno et Willcox, 2006). Ingrédient principal de nombreux produits alimentaires, sa culture ne cesse de croître au fil des siècles. A l'aube des civilisations deux formes primitives cultivées du genre *Triticum* sont apparues. Le premier est le blé dur tétraploïde appelé « emmer » ou amidonnier (*Triticum turgidum* L. subsp. *Dicoccum* ; génome AABB,  $2n=28$ ) issu du croisement naturel de *Triticum turgidum* spp *diccooides* et le blé dit « einkorn » ou engrain, blé diploïde connus sous le nom de *Triticum monococcum* spp. *monococcum* (génome AA,  $2n = 14$ ).



**Figure 1.** Domestication des plantes au niveau du croissant fertile. Les précurseurs du blé moderne sont indiqués sous le nom de « einkorn » correspondant au blé diploïde connu sous le nom de *Triticum monococcum* spp. *monococcum* (génome AA,  $2n = 14$ ) et « emmer » correspondant au blé dur tétraploïde connu sous le nom de *Triticum turgidum* L. subsp. *Dicoccum* (génome AABB,  $2n=28$ ). Trois périodes avant notre ère sont représentées (before present ; BP). Carte issue de Weiss *et al.* (2012).

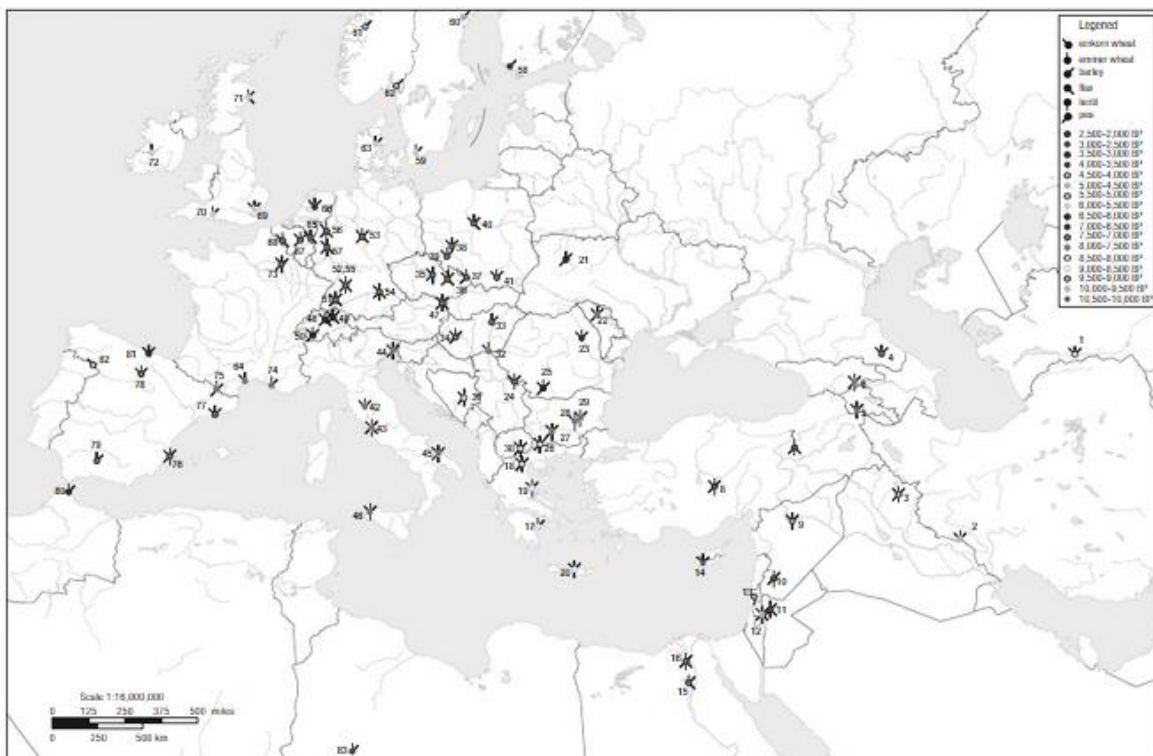




**Figure 2.** Evolution historique des espèces de blé avant et après leur domestication. Les espèces actuelles de blé sont issues du genre *T. turgidum* ssp. *durum* (blé dur) et *T. aestivum* (blé tendre) (Chantret et al., 2005).



Le blé tendre allohexaploïde (*Triticum aestivum* ssp. *aestivum* L., génome AABBDD,  $2n = 42$ ) est issu d'un croisement spontané entre *T. turgidum* et d'une graminée sauvage *Aegilops tauschii* (génome DD), durant la période de 7000 à 9500 ans (Doussinault *et al.*, 2001, Feldman et Levy, 2012). Riche en calorie, facilement transportable, conservable, la culture du blé devient de plus en plus importante et s'étend hors du Proche-Orient pour atteindre l'Ouest de l'Europe environ 5 000 ans et se répand ensuite dans le monde entier (Doussinault *et al.*, 2001). L'homme a contribué indirectement à la sélection d'un blé de meilleure qualité (meilleur rendement, meilleure mouture ou teneur en gluten, permettant l'obtention de pâtes élastiques) mais également à la sélection de plantes présentant une meilleure résistance aux stress biotiques et abiotiques (Kiszonas et Morris, 2018). Le blé est considéré comme l'une des cultures céréalières les plus importantes à ce jour mais ; il est également inséparable de cultures et religions de diverses sociétés dans le monde (Wanyera et Owuoché, 2017). Ses multiples hybridations font de son génome le plus complexe des organismes vivants avec une taille de 17 gigabases. Le séquençage, l'assemblage et l'annotation du génome, réalisés par le consortium International WGS (Wheat Genome Sequencing), ont pris fin en 2018 (Consortium IWGSC *et al.*, 2018). Au total, 107 000 gènes ont été identifiés dont la connaissance permettra à l'avenir d'améliorer le processus de sélection en ciblant les gènes impliqués dans le contrôle de caractères agronomiques intéressants tels que la résistance aux maladies, la sécheresse mais également la qualité du grain.

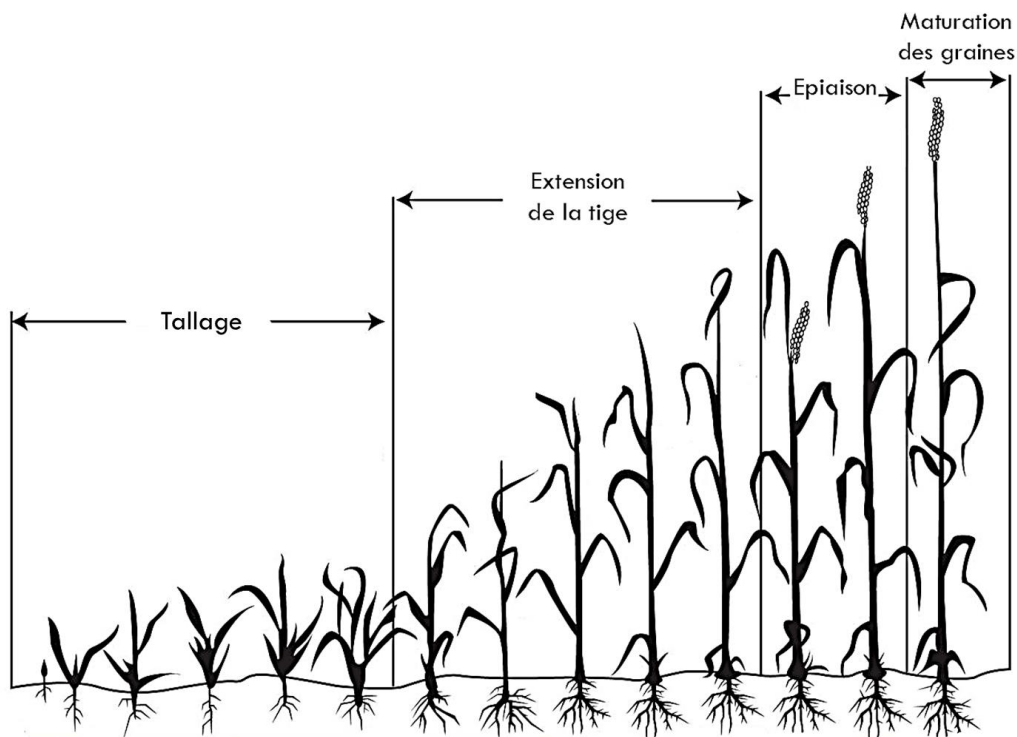


**Figure 3.** Expansion des cultures du blé dans l'Europe Néolithique. Seuls les premiers sites d'implantation des différentes cultures sont représentés (Weiss *et al.*, 2012).



## 1.2 CYCLE DE DEVELOPPEMENT DU BLE

Le cycle du blé est divisé en quelques étapes clés : la phase végétative comprend la croissance des feuilles, des racines ainsi que des talles tandis que la phase de reproduction comporte la formation de l'épi, l'initiation florale, la méiose et enfin la fécondation. La dernière étape correspond à la phase de remplissage et de maturation des grains. Une échelle plus précise sur les différents stades de croissance a été créée par Zadocks *et al.* (1974). Elle constitue une référence dans le monde de l'agriculture céréalière. Composée d'un code à 2 chiffres, le premier correspond aux stades principaux du développement (figure 4). Le second détaille les sous étapes des stades majeurs.

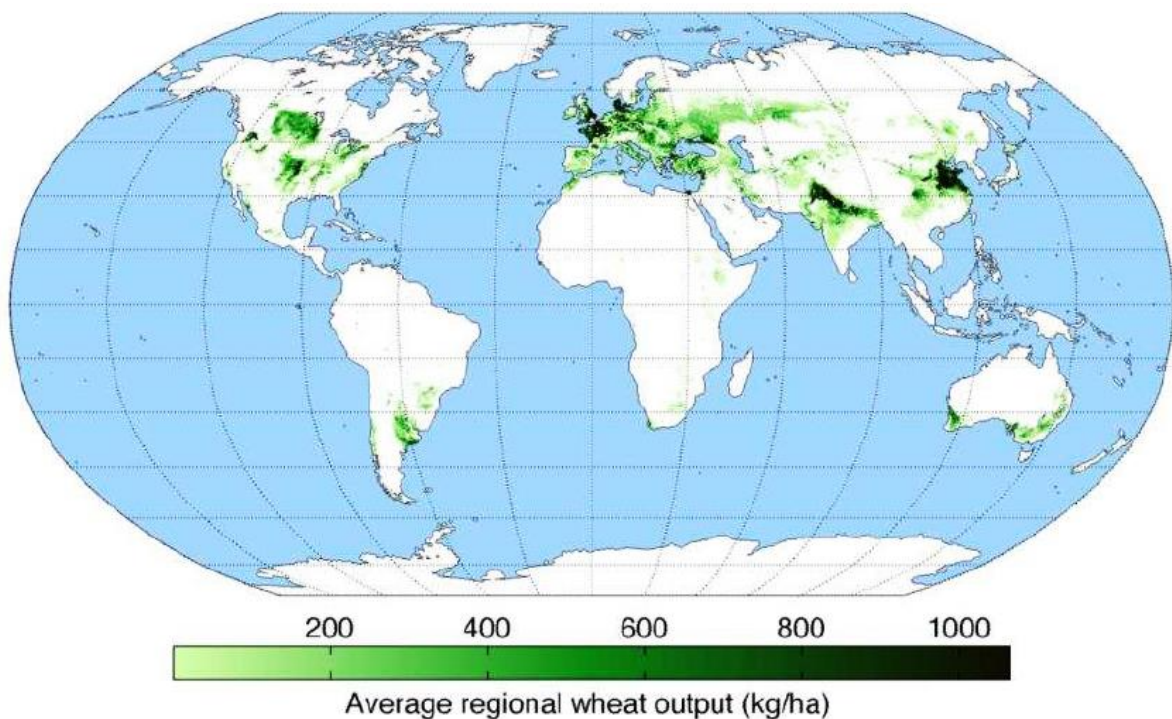


**Figure 4.** Cycle de développement du blé complété par l'échelle de Zadocks. Le stade 0 correspond à la germination de la graine, le 1 au développement des feuilles (10-19), le 2 à la formation de talles (20-29), le 3 à l'allongement de la tige (30-39), le 4 à la montaison (40-49), le 5 à l'émergence de l'inflorescence (50-59), le 6 à la floraison (60-69), le 7 au développement des graines (70-79), le 8 à la maturation des graines (80-89) et le 9 à la sénescence (Zadocks *et al.*, 1974).



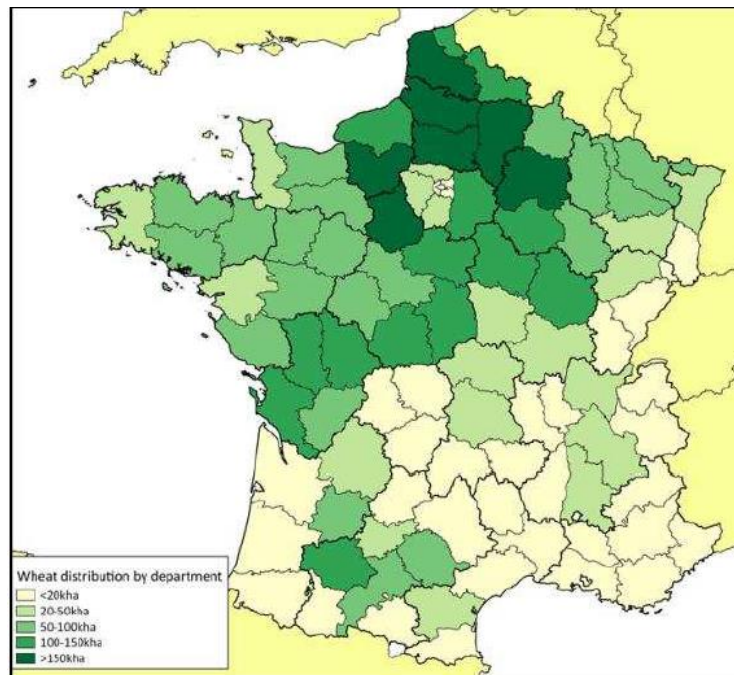
### 1.3 LES BASSINS DE PRODUCTION DU BLE TENDRE

Le blé est l'une des céréales les plus cultivées au monde, occupant la 3<sup>ème</sup> position en termes de production après le maïs (*Zea mays*) et le riz (*Oryza sativa*). Le blé tendre demeure le plus cultivé dans le monde avec 95% des cultures (Shewry, 2009). Les principaux producteurs sont, par ordre décroissant, l'Union Européenne suivie de la Chine, l'Inde, la Russie et les Etats Unis. Ces producteurs sont concurrencés par l'émergence de la production d'autres pays comme le Canada, l'Australie et la Turquie (figure 5).



**Figure 5.** Carte des rendements moyens du blé tendre par hectare observés dans le monde (Monfreda et al., 2008)

La France est le 5<sup>ème</sup> producteur mondial de blé plaçant le territoire comme le premier producteur et exportateur de blé tendre de l'Union Européenne (FAO). En 2015, sur les 35 Mt de blé produit en France, 19,4 Mt ont été exportées majoritairement en Afrique et au Moyen Orient (Le Mouël et Schmitt, 2017). Plus de 5,2 millions d'hectares ont été alloués à la culture de blé en France en 2016, dont la moitié se situant dans le Nord (Agreste, figure 6). Bien que très utilisé pour la panification en raison de sa farine riche en amidon, le blé tendre et ses produits dérivés ne sont pas uniquement réservés à l'alimentation humaine. Ils interviennent également dans l'alimentation animale, la production d'alcool (maltage) et de biocarburant (fermentation) (Fones et Gurr, 2015).



**Figure 6.** Répartition selon les départements français des surfaces de blé tendre en milliers d'hectares en 2013 (Agreste, 2013).

La production du blé dur atteint environ 5%. La composition de son grain permet la fabrication des pâtes et des semoules. Cette espèce est cultivée dans les zones situées entre le Sud de l'Europe et du Maghreb.

#### 1.4 LES VARIETES DE BLE

Plus de 25 000 variétés sont cultivées dans le monde (Shewry, 2009), classées en deux sous-groupes : les variétés de printemps et les variétés d'hiver. Les semis sont échelonnés sur deux périodes de l'année : au début du printemps et au début de l'automne. Les variétés de printemps ont un cycle de croissance court compris entre 70 et 90 jours avec une récolte située en automne. Les variétés d'hiver possèdent un cycle de croissance beaucoup plus long compris entre 100 et 140 jours avec une récolte qui se fait au cours de l'été de l'année suivante.

En France, le blé tendre d'hiver est le plus semé avec 5,22 millions d'hectares (ha) contre 22 000 ha pour le blé tendre de printemps (Agreste). Cette tendance se maintient pour le blé dur où les variétés d'hiver constituent 348 000 ha cultivés contre 6 000 ha pour les variétés de printemps, en 2016 (Agreste). Les 3 cultivars de blé les plus semés en 2016 sont : Rubisko (blé



tendre d'hiver, 12,8% de la sole nationale), Cellule (blé tendre d'hiver, 7,9%) et Fructidor (blé, 4.9%), également très présentes dans le Nord de la France (France AgriMer 2016).

Malgré un panel de variétés toujours plus large, les recherches actuelles démontrent une baisse du pool génique de *T. aestivum*, due à la sélection variétale visant à un meilleur rendement et une meilleure résistance aux stress biotiques et abiotiques (Çifçi et Yagdi, 2012). Aucune variété de blé ne présente de résistance totale face aux maladies causées par les pathogènes, principalement d'origine fongique. Ciblant différents organes de la plante, ces champignons parasites représentent une contrainte importante pour la production de blé. C'est le cas du champignon hémibiotrophe, *Zymoseptoria tritici* responsable de la septoriose du blé, une des maladies foliaires les plus nuisibles sur cette culture (Eyal *et al.*, 1999).



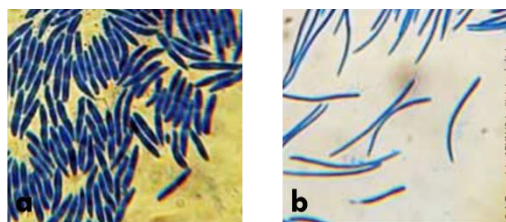
## 2 ZYMOSEPTORIA TRITICI, L'AGENT DE LA SEPTORIOSE

### 2.1 GENERALITES ET HISTOIRE DE LA MALADIE

La septoriose (*Septoria Tritici Blotch*, STB) est l'une des maladies cryptogamiques les plus dévastatrices du blé (Dean *et al.*, 2012 ; Fones et Gurr, 2015). Elle est causée par un champignon ascomycète de la famille des *Mycosphaerellaceae* et du genre *Septoria* : *Zymoseptoria tritici* (téléomorphe : *Mycosphaerella graminicola* ; Quaedvlieg *et al.*, 2011). Décrit pour la première fois en 1842 en France par Desmazières (Ponomarenko *et al.*, 2011) sous sa forme anamorphe, sa forme téléomorphe n'est identifiée que plus d'une centaine d'années plus tard en Nouvelle Zélande (Sanderson et Hampton, 1978). Depuis, elle a été identifiée en France (Halama, 1996) ainsi que dans toutes les cultures de blé du globe (Eyal *et al.*, 1999). Historiquement, son émergence date des débuts de la domestication du blé dans le Croissant Fertile. En effet, des études réalisées avec l'utilisation de marqueurs microsatellites ont indiqué une concordance entre les diversités génétiques observées entre *Z. tritici* et son hôte, le blé tendre. Ce pathogène se serait ainsi disséminé au travers de l'expansion de la culture du blé en Europe (Banke *et al.*, 2004 ; Stukenbrock et McDonald, 2007).

Avant les années 1980, la septoriose était majoritairement le résultat du développement d'un autre phytopathogène : *Parastagonospora nodorum* (téléomorphe : *Phaeosphaeria nodorum*). Appelée également septoriose, cette maladie cause des chloroses et des nécroses foliaires mais également des nécroses sur la partie supérieure des glumes des épis de blé. La distinction entre les deux pathogènes peut s'avérer difficile sur le terrain mais peut se faire par l'analyse des pycnidiospores en laboratoire (figure 7). La population de *P. nodorum* est devenue beaucoup moins fréquente après les années 1980. Selon Bearshell *et al.* (2005), ce déclin serait causé par les émissions de dioxyde de soufre dans l'atmosphère.

Un troisième pathogène peu fréquent peut entraîner la septoriose : *Parastagonospora avenae* f. sp. *triticea* (téléomorphe : *Phaeosphaeria avenaria* f. sp. *triticea*) pouvant contaminer le blé, le seigle ou l'orge (Cunfer, 1997).

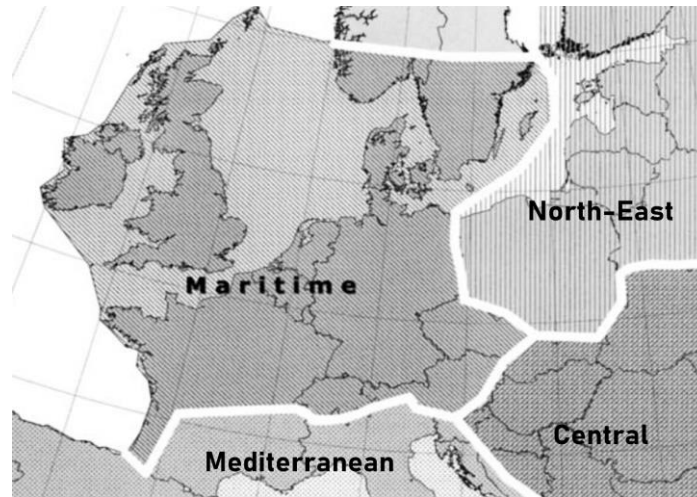


**Figure 7.** Morphologie des pycnidiospores de *Parastagonospora nodorum*(a) et de *Zymoseptoria tritici* (b) (source : Arvalis-Institut du végétal).



## 2.2 IMPACT ECONOMIQUE DE LA MALADIE

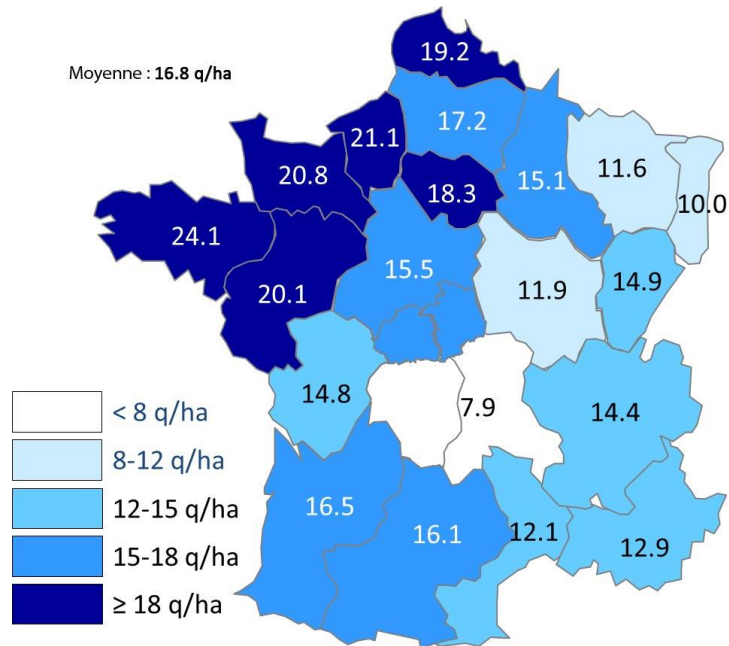
Il est admis qu'une épidémie peut provoquer des pertes de rendement estimées jusqu'à 50% (Eyal et al., 1999). *Z. tritici* se développe principalement dans les zones maritimes comme l'Ouest de l'Europe où l'humidité est favorable à son développement (figure 8, Bouma, 2005 ; Fones et Gurr 2015). Les pays principalement touchés par la septoriose sont l'Irlande, le Royaume-Uni, le Danemark, l'Allemagne, le Pays-Bas, la Belgique et le Nord-Ouest de la France.



**Figure 8.** Proposition de division de l'Europe selon Bouma (2005). Les zones agro-climatiques sont réparties en quatre avec la zone maritime, méditerranéenne, centrale et du nord-Est. La zone maritime est favorable au développement de *Z.tritici*.

En France, les pertes engendrées par *Z. tritici* sont estimées à environ 17 quintaux par hectare (q/ha) à l'échelle du territoire sur les dix dernières années, avec des dommages pouvant s'élever à 50 % dans les situations les plus exposées (Figure 9 ; Arvalis-Institut du végétal). L'impact sur le rendement dépend de facteurs comme, par exemple, la situation géographique (région humide), l'intensité de l'épidémie (liée aux conditions environnementales de l'année) et le stade de croissance du blé lors de l'infection. Plus le début de l'épidémie est précoce (stade 2-3 feuilles), plus l'impact sur le rendement est important (O'Callaghan et al., 1994). Au niveau du territoire français, la région des Hauts-de-France est particulièrement touchée à cause de son climat humide, propice au développement de la septoriose.





**Figure 9.** Carte de France représentant les pertes moyennes en quintaux par hectare (q/ha) engendrées par la septoriose selon les régions pendant les années 2000 à 2012 (Arvalis-Institut du végétal). Entre régions, on observe une forte variabilité notamment dans l'est de la France (Alsace : 10q/ha) et l'ouest, régions au climat plus humide, favorable au développement de la septoriose (Bretagne : 24.1 q/ha).

La perte de rendement se caractérise par une diminution du nombre de grains par épi et du poids et de la qualité des grains (McKendry *et al.*, 1995 ; Simón *et al.*, 2003). Du fait de son impact, *Z. tritici* est considéré comme préoccupant pour les cultures de blé et menaçant pour la sécurité alimentaire. Par sa forte incidence économique et l'intérêt particulier qu'il suscite auprès des scientifiques, *Z. tritici* a été classé parmi les dix premières espèces modèles de champignons phytopathogènes (Dean *et al.*, 2012).

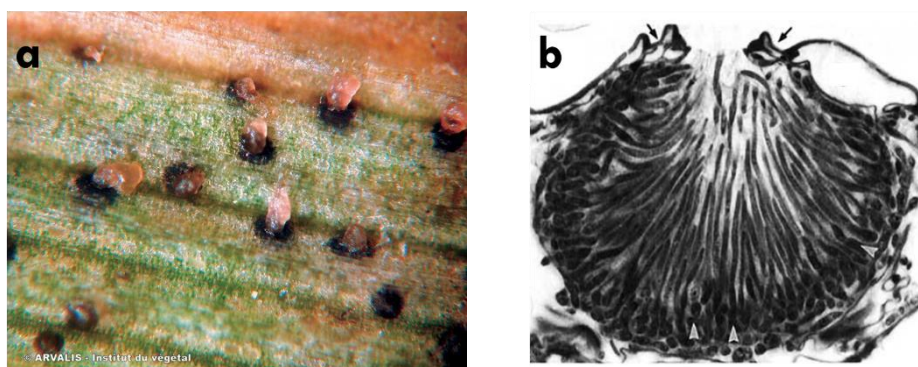
### 2.3 RECONNAITRE UNE INFECTION CAUSEE PAR *Z. TRITICI*

Les symptômes de la septoriose débutent par un palissement du limbe foliaire puis par l'apparition de tâches chlorotiques de couleur vert clair à jaune. Ces signes apparaissent environ deux semaines après germination des spores (Siah *et al.*, 2010). Les chloroses se transforment ensuite en lésions nécrotiques auréolées de liserés chlorotiques jaunes (figure 10). Les lésions nécrotiques se prolongent sur les nervures parallèles et se rejoignent jusqu'à recouvrement total de la feuille (Eyal, 1999).



**Figure 10.** Symptômes de la septoriose du blé causé par l'ascomycète *Zymoseptoria tritici*. Après une phase de latence d'une durée d'environ 14 jours, le champignon entre en phase nécrotrophe. Les tâches chlorotiques puis nécrotiques se forment sur les feuilles contaminées. La forme de reproduction asexuée de *Z. tritici* apparaît sous forme de punctuations noires appelées pycnides (Arvalis-Institut du végétal).

Les pycnides apparaissent sur ces tâches sous forme de petits points de couleur brune ou noire situés sur la face supérieure et inférieure de la feuille (figure 10 et 11). La taille des pycnides varie généralement entre 60 et 200  $\mu\text{m}$  (Sanderson et Hampton, 1978) et dépend du pouvoir pathogène du parasite, de la densité de l'infection, de la sensibilité du cultivar et des conditions environnementales (Kema et Annone, 1991 ; Steinberg, 2015). De la même façon, la fréquence d'apparition des pycnides est également sujette à variation en fonction de ces paramètres.

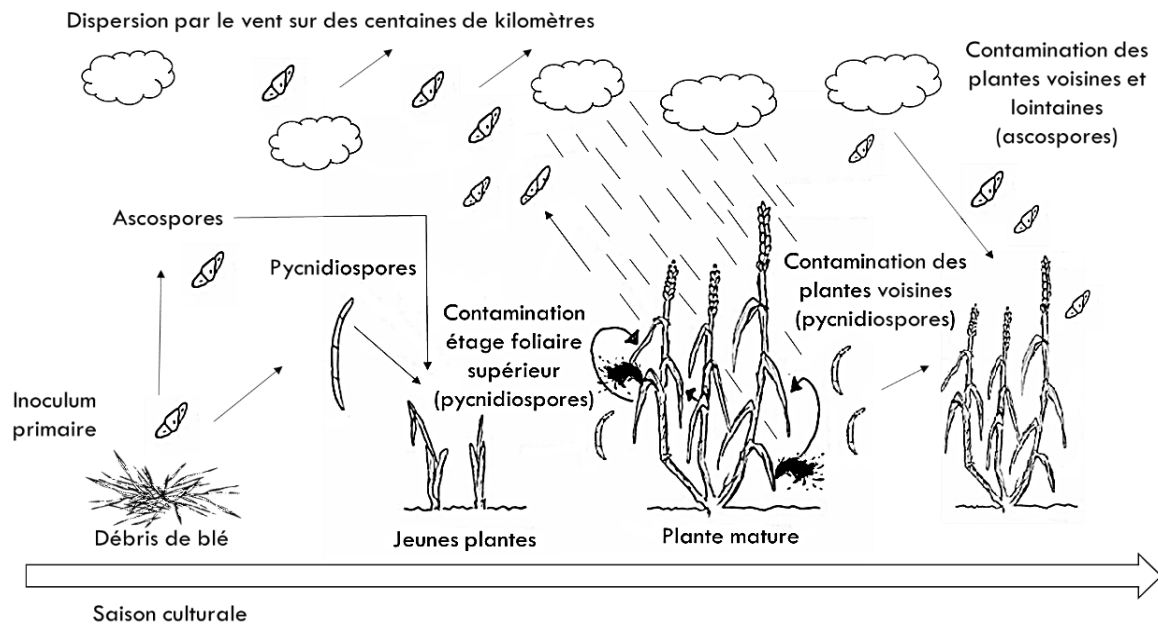


**Figure 11.** (a) Lésions présentant des pycnides matures de *Zymoseptoria tritici*, exsudant le cirrhe, une matrice extracellulaire contenant les pycnidiospores (Arvalis-Institut du Végétal). (b) Vue en coupe d'une pycnide mature située dans la cavité substomatale contenant des pycnidiospores (Kema *et al.*, 1996).



## 2.4 CYCLE EPIDEMIQUE

Les scientifiques s'accordent à dire que le cycle de *Z. tritici* est de type hémibiotrophe combinant une phase biotrophe d'environ deux semaines suivie d'une phase nécrotrophe. Il semblerait cependant que le terme de nécrotrophe tardif soit plus approprié pour décrire son mode de vie selon les études de Hammond-Kosack et Rudd (2008) et Sánchez-Vallet *et al.* (2015). En effet, *Ramularia collo-cygni*, *Leptosphaeria maculans* et *Rynchosporium commune*, des pathogènes nécrotrophes, possèdent également une phase de latence parfois longues pouvant s'étendre de quelques jours à plusieurs mois. Pour *Z. tritici*, l'épidémie débute en automne, dès la levée du blé (figure 12). Les jeunes plantules sont contaminées par un inoculum primaire majoritairement constitué d'ascospores issues de la reproduction sexuée (Suffert *et al.*, 2011). Suffert et Sache (2011) ont en effet détecté un pic d'ascospores durant la période fin octobre - début novembre qui appuie cette hypothèse. De taille estimée entre 10 à 15  $\mu\text{m}$ , les ascospores sont formées dans des fructifications sexuées appelées pseudothèces présents sur les résidus de cultures de blé précédentes (Brown *et al.*, 1978). Ces organes reproducteurs ne se forment qu'après fusion de deux individus de types sexuels (*mating-types*) opposés. Ils sont subépidermiques, sphériques, de couleur brun foncé et ont une paroi épaisse à double couche de cellules dont seule la couche extérieure est pigmentée. Ces fructifications contiennent les asques dont chacun comporte 8 ascospores bicellulaires, elliptiques et d'aspect translucide. Les ascospores sont dispersées par le vent sur des distances pouvant atteindre des centaines de kilomètres et sont responsables de l'infection à grandes distances des cultures de blé (Eyal *et al.*, 1987).



**Figure 12.** Cycle de vie de *Zymoseptoria tritici* adapté de Palmer et Skinner (2002). L'inoculum primaire, majoritairement composé d'ascospores présent dans les débris, contamine les jeunes plants de blé. Après développement et croissance, le champignon produit des ascospores issues de la reproduction sexuée qui sont alors disséminées par le vent. Les pycnidiospores, issues de la reproduction asexuée, sont quant à elles dispersées vers les étages foliaires supérieurs via le « splashing ». Elles sont responsables de la propagation de la maladie à courte distance alors que les ascospores peuvent contaminer des cultures très éloignées par le biais du vent.

D'autres sources d'inoculum peuvent intervenir dans l'épidémie comme les repousses de blé, des ascospores provenant d'autres foyers infectieux (Eyal, 1999) ou une source provenant d'hôtes secondaires comme des graminées sur lesquelles se développe le champignon (*Agrostis capillaris*, *Bromus hordeaceus* subsp. *hordeaceus*, *Anisantha sterilis*, *Festuca arundinacea*, *Poa annua* et *P. pratensis* ; Suffert et al., 2011). Les pycnidiospores issues des pycnides (reproduction asexuée) ont également un rôle en début d'épidémie (Eyal 1999 ; Eriksen et Munk, 2003). Elles sont dispersées par projection de gouttelettes d'eau de pluie (« splashing ») sur de courtes distances, infectant les étages foliaires supérieurs et plantes voisines. Siah et al. (2018) montrent que 20 cm<sup>2</sup> de blé infecté peut contenir jusqu'à 100 souches différentes.



## 2.5 GENETIQUE DU CHAMPIGNON

Le génome nucléaire de *Z. tritici* contient 21 chromosomes, dont 13 indispensables et 8 accessoires, n'impactant pas la survie du champignon (Goodwin *et al.*, 2011). Le génome a été séquencé grâce à Energy's Joint Genome Institute en prenant comme isolat la souche hollandaise IPO323 (Kema et Silfhout, 1997). C'est l'un des génomes fongiques le mieux assemblé avec environ 11 000 gènes prédits avec une moyenne de 21% d'ADN répétitif. C'est le champignon filamenteux contenant le plus grand nombre de chromosomes accessoires (Goodwin *et al.*, 2011). Les 8 petits chromosomes non essentiels peuvent être absents ou partiellement présents au sein des souches collectées sur le terrain. Wittenberg *et al.* (2009) montrent que ces chromosomes sont très souvent perdus lors du processus de méiose. Ils peuvent également présenter des distorsions de ségrégation ou une non-disjonction lors de la méiose (Fouché *et al.* 2018). Composés de séquences répétées (Dhillon *et al.*, 2014), leurs rôles restent à définir mais ils possèdent un taux d'évolution rapide (Stukenbrock *et al.*, 2011). Ils sont également soumis à de fortes régulations en raison de la présence de nombreux micro-ARN au sein des différents loci. En conséquence, l'expression de ces derniers s'en retrouve diminuée de 4 à 15 fois à celle observée dans les chromosomes indispensables (Rudd *et al.*, 2015). Il n'est pas exclu que certains chromosomes accessoires seraient influencés par la sélection. Ils pourraient conférer de façon directe ou indirecte des caractères phénotypiques, comme dans l'adaptation face au changement environnemental (Wittenberg *et al.*, 2009) ou le développement de la résistance aux fongicides (Torriani *et al.*, 2009). Cependant, ceux-ci portent peu de gènes et aucune expérience n'a, à ce jour, réussi à démontrer qu'ils aient une importance quelconque dans le cycle de vie du champignon ou qu'ils apportent un avantage particulier telle qu'une virulence spécifique, comme présents chez *Fusarium oxysporum* ou *Nectria haematococca* (Goodwin *et al.*, 2011 ; Miao *et al.*, 1991 ; Ma *et al.*, 2010). Certaines études suggèrent un rôle potentiel des chromosomes accessoires dans la virulence du champignon, mais les conclusions sont contradictoires : Stewart *et al.* (2018) associe, grâce aux QTL, la présence de quatre chromosomes accessoires avec une augmentation significative de plusieurs traits de virulence sur le cultivar Runal, mais Habig *et al.* (2017) montre que la délétion des chromosomes 14, 16, 18, 19 et 21 entraîne une virulence accrue pour un des 3 cultivars de blé testés, le cultivar Runal. Les deux études suggèrent que l'identité des chromosomes accessoires, le fond génétique et les interactions hôte-pathogène influencent le phénotype des chromosomes accessoires.



## 2.6 GENETIQUE DES POPULATIONS

L'histoire évolutive de *Z. tritici* est sans doute la mieux étudiée de tous les agents pathogènes fongiques (Mc Donald *et al.*, 2015). Des analyses génétiques des populations de champignons se développant sur graminées sauvages à proximité des champs de blé au Croissant Fertile ont révélé la présence d'espèces fongiques apparentées à *Z. tritici* : *Zymoseptoria pseudotritici* et *Zymoseptoria ardabiliae* (Stukenbrock *et al.*, 2011). La comparaison génomique de ces deux proches parents a révélé une évolution adaptative démontrée notamment grâce à l'étude des peptides signaux qui interagissent avec l'hôte et l'environnement (Stukenbrock *et al.*, 2011). Les chromosomes accessoires semblent également hérités d'un ancêtre commun car *Z. pseudotritici* et *Z. ardabiliae* en sont tous deux porteurs (Stukenbrock *et al.*, 2011). L'analyse de ces données indique que *Z. tritici* est un pathogène subissant une évolution rapide, il est devenu hautement spécialisé dans l'infection du blé par rapport à ses proches parents (Stukenbrock *et al.*, 2011).

Les populations de *Z. tritici* présentent un niveau de diversité génétique (génotypique et génique) globalement élevé par rapport aux autres pathogènes, la raison principale en étant ses modes de reproduction. La reproduction sexuée permet un brassage génétique (recombinaison) entre deux souches de *mating-types* différents et assure une diversité génotypique élevée (Eriksen et Munk 2003). Ce mode de reproduction favorise les flux de gènes (Zhan *et al.*, 2003) et l'apparition rapide de résistances aux fongicides (Zhan *et al.*, 2006 ; Leroux *et al.*, 2006 ; Drabesova *et al.*, 2013 ; Boukef *et al.*, 2012 ; Siah *et al.*, 2014 ; Cheval *et al.*, 2017). La reproduction asexuée permet quant à elle la propagation des souches les mieux adaptées sur le terrain pour un type de cultivar, de fongicide et/ou de conditions climatiques. Le niveau de structuration résultant de ce mode de reproduction (différenciation des populations) est également élevé bien que des variations en fonction des marqueurs et des zones géographiques soient observées (Zhan *et al.*, 2003 ; Abrinbana *et al.*, 2010 ; El Chartouni *et al.*, 2011 ; Gurung *et al.*, 2011 ; Boukef *et al.*, 2012 ; Siah *et al.*, 2018). Un typage des collections mondiales du parasite à l'aide de marqueurs RFLP a révélé un manque de structuration et un flux de gènes très élevé entre les populations testées (Zhan *et al.*, 2003). En revanche, des études réalisées plus récemment avec des marqueurs microsatellites ou AFLP ont mis en évidence des niveaux de structuration significatifs au sein de populations issues d'un même pays comme l'Iran (Abrinbana *et al.*, 2010), la France (El Chartouni *et al.*, 2011. Siah *et al.*, 2018) et les États-Unis (Gurung *et al.*, 2011) ou entre des populations issues de pays différents comme la Tunisie, la Suisse, l'Allemagne, la République Tchèque, le Royaume-Uni, Israël, la Syrie et l'Iran (Boukef *et al.*, 2012; Drabešová *et al.*, 2013).



Ces différenciations peuvent s'expliquer par la dérive génétique, les barrières géographiques et/ou par l'adaptation du parasite aux conditions spécifiques locales liées au climat, aux cultivars de blé et aux pratiques culturales. Les récentes études épidémiologiques suggèrent que le cultivar possède un rôle important dans l'adaptation à court terme de *Z. tritici* (Suffert *et al.*, 2015). Sur une échelle plus fine telle que les lésions des étages foliaires d'une même plante ou sur la même feuille, Siah *et al.*, (2018) démontrent un taux important de diversité génétique et génotypique due à la faible fraction clonale présente, indiquant l'importance des ascospores dans les épidémies.

La structure génétique peut révéler des informations sur la capacité du pathogène à évoluer et s'adapter en réponse à des variétés de blé résistantes et à l'application de fongicides (Linde *et al.*, 2002). A ce jour, aucune étude n'a été menée pour tester la relation entre les traitements fongicides et la structuration génétique des populations de *Z. tritici*.



### 3 INTERACTIONS BLE-ZYMOSEPTORIA TRITICI

---

Pour pouvoir subsister dans son milieu naturel, toute plante doit se défendre contre les divers agents pathogènes menaçant sa survie. Les plantes ont développé des stratégies de défense reposant sur deux mécanismes distincts. Le premier constitue les défenses passives que la plante développe au niveau morphologique pour constituer une barrière contre les agresseurs (paroi, cuticule, production constitutive de métabolites secondaires ; Reina-Pinto et Yephremov, 2009). Le second correspond aux mécanismes moléculaires induits par la reconnaissance d'un signal conduisant à la production de molécules de défense chez les végétaux.

Les interactions entre les deux acteurs peuvent se faire selon trois types : la relation non-hôte, la relation hôte incompatible et la relation hôte compatible. La relation non-hôte représente le cas où le pathogène ne peut pénétrer au sein des tissus végétaux et est repoussé par les défenses de la plante. La relation hôte incompatible se dit dans le cas où le pathogène parvient à pénétrer dans les tissus de l'hôte mais sa croissance est immédiatement stoppée grâce à la résistance déployée par la plante. Aucune maladie ne sera observée et le pathogène sera dit avirulent. La relation hôte compatible est celle qui permet au pathogène de pénétrer, se développer et causer les symptômes de la maladie car il y aura une expression de la virulence du pathogène.

#### 3.1 REACTIONS DE DEFENSE DU BLE CONTRE *Z. TRITICI*

Reposant initialement sur le modèle d'interaction gène-pour-gène de Flor (1971), la compréhension de l'interaction plante pathogène n'a cessé de s'étoffer pour finalement aboutir au modèle zig-zag de Jones et Dangl (2006). La réaction débute par la reconnaissance d'un signal qui est divisée en trois catégories selon les molécules émises lors de l'interaction. Elles peuvent être libérées par des organismes pathogènes (pathogen associated molecular patterns ; PAMP), par des organismes non pathogènes (*microbial associated molecular patterns* ; MAMP) ; ou par la plante elle-même lors d'attaques par les bio-agresseurs (*damage associated molecular patterns* ; DAMP). À la suite de ces signaux, deux types de réponses de défense peuvent être déclenchées : la réponse induite et la réponse tardive.





### 3.1.1 La réponse induite

Cette première réponse est considérée comme une immunité innée (non spécifique), polygénique et quantitative. Elle débute par la reconnaissance des PAMP extracellulaires par des récepteurs situés à la surface des cellules de la plante, appelés *Pattern-recognition-receptors* (PRR ; Zipfel, 2014). Ces PAMP sont des molécules présentant des motifs spécifiques perçus par les cellules végétales. Les protéines PRR, qui fonctionnent en homodimères et hétérodimères, permettent alors la transduction du signal d'alarme. La *PAMP triggered Immunity* (PTI) est ainsi enclenchée grâce à la cascade de phosphorylation de la voie des « *Mitogen Activated Protein Kinase* » ou MAPK (Zhang et Klessig, 1997 ; Rudd *et al.*, 2008). Lors de l'interaction *Z. tritici*-blé, la PTI est initiée par une MAPK codée par *TaMPK3* dès le début de la phase nécrotrophe (Rudd *et al.*, 2008). L'une des premières réponses PTI est une génération rapide d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). À la suite de la PTI, le pathogène fongique sécrète des protéines, appelées effecteurs, qui ont pour but de supprimer la PTI. Cette action entraîne une sensibilité de l'hôte, un phénomène appelé « *effector triggered susceptibility* » ou ETS. Ces molécules ont de multiples actions durant l'infection : elles peuvent masquer la présence du pathogène, inhiber les voies de défense et permettent le développement du pathogène grâce à l'assimilation des nutriments libérés lors du processus de dégradation des parois. Ces interactions peuvent aboutir à l'expression de gènes de résistance impliqués dans la reconnaissance des effecteurs chez la plante. Cette reconnaissance va entraîner la mise en place de mécanismes de défenses ciblés dit *Effector triggered immunity* (ETI), la deuxième ligne de défense qui conduit à la mort cellulaire au niveau des sites les plus infectés, également appelée la réponse hypersensible (HR ; Jones et Dangl, 2006).

#### 3.1.1.1 La vague oxydative

Parmi les réactions suite de la PTI, une importante entrée d'ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dans la cellule permet le déclenchement de la vague oxydative via les espèces réactives de l'oxygène (ROS). On distingue ainsi l'ion superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), l'oxide nitrique (NO) et le radical hydroxyle ( $\text{HO}_2^{\bullet-}$ ) ainsi que le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Lehmann *et al.*, 2015). A fortes concentrations, ces molécules vont affecter la teneur des membranes cellulaires en protéines et en lipides et à faibles concentrations, elles vont activer des réponses de défense supplémentaires (Macho et Zipfel, 2014). Parmi ces réponses supplémentaires, on peut citer l'implication dans les voies de signalisation telles que les MAPK, l'expression de gènes de défense mais aussi la production de phytoalexines et de l'acide salicylique (Parent *et al.*, 2008 ; Lehmann *et al.*, 2015).



L'effet du  $H_2O_2$  a été particulièrement étudié dans l'interaction *Z. tritici*-blé. L'accumulation de  $H_2O_2$  renforce les parois cellulaires et induit la mort cellulaire dans le but de freiner la propagation du pathogène (Macho et Zipfel, 2014). Ces conclusions sont démontrées par les travaux de Shetty *et al.* (2007) : *Z. tritici* est particulièrement sensible au taux d' $H_2O_2$  au point de réduire sa colonisation, sa biomasse et d'allonger la période de latence. Cependant, *Z. tritici* posséderait une plus grande tolérance à l' $H_2O_2$  lors du passage de la phase biotrophe à la phase nécrotrophe (Shetty *et al.*, 2003, Shetty *et al.*, 2007). Les fortes concentrations de ces molécules sont toxiques et leurs productions sont particulièrement régulées grâce à des enzymes antioxydantes comme l'oxalate oxydase (OXO) et la superoxyde dismutase (SOD) qui permettent la génération de l' $H_2O_2$ , mais aussi les peroxydases (POX) et la catalase (CAT) qui permettent sa catalyse (Halliwell, 2006 ; Kärkönen et Kuchitsu, 2015).

Le  $H_2O_2$  produit est oxydé par les peroxydases dans le but de fournir des donneurs d'hydrogène pour de nombreux processus physiologiques de défense tels que la lignification, la subérisation et l'oxydation des phénols. Une activité graduelle plus importante des POX a été observée au sein des cultivars tolérants par rapport aux cultivars sensibles à la septoriose, une fois ceux-ci inoculés par *Z. tritici* (Shetty *et al.*, 2003). La catalase est également à l'origine de la baisse intracellulaire de  $H_2O_2$ . Située dans les peroxydosomes, son activité est réduite dans les cultivars tolérants à la septoriose lors d'une infection causée par *Z. tritici* (Chen *et al.*, 1993 ; Chen *et al.*, 1995).

### **3.1.1.2 Transduction du signal**

Après reconnaissance, le signal d'alerte est véhiculé localement ou dans l'ensemble de la plante. Dans le règne végétal, des hormones végétales spécifiques permettent l'établissement d'une résistance locale ou systémique. Les principales hormones impliquées sont l'acide salicylique (AS) l'acide jasmonique (AJ), l'éthylène (ET) et l'acide abscissique (ABA) (Verhage *et al.*, 2010). Dans l'interaction *Z. tritici*-blé, seuls les principaux rôles de l'AS et de l'AJ ont été étudiés. L'AS est un composé synthétisé à partir du chorismate selon deux voies biochimiques : la voie de l'isochorismate et la voie des phénylpropanoïdes (Vidhyasekaran, 2015). La biosynthèse de l'AS par la voie des phénylpropanoïdes débute par la conversion de la phénylalanine en acide trans-cinnamique grâce à la phénylalanine ammonia lyase (PAL). Les espèces réactives de l'oxygène comme le NO viennent augmenter l'activité de la PAL (Vidhyasekaran, 2015). Au niveau cellulaire, l'accumulation de l'AS permet de bloquer l'activité de la catalase, induisant une accumulation de l' $H_2O_2$  intracellulaire, et d'un précurseur de synthèse de l'AS : l'acide benzoïque.



L'AS active également l'expression de gènes impliqués dans la défense comme le gène *pr1* (Verhage *et al.*, 2010). Au niveau de la plante, l'AS régule les voies hormonales de l'AJ et de l'éthylène.

L'AJ est un composé synthétisé à partir de l'acide linoléique appartenant à la voie des octadécanoïdes. Lors d'une infection par un pathogène, sa concentration augmente grâce à l'activation de phospholipases qui relâche des acides gras insaturés dans la cellule tel que l'acide gras alpha linoléique (C18 :3 ; Wasternack & Hause, 2013). Ce dernier sera oxygéné en position C13 grâce à l'action de la lipoxygénase (LOX), essentiel à la production de l'AJ. De là, plusieurs dérivés de l'AJ peuvent être créés, ayant chacun des activités biologiques particulières comme le méthyl jasmonate (MeJA), acteur important dans l'induction de la transcription des gènes de défense des plantes (Browse, 2009). Lors d'une attaque occasionnée par *Z. tritici*, la transcription du gène LOX est induite pour les cultivars de blé sensibles et tolérants avec des niveaux de transcription plus conséquents pour les cultivars sensibles, suggérant un rôle important dans la colonisation des tissus (Ray *et al.*, 2003). Cette hypothèse est également suggérée par l'inhibition rapide de la LOX chez les cultivars résistants, provoquant un retard dans l'installation du champignon (Ray *et al.*, 2003).

### 3.1.2 La réponse tardive

Si la première réaction n'a pas été suffisante, la plante va enclencher les réponses dites tardives comme le renforcement des barrières physiques par dépôt de callose et de lignine pour permettre aux cellules végétales de résister aux *cell-wall degrading enzymes* (CDWE) (Benhamou et Rey, 2012). D'autres composés de défense seront synthétisés tels que les phénylpropanoïdes et les protéines « pathogenesis related proteins » (PR).

Les phénylpropanoïdes ou composés phénoliques sont impliqués dans la régulation des réponses aux stress biotiques ou abiotiques de la plante. Ils sont issus du métabolisme secondaire conduisant à la synthèse de l'AS, des phytoalexines et des flavonoïdes. La première réaction de synthèse, commune à tous, se fait *via* la phenylalanine ammonia lyase (PAL). Cette enzyme est un indicateur d'infection chez *Z. tritici* car sa transcription est détectée 3 à 6 h après infection chez les cultivars tolérants (Adhikari *et al.*, 2007) mais ne semble que concerner certains cultivars car Shetty *et al.* (2009) ne détecte aucune activité chez les cultivars sensible et résistants testés.

Les protéines PR sont des protéines de petites tailles localisées principalement dans l'apoplasme (Benhamou et Rey, 2012). Les fonctions de ces molécules restent obscures mais la plupart possèdent une activité hydrolytique ou un effet toxique (Benhamou et Rey, 2012). Elles sont catégorisées en 17 classes (PR1 à PR17) (Ali *et al.*, 2018).



Certaines ont été étudiées dans l'interaction *Z. tritici*-blé. En effet, *PR1* est souvent utilisée comme un marqueur de la réponse HR (Van Loon *et al.*, 2006). Les expressions sont différentielles selon les interactions compatibles ou incompatibles pour les gènes *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PR5* et *PR9* (Ray *et al.*, 2003 ; Adhikari *et al.*, 2007 ; Shetty *et al.*, 2009). Ray *et al.* (2003) notent une transcription importante des *PR1*, *PR2* et *PR5*, après 12 h d'inoculation, chez les cultivars sensibles, et encore plus chez les cultivars tolérants. Cependant, Goodwin *et al.* (2007) n'ont pas détecté de différence dans la transcription de ces gènes après 6 jours post inoculation.

Malgré les réactions de défense de la plante, *Z. tritici* arrive à se développer au sein de son hôte et les symptômes finissent toujours par apparaître, mais avec une intensité qui varie en fonction des cultivars de blé. En effet, aucun cultivar totalement résistant à *Z. tritici* n'a été obtenu à ce jour.



### 3.1.3 La résistance génétique du blé contre *Z. tritici*

Chez les végétaux, la résistance est définie comme la capacité à prévenir ou empêcher la propagation d'un agent pathogène au sein des tissus. D'un point de vue génétique, il existe deux types de résistance : la résistance qualitative (spécifique) et la résistance quantitative (non-spécifique). Ces deux de types de résistance ont été mis en évidence chez le blé vis-à-vis de *Z. tritici*.

#### 3.1.3.1 La résistance qualitative

La résistance qualitative est contrôlée par des gènes qui régissent selon la relation gène pour gène de Flor (1971). Vingt et un gènes ont été découverts et cartographiés jusqu'à présent (Brown *et al.*, 2015). La plupart d'entre eux se sont révélés être spécifiques et sont efficaces seulement contre une minorité d'isolats de *Z. tritici* qui sont avirulents.

**Tableau 1.** Gènes impliqués dans la résistance qualitative du blé tendre contre la septoriose. Les stades de croissance du blé sont notés S pour plantule et A pour plante adulte (Brown *et al.*, 2015)

Gene	Chromosome	Associated markers (distance to gene)	Avirulent inoculum	Stage	Resistance source	Reference
Stb1	5BL	Xbarc74 (2.8cM), Xgwm335 (7.4cM)	IN95-Lafayette-1196-WW 1-4 & Purdue local (USA)	S, A	Bulgaria 88	Adhikari <i>et al.</i> (2004a)
Stb2	1BS	Xwmc406 (6cM), Xwmc230 (5cM)	Paskeville local (Australia) (and IPO92034)	A	Veranopolis	Liu <i>et al.</i> (2013)
Stb3	7AS	Xwmc83	Paskeville local isolate (Australia)	A	Israel 493	Goodwin and Thompson (2011)
Stb4	7DS	Xgwm111 (0.7cM)	IN95-Lafayette-1196-WW-1-4, I-89, IPBr1	S, A	Tadina	Adhikari <i>et al.</i> (2004c)
Stb5	7DS	Xgwm44 (7.2cM)	IPO94269	S, A	Synthetic 6x	Arraiano <i>et al.</i> (2001b)
Stb6	3AS	Xgwm369 (2cM)	IPO323	S, A	Flame, Hereward	Brading <i>et al.</i> (2002)
Stb7	4AL	Xwmc313 (0.3 to 0.5cM), Xwmc219 (1cM)	MG2 (Canada) (and IPO87019)	S	ST6	McCartney <i>et al.</i> (2003)
Stb8	7BL	Xgwm146 (3.5cM), Xgwm577 (5.3cM)	IN95-Lafayette-1196-WW 1-4	A	Synthetic W7984	Adhikari <i>et al.</i> (2003)
Stb9	2BL	Xfbb226 (3.6cM), Xwmc317, Xbarc0129	IPO89011	S	Courtot, Tonic	Chartrain <i>et al.</i> (2009)
Stb10	1Dc	Xgwm848	IPO94269 and ISR8036	S	Kavkaz-K4500	Chartrain <i>et al.</i> (2005c)
Stb11	1BS	Xbarc008 (1cM)	IPO90012	S	TE9111	Chartrain <i>et al.</i> (2005a)
Stb12	4AL	Xwmc219	ISR398 and ISR8036	S	Kavkaz-K4500	Chartrain <i>et al.</i> (2005c)
Stb13	7BL	Xwmc396 (7-9cM)	MG96-36, MG2 (Canada)	S	Salamouni	Cowling (2006)
Stb14	3BS	Xwmc500 (2cM), wmc632 (5cM)	MG2 (Canada)	S	Salamouni	Cowling (2006)
Stb15	6AS	Xpsr904 (14cM)	IPO88004	S	Arina, Riband	Arraiano <i>et al.</i> (2007b)
StbSm3	3AS	barc321 (1.9cM)	MG96-36, MG2 (Canada)	S	Salamouni	Cuthbert (2011)
Stb16q	3DL	Xgwm494 (4.3cM), Xbarc128 (9.9cM)	IPO88018 and IPO94218	S, A	SH M3	Tabib Ghaffary <i>et al.</i> (2012)
Stb17	5AL	Xthbg247 (3.1cM), Xgwm617 (38.3cM)	IPO88018	A	SH M3	Tabib Ghaffary <i>et al.</i> (2012)
Stb18	6DS	Xgpw5176, Xgpw3087	IPO323, IPO98022, IPO89011, IPO98046	S, A	Balance	Tabib Ghaffary <i>et al.</i> (2011)
StbWW	1BS	Xbarc119b (0.9-4.1cM)	79, 2, 1A	S	WW1842, WW2449, WW2451	Raman <i>et al.</i> (2009)
TmStb1	7A <sup>MS</sup>	Xbarc174 (23.5cM)	IPO323	S	MDR043 (T. monococcum)	Jing <i>et al.</i> (2008)

Les gènes *stb* connus ne sont actuellement pas efficaces contre les populations européennes de *Z. tritici* en Europe (Arraiano *et al.*, 2009). Par conséquent, la septoriose doit être contrôlée par la résistance quantitative, qui se révèle plus efficace au champ et plus durable.



### **3.1.3.2 La résistance quantitative**

La résistance quantitative est généralement contrôlée par des gènes avec des effets petits à modérés sur la septoriose. Ces gènes ont une spécificité généralement plus faible que les gènes conférant la résistance qualitative et fournissent une résistance plus durable. Cette résistance est contrôlée par des *quantitative trait loci* (QTL) associés à certains marqueurs (Eriksen et Munk, 2003 ; Chartrain *et al.*, 2004 ; Simón *et al.*, 2012). L'étude de Brown *et al.* (2015) met en lumière un total de 167 QTL détectés sur 19 populations de cartographie bi-parentale dont 7 d'entre elles possèdent 27 méta-QTL intégrant 105 QTL individuels (Goudemand *et al.*, 2013). Sur 89 régions identifiées (62 QTL et 27 méta-QTL), un total de 27 a été détecté au stade plantule, 48 au stade adulte et 14 aux deux stades. Deux QTL mineurs contrôlant la période de latence ont également été identifiés (Ghaffary *et al.*, 2011). Ces études montrent que tous les chromosomes, sauf le 5D, portent au moins un QTL ou méta-QTL pour la résistance à la septoriose.



### 3.2 POUVOIR PATHOGENE ET EFFECTEURS DE *Z. TRITICI*

Un total de 22 gènes codant pour des effecteurs a été identifié chez *Z. tritici* (tableau 2). Ces gènes codent souvent pour de petites protéines secrétées par la voie classique (réticulum endoplasmique et golgi avec un peptide signal) (Marshall *et al.*, 2011). Leur fonction est de permettre la colonisation du pathogène en interférant avec des réactions de défense de la plante qui pourraient empêcher la croissance du pathogène. Chez *Z. tritici*, le déploiement d'effecteurs est nécessaire pour la phase biotrophe (croissance asymptomatique) et pour la phase nécrotrophe (sporulation).

**Tableau 2.** Liste des gènes codant pour des effecteurs chez *Z. tritici* (modifié de Mirzadi Gohari, 2015)

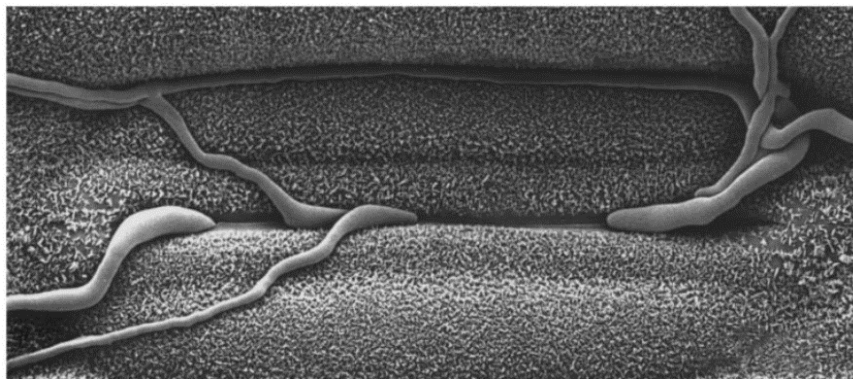
Gène	Catégorie	Référence
<i>MgAtr4</i>	ABC Transporter	Stergiopoulos <i>et al.</i> , 2003
<i>MgFus3</i>	Mitogen-activated protein kinase (MAPK)	Cousin <i>et al.</i> , 2006
<i>MgSlf2</i>	MAPK	Mehrabi <i>et al.</i> , 2006a
<i>MgHog1</i>	MAPK	Mehrabi <i>et al.</i> , 2006b
<i>MgSTE11</i>	MAPK kinase kinase	Kramer <i>et al.</i> , 2009
<i>MgSTE50</i>	Scaffold protein for MAPK signaling	Kramer <i>et al.</i> , 2009
<i>MgSTE12</i>	Transcription factor target of MAPK signaling	Kramer <i>et al.</i> , 2009
<i>MgSTE7</i>	MAPK kinase	Kramer <i>et al.</i> , 2009
<i>MgAlg2</i>	Protein N-Glycosylation	Motteram <i>et al.</i> , 2011
<i>MgGpa1</i>	G-protein alpha subunit	Mehrabi <i>et al.</i> , 2009
<i>MgGpa3</i>	G-protein alpha subunit	Mehrabi <i>et al.</i> , 2009
<i>MgGpb1</i>	G-protein alpha subunit	Mehrabi <i>et al.</i> , 2009
<i>MgTpk2</i>	Protein kinase A catalytic subunit	Mehrabi et Kema, 2006
<i>MgBcy1</i>	Protein kinase A regulatory subunit	Mehrabi et Kema, 2006
<i>Mg3LysM</i>	Chitin binding effector protein	Marshall <i>et al.</i> , 2011
<i>MCC1</i>	c-type cyclin	Choi et Goodwin, 2011
<i>ZtWor1</i>	Transcription factor	Mirzadi Gohari <i>et al.</i> , 2014
<i>Zt80707</i>	Unknown/Secreted	Poppe <i>et al.</i> , 2015
<i>Zt89160</i>	Unknown	Poppe <i>et al.</i> , 2015
<i>Zt103264</i>	Unknown	Poppe <i>et al.</i> , 2015
<i>ZtvelB</i>	Transcription factor	Tiley <i>et al.</i> , 2019



### 3.2.1 La phase biotrophe

Le cycle débute par la germination des spores de *Z. tritici* (pycnidiospores et/ou ascospores). En condition de forte humidité et à une température avoisinant les 18°C pendant 6 à 48 heures, la spore émet un tube germinatif (Chungu *et al.*, 2001). La capacité germinative des spores chez *Z. tritici* est estimée entre 85-90% en 24-26h en condition humide et à 22°C (Cohen et Eyal, 1993). La transition entre le tube germinatif et l'hyphe se fait grâce à la protéine de type MAPK MgHog1 qui est essentielle lors de l'infection. En effet, les mutants délétés de cette protéine sont incapables d'infecter les tissus foliaires (Mehrabi *et al.*, 2006).

La pénétration dans la feuille se fait, soit par le stomate, soit directement *via* la cuticule à l'aide de pseudo-appresoria et généralement au niveau des parois anticlinales (Duncan et Howard, 2000 ; Palmer et Skinner, 2002 ; Shetty *et al.*, 2003 ; Siah *et al.*, 2010). Cette pénétration est considérée comme aléatoire mais une étude suggère que les hyphes sont attirés par un signal thigmotropique (Duncan et Howard, 2000). Les travaux menés par Cousin *et al.* (2006) ont permis de caractériser une protéine de type MAPK nommée MgFus3 impliquée dans la reconnaissance du stomate. La suppression de cette protéine chez *Z. tritici* entraînerait une perte de reconnaissance des stomates et l'incapacité à coloniser le mésophylle de la plante.



**Figure 13.** Pénétration des tubes germinatifs de *Z. tritici* *via* l'ostiole d'un stomate après 24 heures post inoculation vue par cryo-microscopie électronique à balayage (Duncan et Howard, 2000)



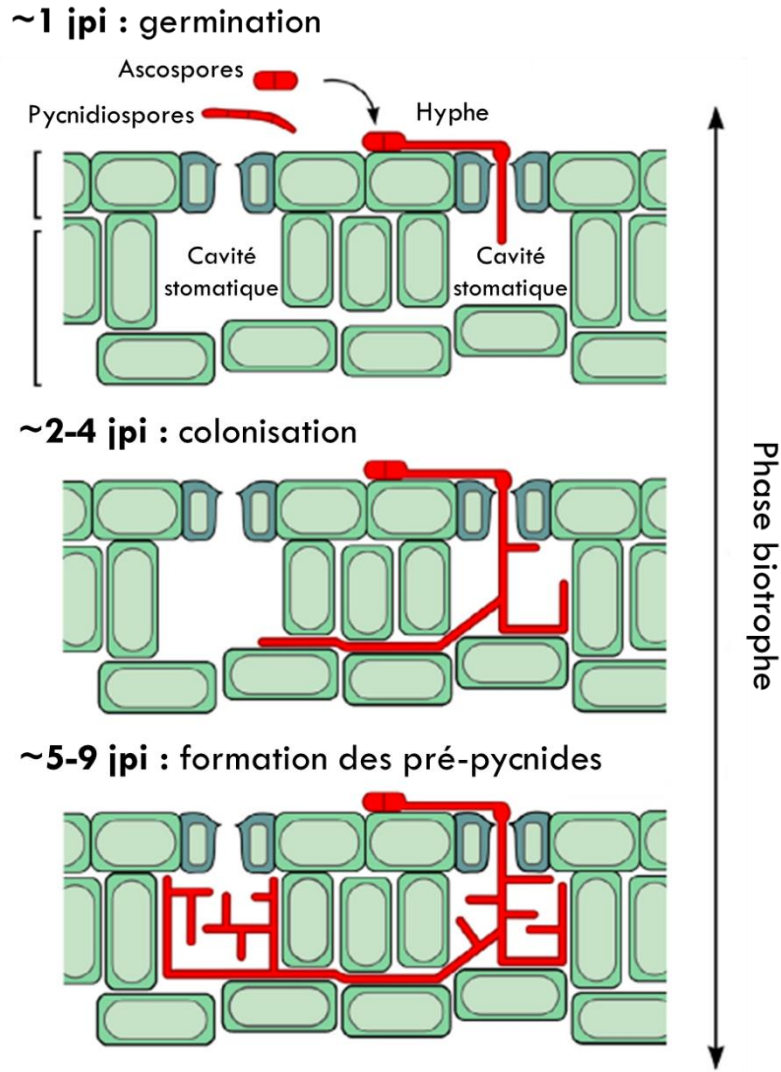


La phase biotrophe est asymptomatique et dure en moyenne deux semaines après inoculation (conditions de laboratoire) et peut aller jusqu'à 36 jours sur le terrain (Lee *et al.*, 2014). La nutrition du champignon se fait principalement par le biais de réserves lipidiques et d'acides gras (Rudd *et al.*, 2015) mais aussi via l'utilisation de protéines apoplasmiques ou d'amidon, composés libérés par les chloroplastes (Goodwin *et al.*, 2011). En effet, aucune structure spécialisée telle que les haustoria n'a été observée chez *Z. tritici* (Sánchez-Vallet *et al.*, 2015).

*Z. tritici* colonise les chambres sous-stomatiques et le mésophylle de la feuille en formant un réseau mycélien intercellulaire (Shetty *et al.*, 2003). Les hyphes demeurent exclusivement dans l'espace intercellulaire du tissu végétal et leurs croissances sont favorisées par de forts taux d'humidité et des températures comprises entre 15-25°C (Magboul *et al.*, 1992). Aucun signe d'infection n'est visible à la surface de la feuille malgré la présence de biomasse fongique, probablement en raison d'une quantité très faible voire quasi indétectable du champignon lors de la phase précoce de l'infection (Keon *et al.*, 2007). Il a été démontré qu'une protéine effectrice, Mg3LysM, a un rôle fondamental au début de la phase biotrophe, celle-ci fixant la chitine et empêchant l'activation de l'immunité de l'hôte.

Les récepteurs membranaires CERK1 ou CEBiP restent inactifs et aucune réponse de défense de la plante n'est alors déclenchée (Lee *et al.*, 2014). L'absence de réponse de défense protège ainsi le champignon des chitinases d'origine végétale (Lee, 2014 ; Marshall *et al.*, 2011). Des études d'expression de gènes ont montré que la transcription de Mg3LysM est très active entre 4 à 9 jours post-inoculation (jpi) puis chute drastiquement à partir de 14 jpi (Marshall *et al.*, 2011). *Z. tritici* se protège également des molécules de défense de la plante, comme les phytoalexines, grâce à des transporteurs d'efflux tel que Mgatr4, un transporteur membranaire appartenant à la superfamille des transporteurs *ATP-binding cassette* (ABC) (Stergiopoulos *et al.*, 2003 ; Kema *et al.*, 2008). Un autre effecteur, MgsIt2, possède un rôle au niveau de la ramification du mycélium, permettant une croissance invasive dans le tissu mésophyllien (Mehrabi *et al.*, 2009). La phase biotrophe correspond également à la formation des pré-pycnides au niveau de la cavité substomatique (Duncan et Howard, 2000).

De 10 à 14 jpi, un changement s'opère et le pathogène entame sa phase nécrotrophe. Bien que les mécanismes régissant la transition entre les deux phases restent encore méconnus, l'intervention de divers facteurs - tels que des déclencheurs moléculaires et environnementaux (lumière, disponibilité de l'eau, fluctuation de température), le génotype de la plante et la virulence de l'agent pathogène - est suggérée (McDonald *et al.*, 2015 ; Sánchez-Vallet *et al.*, 2015).



**Figure 14.** Colonisation d'une feuille de blé via les stomates durant la phase biotrophe de *Zymoseptoria tritici*. Après germination des ascospores et/ou des pycnidiospores, les hyphes pénètrent dans le mésophylle via les stomates. A partir de 5 à 9 jours post inoculation (jpi), la formation des pré-pycnides se fait dans la cavité stomatique colonisée. Les périodes des différentes phases résultent de la moyenne de plusieurs études (adapté de Steinberg et al., 2015)

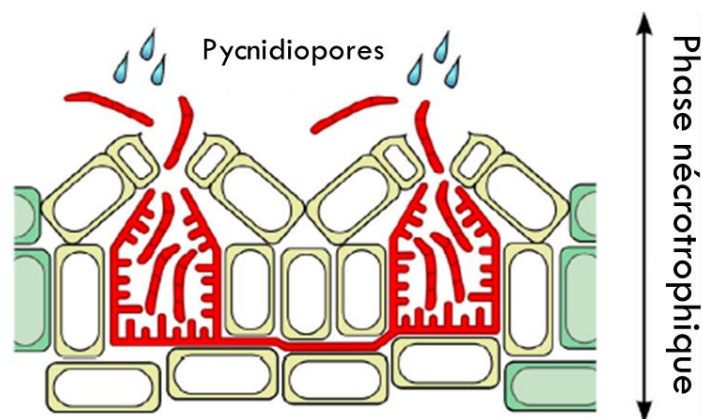


### 3.2.2 La phase nécrotrophe

Le passage à la phase nécrotrophe est caractérisé par un effondrement du mésophylle, libérant des nutriments comme des acides aminés ou des sucres dans l'apoplasme, permettant à *Z. tritici* d'augmenter significativement sa biomasse (Palmer & Skinner, 2002 ; Shetty *et al.*, 2007). Le champignon utilise une panoplie de mécanismes pour induire la nécrose, comme la production de protéines effectrices riches en cystéine et d'enzymes de dégradation des parois cellulaires du blé (CWDE) (Kema *et al.*, 1996 ; Siah *et al.*, 2010 ; Rudd *et al.*, 2015). Les CWDE regroupent trois catégories d'enzymes : des protéases, des xylanases et des glucanases. Une corrélation très forte entre l'activité endo- $\beta$ -1,4-xylanase et le pouvoir pathogène à 21 jpi pour 24 souches isolées sur le terrain et deux souches de référence (IPO323 et IPO94269) a été mise en évidence (Siah *et al.* 2010). Brunner *et al.* (2013) montrent également que 28 des 48 gènes codant pour des CWDE sont fortement exprimés pendant la phase nécrotrophe.

Les lésions typiques de la septoriose (chloroses puis nécroses) apparaissent au fur et à mesure de la maturation des pycnides (figure 15). L'apparition des nécroses serait potentiellement due à un facteur de virulence appelé *necrosis peptide 1* (NEP1) qui induit la mort cellulaire dans de nombreuses interactions hôte-pathogène (Gijzen et Nürnberger, 2006).

~10-21 jpi : maturation des pycnides



**Figure 15.** Phase nécrotrophe correspondant à la maturation des pycnides. Elle se situe entre 10-21 jours après inoculation (jpi). Les pycnidiospores produites se propagent grâce aux éclaboussures de pluie et infectent les étages foliaires supérieurs ainsi que les plantes voisines (adaptée de Steinberg, 2015).



À maturation, les pycnidiospores sont exsudées dans un cirrhe gélatineux à travers l'ostiole de la feuille en conditions de haute humidité. Elles sont dispersées par projection de gouttelettes de pluie (« *splashing* ») sur de courtes distances pouvant atteindre un mètre. Créant un nouvel inoculum (inoculum secondaire), ces pycnidiospores atteignent alors les étages foliaires supérieurs et contaminent les plantes voisines (Palmer & Skinner, 2002). Multifonction, la protéine MAPK MgFus3 possède un rôle dans l'apparition des pycnides ; les souches délétées du gène codant pour cette protéine sont, en effet, incapables de former de fructifications asexuées *in vitro* (Cousin *et al.*, 2006). Les sous-unités catalytiques et régulatrices de la protéine kinase A, appelées MgTpk2 et MgBcy1, sont également impliquées dans la formation des pycnides (Mehrabi et Kema, 2006).

La protéine Ztwor1 est impliquée dans la colonisation du mésophylle, la fructification asexuée de *Z. tritici* et potentiellement, la sécrétion de certaines « *small secreted proteins* » ou SPP (Gohari *et al.*, 2015). L'expression du gène codant pour cette protéine est particulièrement forte entre 2 et 16 jpi mais également à 20 jpi et, est corrélée à la formation des pycnides (Gohari *et al.*, 2015). De plus, une protéine de la famille des MAPK, appelée Mgstl2, a une importance dans la formation des pycnides (Mehrabi *et al.*, 2009). Récemment, le gène *velvet B* ou *ZtvelB*, a été identifié comme nécessaire à la croissance de type levure et à la sporulation asexuée chez *Z. tritici*. De plus, il possède un rôle dans la perception de la lumière et de la régulation du développement (Tiley *et al.*, 2019).

### 3.2.3 Implications d'effecteurs non identifiés

Grâce à l'avancée des technologies omics, des transcrits d'ARN provenant de la plante mais également de *Z. tritici* ont pu être détectés dans des tissus infectés (Rudd *et al.*, 2015). Cette étude a permis d'identifier entre 9 236 et 10 485 transcrits à différentes étapes du cycle infectieux (1, 4, 9, 14 et 21 jpi), et au total, 115 protéines putatives sécrétées ont été mises en évidence, dont l'expression est maximale à 9 jpi (moment correspondant à l'apparition des premières lésions nécrotiques). Pour déterminer le rôle de ces protéines, des analyses fonctionnelles ont été réalisées sur 5 d'entre elles, mais aucune souche mutée n'a montré une diminution de leur pouvoir pathogène ; probablement en raison de la redondance de fonctions des gènes codant des effecteurs (Rudd *et al.*, 2015).



La comparaison des études publiées pour comprendre le mécanisme d'action des effecteurs reste compliquée du fait que les cultivars de blé utilisés sont différents, et ce malgré l'utilisation commune d'une souche fongique de référence (IPO323). Ainsi, Yang *et al.* (2013) démontrent que l'effecteur *Mg3LysM* est très fortement exprimé à 13 jpi tandis que l'étude de Marshall *et al.* (2011) contredit ce fait en démontrant que le pic d'expression se situe entre 4 et 9 jours, avec une faible expression à 14 jpi. Cette contradiction suggère que le génotype de l'hôte ainsi que les conditions environnementales influeraient de manière indirecte l'expression génique du pathogène (Mc Donald *et al.*, 2015).

La reproduction sexuée intervient également comme source d'inoculum secondaire. Formé grâce à la recombinaison entre deux *mating-types* différents, les ascospores sont le produit d'un brassage génétique grâce aux recombinaisons génétiques et apporte un rôle dans l'adaptation du champignon vis-à-vis des fongicides ou des résistances variétales.



## 4 LUTTER CONTRE LA SEPTORIOSE

---

Dans le contexte de production agricole actuel, la lutte contre *Z. tritici* repose essentiellement sur l'utilisation de produits phytosanitaires. L'exploitation des ressources variétales n'offre cependant qu'une protection partielle car aucune variété n'est totalement résistante à la septoriose. En ce qui concerne les moyens de biocontrôle, un seul produit est homologué en France sur la septoriose du blé : le Vacciplant, un stimulateur des défenses naturelles des plantes. Toutefois, l'utilisation de ce produit par les producteurs est rare dans la mesure où les fongicides restent les produits possédant les meilleures efficacités pour lutter contre *Z. tritici*. Ce chapitre détaille les différents moyens de lutte contre cet agent pathogène : l'utilisation des leviers agronomiques (lutte prophylactique), l'usage de fongicides (lutte chimique) et les produits de lutte alternative : le biocontrôle.

### 4.1 LUTTE PROPHYLACTIQUE CONTRE LA SEPTORIOSE

#### 4.1.1 Les leviers agronomiques liés au travail du sol

Le travail du sol constitue un point clef dans la lutte contre les maladies du blé. Pour réduire les risques d'épidémie, il est conseillé d'effectuer des rotations de cultures et d'enfouir, grâce au labour, les résidus des cultures précédentes. Dans le cas de *Z. tritici*, les résidus représentent une source d'inoculum primaire d'une année sur l'autre en raison de la présence d'ascospores. L'importance de cette source a d'ailleurs été mise en corrélation avec la première vague épidémique dans l'étude de Suffert et Sache (2011). Utilisée pour augmenter les rendements de blé, la fertilisation azotée provoque une progression plus rapide de la maladie (Simon *et al.*, 2003), démontrant l'importance des apports azotés dans l'évolution de l'épidémie.



## 4.1.2 Les leviers agronomiques liés aux cultures

### 4.1.2.1 Date du semis

Trop tôt, les semis sont exposés aux températures douces favorisant leur croissance. Les jeunes pousses pouvant être contaminées par les ascospores, il est préférable de retarder le semis lorsque les risques sont moindres. Le pic de formation des ascospores se situant entre fin octobre et début novembre dans le Nord-Ouest de l'Europe (Suffert et Sache, 2011), il est alors plus judicieux de semer à cette période au risque de voir apparaître les premières lésions dès décembre. Cette démarche permet de limiter le risque d'une infection primaire, le blé n'étant alors que dans ses premiers stades de croissance.

### 4.1.2.2 Densité des semis

La densité des semis peut être déterminante dans l'épidémie. Une quantité importante de biomasse augmente le risque de propagation de l'épidémie causée par les pycnidiospores lors d'événements pluvieux ou de simple contact entre les feuilles (Eyal *et al.*, 1987 ; Ansar et Leitch, 2009). De plus, une densité trop forte favorise un maintien du taux d'humidité qui constitue également un terrain propice au développement du champignon.

### 4.1.2.3 Variétés tolérantes à la septoriose

Au cours des dernières décennies, les fongicides de synthèse permettaient de contenir efficacement la maladie (Fraaije *et al.*, 2012) ; la création de variétés tolérantes à la septoriose n'était alors pas la priorité des programmes variétaux. Récemment, les stratégies ont changé en raison de l'évolution de la résistance aux fongicides et de la réglementation européenne sur les produits phytopharmaceutiques (Directive 2009/128/CE et Règlement 1107/2009 ; Fraaije *et al.*, 2012).

L'emploi de variétés tolérantes à la septoriose s'est d'ores et déjà révélé efficace et permet un maintien du rendement malgré un taux de pression élevé (figure 16 ; Robin, 2013 ; Bataille *et al.*, 2017). En effet, une plante tolérante possède la capacité de prévenir ou d'empêcher l'infection et/ou la croissance d'un pathogène. Toutefois, aucune variété n'est totalement résistante face à la septoriose et leur utilisation nécessite de faire des compromis sur le rendement, celui-ci pouvant être amoindri (Mundt *et al.*, 1995). La tolérance du blé passe à la fois par les aspects morphologiques comme la hauteur de la tige qui semble être un frein dans la propagation (Fraaije *et al.*, 2002), mais aussi, en grande partie, par les gènes impliqués dans la résistance lors de l'interaction blé-*Z. tritici* (chapitre la résistance génétique du blé contre *Z. tritici*).



Sensibles	Moyennement sensibles		Peu sensibles	très peu sensibles
ALIXAN 4	GALACTIC 5	AIGLE 6	AMBOISE 6.5	AMBITION 7
PAKITO 4	OREGRAIN 5	ALBATOR 6	CELLULE 6.5	BOISSEAU 7
TRAPEZ 4	RUSTIC 5	AREZZO 6	COLLECTOR 6.5	CHEVIGNON 7
APACHE 4.5	SHERLOCK 5	ARMADA 6	DIDEROT 6.5	CONCRET 7
BERMUDE 4.5	SPONSOR 5	ATTRAKTION 6	FRUCTIDOR 6.5	FILON 7
MAORI 4.5	TERROIR 5	AUCKLAND 6	GRANAMAX 6.5	GEDSER (7)
SY MOISSON 4.5	ADVISOR 5.5	BAROK 6	GRAPELI 6.5	HYFI 7
(à confirmer)	ALLEZ Y 5.5	BOREGAR 6	JOHNSON 6.5	KWS EXTASE 7
	ARKEOS 5.5	COMPLICE 6	LEAR 6.5	MUTIC 7
	BERGAMO 5.5	CREEK 6	LG ALTAMONT 6.5	RGT CESARIO 7
	BIENFAIT 5.5	FLUOR 6	LG ANDROID 6.5	RONCARD 7
	CHEVRON 5.5	FOXYL 6	LUMINON 6.5	KWS DAKOTANA 7.5
	COSTELLO 5.5	GONCOURT 6	LYRIK 6.5	LG ABSALON 7.5
	DESCARTES 5.5	HYKING 6	MATHEO 6.5	SANREMO 7.5
	DIAMENTO 5.5	INTERET 6	OXEBO 6.5	
	EXPERT 5.5	JAIDOR 6	PASTORAL 6.5	
	HYCLICK 5.5	LAURIER 6	RGT CYSTEO 6.5	
	HYNVICTUS 5.5	LEANDRE 6	RGT GOLDENO 6.5	
	JOKER (5.5)	MORTIMER 6	RGT PULKO 6.5	
	NEMO 5.5	PALEDOR 6	RGT TALISKO 6.5	
	RGT KILIMANJARO 5.5	RGT CYCLO 6	SOKAL 6.5	
	RGT SACRAMENTO 5.5	RGT LIBRAVO 6	SYLLON 6.5	
	RGT TEKNO 5.5	RGT VOLUPTO 6	UNIK 6.5	
	RGT VENEZIO 5.5	SOPHIE CS 6		
	RUBISKO 5.5	SORTILEGE CS 6		
	SYSTEM 5.5	SOVERDO CS 6		
		TENOR 6		
		TRIOMPH 6		
		VYCKOR 6		

**Figure 16.** Classement des variétés en fonction de la tolérance à la septoriose, notée de 1 (variété sensible) à 9 (variété tolérante) de la saison 2017-2018. Les notes sont assignées en fonction des symptômes observés sur les feuilles de blé dans des parcelles non traitées par des fongicides (source : Arvalis-Institut du végétal).

Une des alternatives disponibles pour les agriculteurs est de mélanger plusieurs variétés au sein d'une même parcelle. Gigot *et al.* (2013) ont constaté que le mélange d'un cultivar sensible et un cultivar résistant d'un ratio respectif de 1:3 permet de réduire significativement les symptômes du cultivar sensible de 42% en 2008 et 41% en 2009. De plus, la culture d'une seule variété de blé permet de sélectionner les individus ayant réussi à contourner les composantes de la résistance variétale.

Malgré le respect de la lutte prophylactique, le contrôle de la septoriose peut s'avérer plus complexe et la mise en place d'une lutte chimique devient une nécessité.





## 4.2 LA LUTTE CHIMIQUE

Depuis les débuts de l'agriculture, les adventices, insectes et maladies des plantes sont des fléaux de toutes les cultures. A l'origine, hormis quelques mesures empiriques, aucun moyen de lutte n'était disponible pour s'opposer aux ravages occasionnés par ces bioagresseurs. Il faut remonter au premier siècle AJC, avec l'utilisation de l'arsenic contre les insectes recommandés par Pline l'Ancien, pour observer les prémices des moyens de lutte chimique actuels.

Impactant les rendements et la qualité des produits, certaines épidémies ont causé de forts impacts sociétaux comme la Grande Famine de 1845-1852 en Irlande due à une épidémie de mildiou de la pomme de terre. Causée par l'oomycète *Phytophthora infestans*, cette maladie a été introduite en 1844 par une cargaison américaine, contaminant les cultures du pays entier. Entre 600 000 et 1 000 000 personnes ont péri à la suite de la famine qu'a engendrée cette épidémie (Kinealy 1994 ; Zadock 2008). A la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, le développement de la chimie minérale a permis l'élaboration de fongicides de contact, offrant alors la possibilité de lutter contre ce type de pathogène. L'exemple le plus connu est la « bouillie bordelaise », un fongicide encore utilisé aujourd'hui contre un panel d'agents pathogènes (FRAC 2019).

Dans les années 1930-1940, le développement de la chimie organique (dithiocarbamate et phtalimide) a constitué une percée dans le domaine des fongicides. Ayant une activité protectrice, ces composés sont utilisés depuis plus de 40 ans à titre prophylactique et ont de nombreuses applications en raison de leur grande compatibilité avec les plantes et de leur large spectre de contrôle des maladies (FRAC). Le mode d'action de ces molécules est de type « multi-sites », c'est-à-dire qu'elles agissent sur plusieurs cibles cellulaires, assurant ainsi une protection préventive des plantes contre divers bio-agresseurs. L'utilisation de ces molécules a joué un rôle important dans l'intensification de l'agriculture moderne permettant l'obtention d'un rendement stable et de qualité.

Dès les années 1960, la découverte des fongicides dits systémiques constitue une avancée importante. Ces produits sont absorbés par la plante et redistribués à l'intérieur et à l'extérieur de celle-ci permettant de protéger les feuilles émergentes après traitement et les parties non atteintes par les pulvérisations. Ces molécules sont dites uni-sites car elles ont un mode d'action spécifique. Les premières molécules découvertes furent les oxathiines, les organophosphates, et les inhibiteurs de la biosynthèse des stérols (IBS). Elles se caractérisent par leur absorption par les feuilles, souvent aussi par les graines et les racines, et par leur transport ascendant (acropétale) dans la plante.

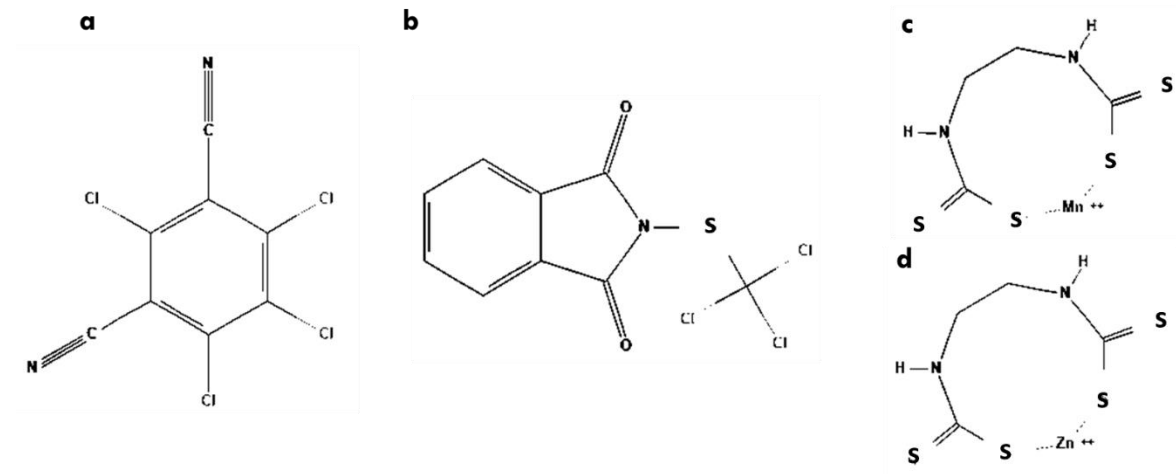


L'avantage des fongicides uni-sites est qu'ils permettent un meilleur contrôle du pathogène tout en utilisant une faible dose de produit par rapport aux multi-sites. De plus, leurs actions systémiques permettent de réduire le nombre d'applications par saison car le lessivage des produits par la pluie reste faible.

L'apparition des fongicides à base de benzimidazole a par la suite permis d'élargir le spectre d'utilisation des fongicides en protection des plantes (Büchel, 1986). Dans les années 1980, les nouvelles molécules à base de benzimidazole et d'IBS sont principalement des analogues des matières actives existantes avec des propriétés généralement similaires mais améliorées. Fin des années 1990, la famille des « quinone outside inhibitors » ou QoI, a été très vite inutile dans le contrôle de la septoriose à cause de l'apparition d'une mutation causant une résistance totale à ces fongicides. Dans les années 2010, une famille de molécules vient élargir le catalogue des composés uni-sites sur céréale : les inhibiteurs de la succinate déshydrogénases (SDHI). Adaptés à la lutte contre de nombreuses maladies des plantes, l'emploi des fongicides est efficace et peu coûteux (Russels, 2005). En 2015, le marché mondial des fongicides a été estimé à 12,1 milliards d'euros, dont 20 % sont destinés uniquement pour les céréales (FRAC 2019). Dans l'UE, 70% des fongicides utilisés sont destinés à lutter contre la septoriose (Fones et Gurr, 2015). Cet emploi massif cependant déclenche l'apparition d'un nouveau phénomène : la résistance aux fongicides. Cette dernière a abouti à l'inefficacité de plusieurs molécules et compromis l'utilisation de nombreuses molécules encore disponibles sur le marché.

#### **4.2.1 Les multi-sites : toujours efficaces**

Les premiers fongicides utilisés dans la lutte contre la septoriose sont des fongicides de contact comme le chlorothalonil, le folpet, le mancozèbe ou le soufre (figure 17 ; Leroux *et al.*, 2007). Ces molécules ont une utilité préventive en inhibant la germination des spores par blocage de plusieurs enzymes de la chaîne respiratoire (Brent et Hollomon, 2007, Fraaije *et al.*, 2007). Ne pénétrant pas dans la plante, elles sont facilement lessivées lors d'événements pluvieux et se retrouvent dans les sols et nappes phréatiques. Aucune résistance n'est recensée à ce jour dans le cas de la septoriose, ce qui fait de ces composés des atouts majeurs pour limiter la sélection des souches résistantes ou multi-résistantes en les associant à des fongicides uni-sites (Leroux *et al.*, 2007).



**Figure 17.** Formule chimique des fongicides à mode d'action multi-sites : le chlorothalonil (a), le folpet (b) et le mancozèbe (c et d). Source : Pubchem.

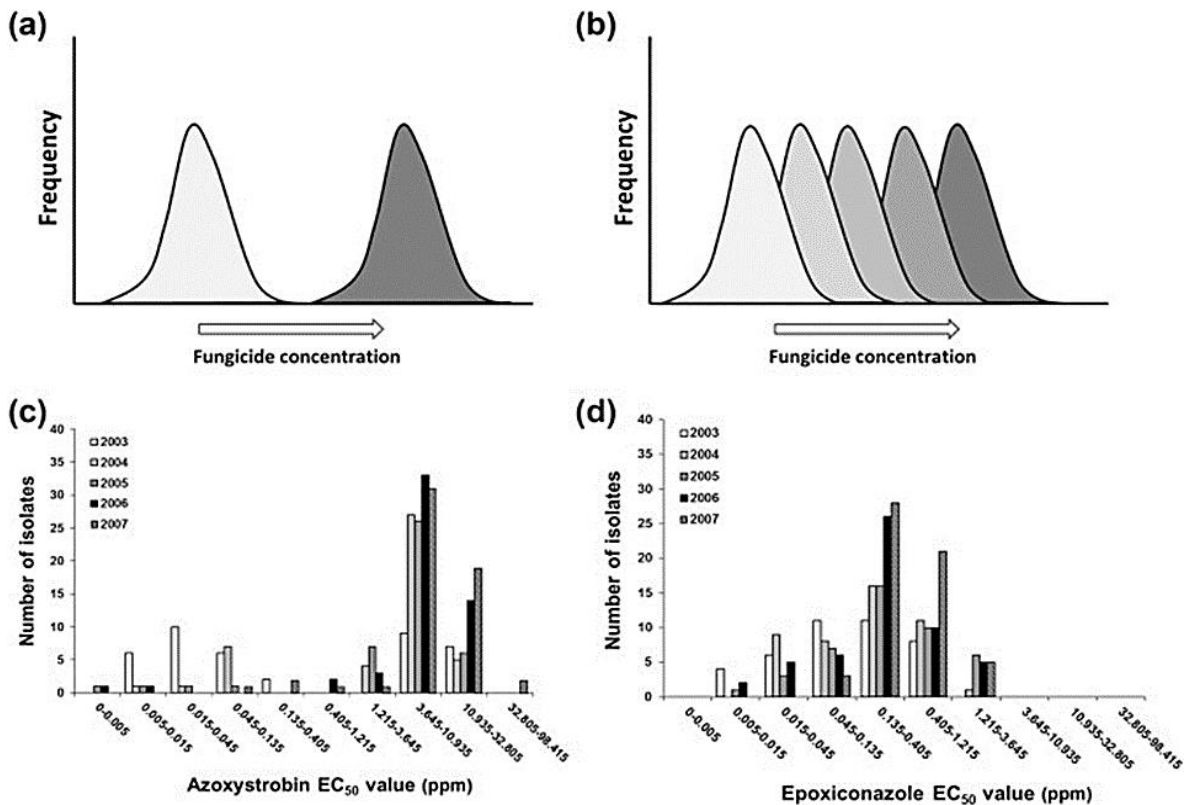
#### 4.2.2 Les uni-sites : une histoire de résistance

Les fongicides uni-sites se lient à des cibles enzymatiques spécifiques pour inhiber un processus cellulaire vital au champignon. Ces molécules ont une action préventive et curative et sont actuellement les plus utilisées sur le marché. Après application, les agents phytopathogènes meurent sans se reproduire, sauf pour les individus résistants. Le FRAC définit la résistance aux fongicides comme une réduction, héréditaire et acquise, de la sensibilité d'un champignon à un agent fongicide spécifique. Le résultat se traduit par une modification de la sensibilité du champignon au fongicide, généralement provoquée par la pression de sélection, due à l'exposition prolongée au traitement (FRAC).

Le terme de sélection sous-entend la présence d'individus naturellement résistants dans la population (Georgopoulos et Skylakakis, 1986). L'apparition de ceux-ci dépend non seulement du type de matière active mais également des déterminants génétiques. Le développement des résistances est un processus naturel évolutif ; mais peut être favorisé en condition de pression de sélection déclenchée par l'usage des fongicides. La fréquence d'individus résistants augmente alors en raison de la mort des individus sensibles. Chez *Z. tritici*, la reproduction étant très active (reproductions asexuée et sexuée), elle permet une augmentation significative de la population résistante ainsi qu'une dispersion efficace des individus résistants.



La sélection à une résistance peut se faire selon deux cas : la résistance bimodale et unimodale (figure 18). La résistance bimodale est définie comme une séparation entre une population sensible et une population présentant une résistance élevée, due à une mutation. La résistance unimodale est, quant à elle, caractérisée par une variation légère de la sensibilité mais qui évolue et progresse dans le temps. Cette augmentation progressive est le fruit de multiples changements génétiques impactant faiblement la résistance (Stergoupoulos *et al.*, 2001).



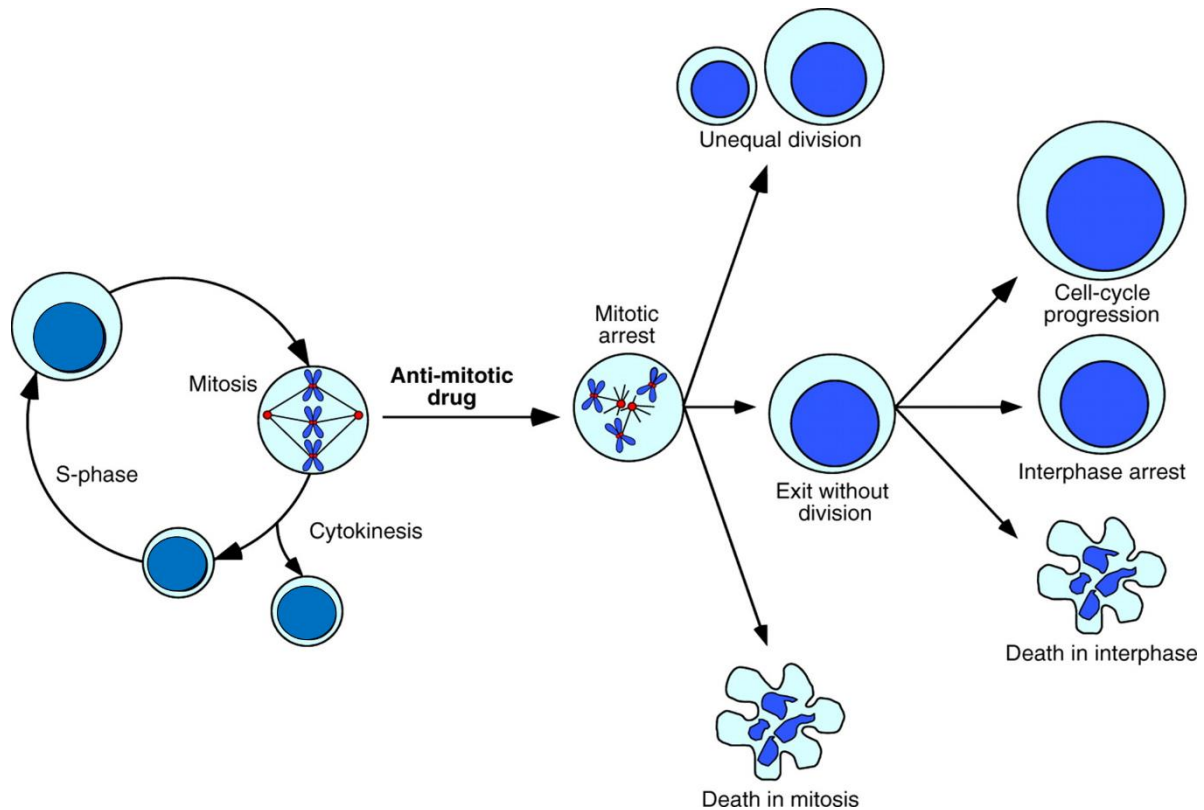
**Figure 18.** Distribution des deux types de résistance : bimodale (a) et unimodale (b) chez *Zymoseptoria tritici*. Chaque modèle est illustré par la distribution de la sensibilité de souches de *Z. tritici* isolées à Rothamsted de 2003 à 2007 pour (c) l'azoxystrobine (Qol) et (d) l'époxiconazole (IDM) (Lucas *et al.*, 2015).

Pour comprendre comment apparaissent ces résistances, il est nécessaire de caractériser les mécanismes de résistances développés par *Z. tritici*. Ces derniers seront détaillés ci-dessous, selon la famille de fongicides à laquelle ils sont associés.



#### 4.2.2.1 Les antimitotiques

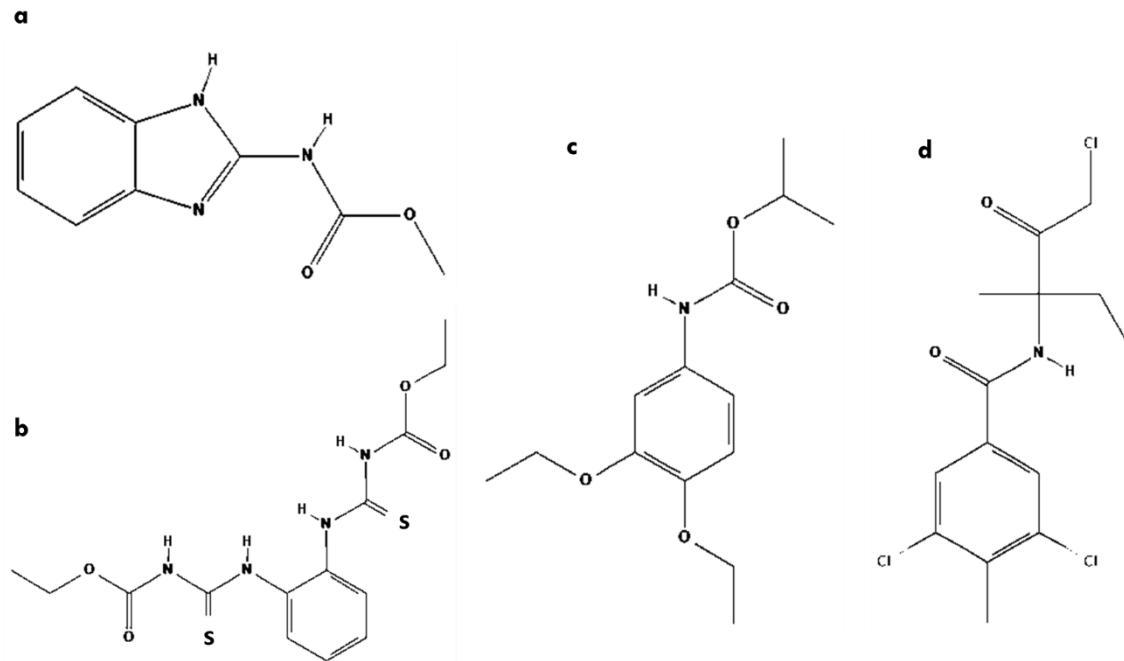
Premiers fongicides systémiques employés contre la septoriose, les antimitotiques agissent au cours de la multiplication cellulaire (figure 19). Ils bloquent la  $\beta$ -tubuline, empêchant ainsi la polymérisation des microtubules. La création des faisceaux mitotiques et le déplacement des chromosomes devient alors impossible. La croissance fongique, tout comme l'élongation du filament germinatif et l'expansion des hyphes mycéliens, sont ainsi stoppées (Leroux *et al.*, 2006).



**Figure 19.** Action des antimitotiques sur la division cellulaire. La présence d'une molécule antimitotique conduit à l'arrêt du processus de mitose dans les cellules en cours de division. Les cellules peuvent mourir ou se diviser inégalement pour produire des cellules filles aneuploïdes. Dans certains cas, les cellules peuvent sortir de division ; elles peuvent poursuivre leur cycle cellulaire, rester bloquées à l'interphase ou mourir (Gascoigne et Taylor, 2009).



Trois familles sont regroupées dans la catégorie des antimitotiques : les méthyles benzimidazole carbamates (MBC) ; comprenant les benzimidazoles (bénomyl, carbendazime, fubéridazole et thiabendazole) et les thiophanates (thiophanate et thiophanate-méthyle) ainsi que les N-phényl carbamates (diéthofencarbe) et les benzamides (zoxamide) (figure 20 ; FRAC).



**Figure 20.** Formule chimique des fongicides à mode d'action antimitotique. Le carbendazime (famille des benzimidazoles ; a), le thiophanate (famille des thiophanates ; b), le diéthofencarbe (famille des N-phényl carbamates ; c) et zoxamide (famille des benzamides ; d). Source : Pubchem.



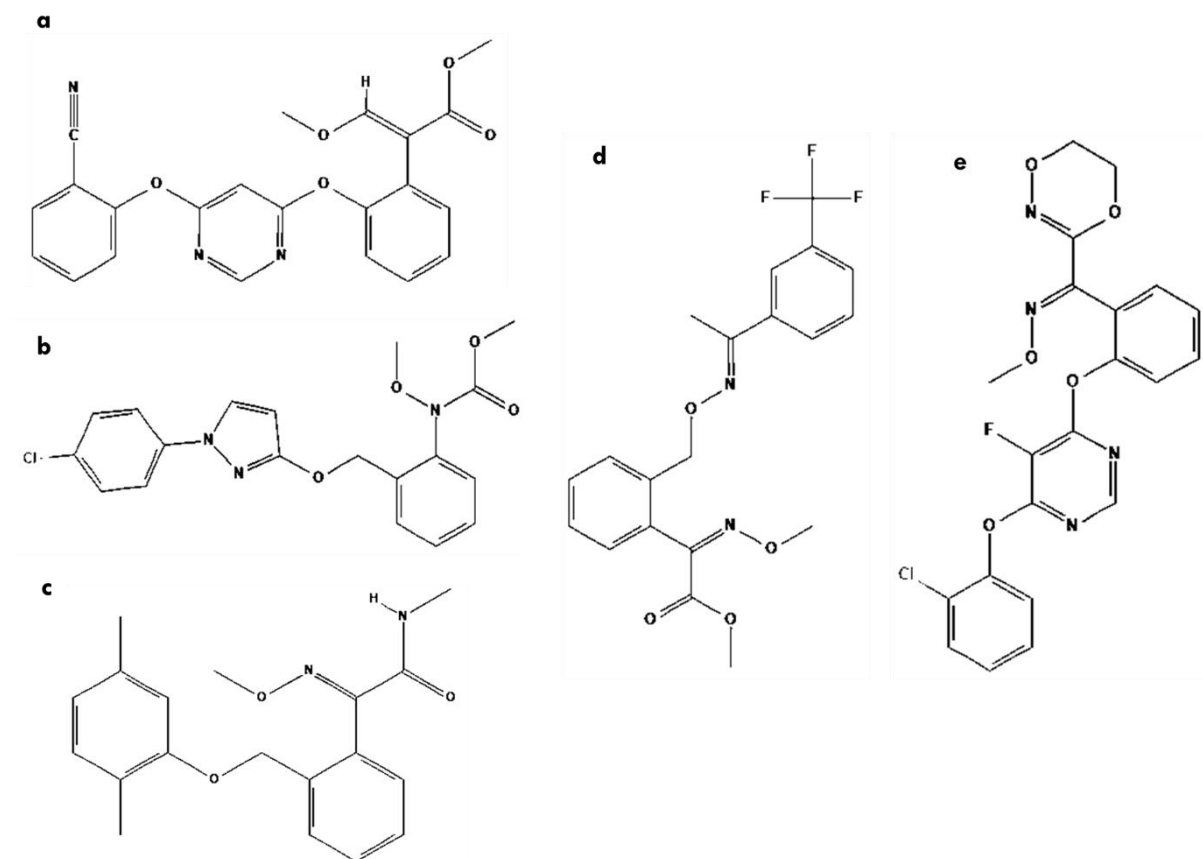
Destinés à la lutte contre une maladie du blé, le piétin-verse, les premières utilisations des MBC se font par pulvérisation foliaire en début d'infection et traitement des semences vers le milieu des années 1970 (Lucas *et al.* 2015). Ces traitements présentent également une bonne efficacité contre les septorioses (Cook *et al.*, 1999). Néanmoins, les premiers isolats résistants de *Z. tritici* sont détectés par Griffin and Fisher, dès 1984, lors du premier essai utilisant des MBC. Au total, 39% d'isolats anglais présentaient une résistance au bénomyl, ainsi qu'une résistance croisée positive avec le carbendazime, le thiabendazole et le thiophanate-méthyle, ont été détectés. Une mutation prédominante fut alors identifiée : le remplacement d'un glutamate par une alanine en position 198 (E198A) du gène codant pour la  $\beta$ -tubuline, cible des MBC (Lucas & Fraaije, 2008). Cette mutation, indétectable avant 1984, s'est trouvée maintenue au cours des années suivantes à une fréquence élevée, et ce même en absence de pression de sélection liée à l'utilisation de MBC. Cette persistance montre la stabilité de cette mutation et l'absence de *fitness cost* (Lucas *et al.*, 2015). En France, une étude réalisée sur des souches isolées entre 1988 et 2005 informe que plus de 50% des souches retrouvées sont résistantes au carbendazime sur 85% des parcelles étudiées. Une résistance croisée positive a été mise en évidence avec tous les autres benzimidazoles et thiophanates testés (Leroux *et al.*, 2007). D'autres mutations ont également émergé chez d'autres phytopathogènes, aux positions 50, 198, 200 et 240 de la  $\beta$ -tubuline et semblent conférer une certaine résistance au champ (Koenraad *et al.*, 1992 ; McKay *et al.*, 1998 ; Alvertini *et al.*, 1999).

Utilisées dans le monde entier, en mixture ou en rotation avec d'autres fongicides, l'utilisation de ces molécules représente 16% du marché global des fongicides en 2015 (FRAC 2019). Ces fongicides ne sont toutefois plus employés dans le cadre de la lutte contre la septoriose à cause de la généralisation de la résistance monogénique à ces composés (Fraaije *et al.*, 2007 ; Hawkins et Fraaije, 2016). De plus, ces molécules présentent de fortes persistances dans l'environnement comme le bénomyl, retiré du marché de l'UE en 2003 (directive européenne 2002/928/CE), dont la présence dans les eaux européennes a encore récemment été rapportée (Casado *et al.*, 2019).



#### 4.2.2.2 Les inhibiteurs externes de la quinone (Quinone outside Inhibitors, QoI)

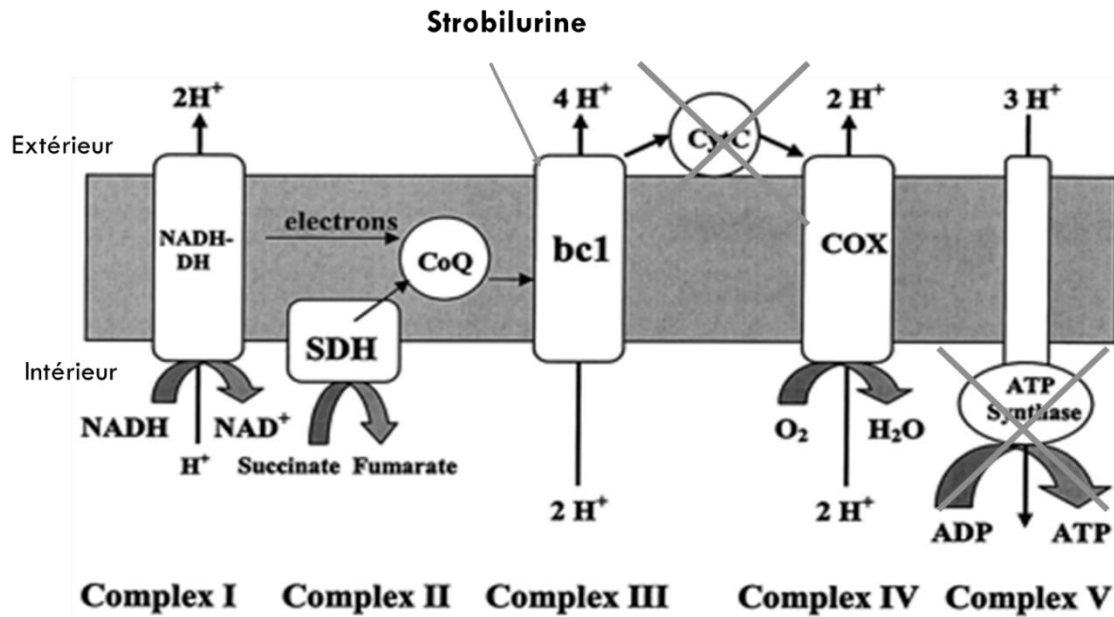
Introduits fin des années 1990, ces fongicides à large spectre permettent une lutte efficace contre la septoriose (Bayles, 1999). Cette famille est composée de molécules comme l'azoxystrobine, le pyraclostrobine, le trifloxystrobine, le dimoxystrobine et le fluoxystrobine (figure 21).



**Figure 21.** Formule chimique des inhibiteurs externes de la quinone (« *quinone outside inhibitor* » QoI) : l'azoxystrobine (a), le pyraclostrobine (b), le dimoxystrobine (c), le trifloxystrobine (d) et le fluoxystrobine (e). Source : Pubchem.

Ces fongicides inhibent le transfert d'électron entre le cytochrome *b* et le cytochrome *c1* au niveau du cytochrome *bc1*, ce qui empêche la formation du complexe mitochondriale III (figure 22 ; Bartlett *et al.*, 2002). Le blocage de la chaîne respiratoire conduit à l'inhibition de la synthèse d'ATP et à la mort cellulaire. Ces molécules ont une double action : préventive sur les semences (inhibition de la germination des spores) et préventive et curative sur la plante (inhibition de la croissance mycélienne).





**Figure 22.** Impact des inhibiteurs externes de la quinone (Qol) sur la chaîne de transport d'électrons des mitochondries. Les cinq complexes respiratoires sont représentés : la NADH-déshydrogénase (NADH-DH), la succinate déshydrogénase (SDH), le cytochrome *bc1* (*bc1*) et cytochrome oxydase (COX) et ATP synthase (complexe V). Les Qol bloquent le transfert d'électrons entre le cytochrome *b* et *c1* au niveau du complexe III, inhibant ainsi la production d'ATP. Modifié de Ritov *et al.* (2005).

Les Qol sont considérés comme pouvant entraîner un développement de résistances à risque modéré (FRAC) due à la cible (le cytochrome *b*) codée par la mitochondrie et non par le noyau (Lucas *et al.*, 2015). Cependant, les premiers signes de résistance chez certains agents pathogènes, comme *Blumeria graminis f. sp. tritici* (agents de l'oïdium) sont apparus après seulement 2 ans d'utilisation en Allemagne (Chin *et al.*, 2001). L'étude constate que 90% des isolats présentaient une résistance élevée et se propageaient dans d'autres pays comme la France, la Belgique, le Royaume Uni et le Danemark. Présentant le même *fitness* que les souches sensibles lors d'expérience de compétition, les souches résistantes peuvent être rapidement sélectionnées lors de traitements aux Qol (Chin *et al.*, 2001). L'émergence de cette résistance monogénique est due à un changement d'un seul acide aminé : une guanine en position 143 est remplacée par une alanine (G143A) dans le cytochrome *b* de la mitochondrie. Chez d'autres phytopathogènes comme chez *Mycosphaerella fijiensis* (Sierotzki *et al.*, 2000), *Plasmopara viticola* (Wong et Wilcox, 2000), *Venturia inaequalis* (Steinfeld *et al.*, 2001), *Alternaria solani* (Pasche *et al.*, 2002) et *Magnaporthe grisea* (Avila-Adame et Koller, 2003), des résistances ont



également pu être détectées. Le mécanisme identifié pour ces espèces est la substitution G143A (Gisi *et al.*, 2002).

Chez *Z. tritici*, les premiers isolats résistants ont été mis en évidence en 2001 au Royaume-Uni (Carisse, 2010). Présentes naturellement dans les champs non traités, les souches résistantes sont sélectionnées en présence de QoI. Leurs propagations se font par le biais des ascospores issues de la saison précédente (Carisse, 2010). Malgré les recommandations du FRAC, dans le but de ralentir le développement de la résistance via l'utilisation de mélanges de fongicides à différents modes d'action et la diminution de la fréquence de pulvérisation, la proportion de souches portant la mutation responsable de la résistance est rapidement passée de 12% à 87% dans les cultures de blé (Fraaije *et al.*, 2005).

La résistance s'est, par la suite, installée en France (Leroux *et al.*, 2006), mais également en Belgique (Amand *et al.*, 2003), en Irlande et en Allemagne (Torriani *et al.*, 2009). Le Nord de l'Europe est le plus touché par ce phénomène par rapport aux régions se situant au sud du continent, créant ainsi un gradient de résistance Nord-Sud (Torriani *et al.*, 2009). La présence de ce gradient visible en France a été identifiée en 2005 (Siah *et al.*, 2010). Sur une population de *Z. tritici* testée, 70% des isolats issus du nord sont résistants au QoI, contre 30% pour le centre et 0% pour le sud (Siah *et al.*, 2010). Cette distribution serait la cause de la forte pression fongicide exercée au nord comparé au sud (Torriani *et al.*, 2009). Des études récentes confirment cette répartition, avec une fréquence d'isolats résistants très faible en Italie (Battistini *et al.*, 2016) et inexistante en Tunisie (Boukef *et al.*, 2012 ; Stammler *et al.*, 2012). La résistance est actuellement bien implantée en Europe, surtout dans le nord de la France où 99,6 % des isolats de 2015 présentent la mutation G143A (Cheval *et al.*, 2016). Hors de l'Europe, des isolats résistants ont été détectés aux Etats-Unis (Estep *et al.*, 2013) en raison de l'emploi de ces fongicides. L'analyse de l'ADN mitochondriale chez des haplotypes informe que l'apparition de la mutation est intervenue à quatre reprises dans les populations européennes (Torriani *et al.*, 2009).

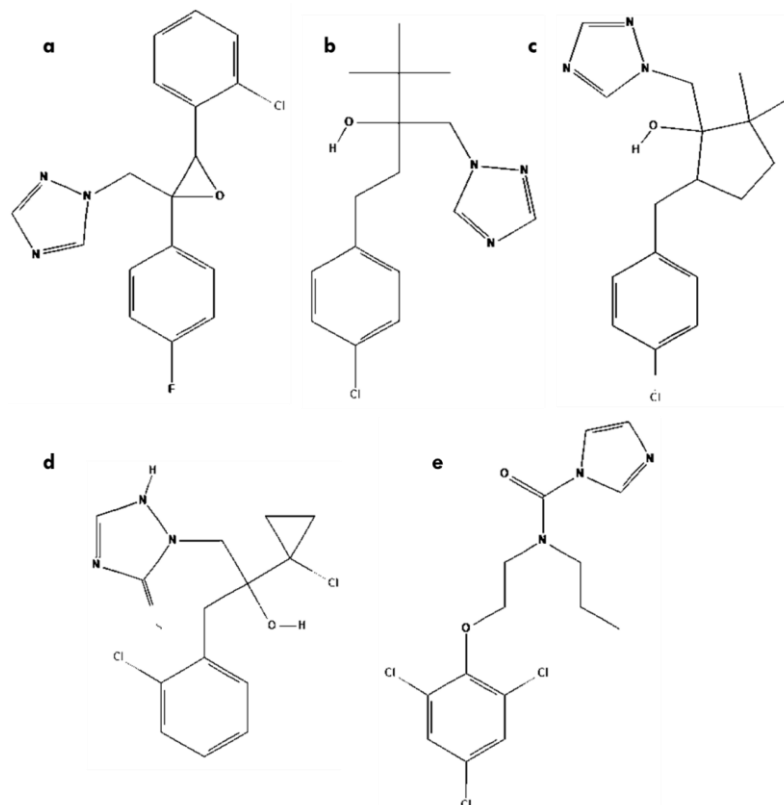
Plusieurs autres mutations ont été identifiées sur le cytochrome *b* comme S152G, F169L, I245V et V259A, mais sans impact sur la résistance (Fraaije *et al.*, 2005). Chez *Venturia inaequalis*, d'autres mécanismes détectés causent une réduction de l'efficacité des QoI, comme le développement d'un mécanisme de respiration alternatif (Wood et Hollomon, 2003). Chez *Z. tritici*, la résistance aux QoI est de type disruptif : les isolats résistants présentent de hauts niveaux de résistance, créant ainsi un écart important entre les souches sensibles et les souches résistantes (Brent et Hollomon, 2007).



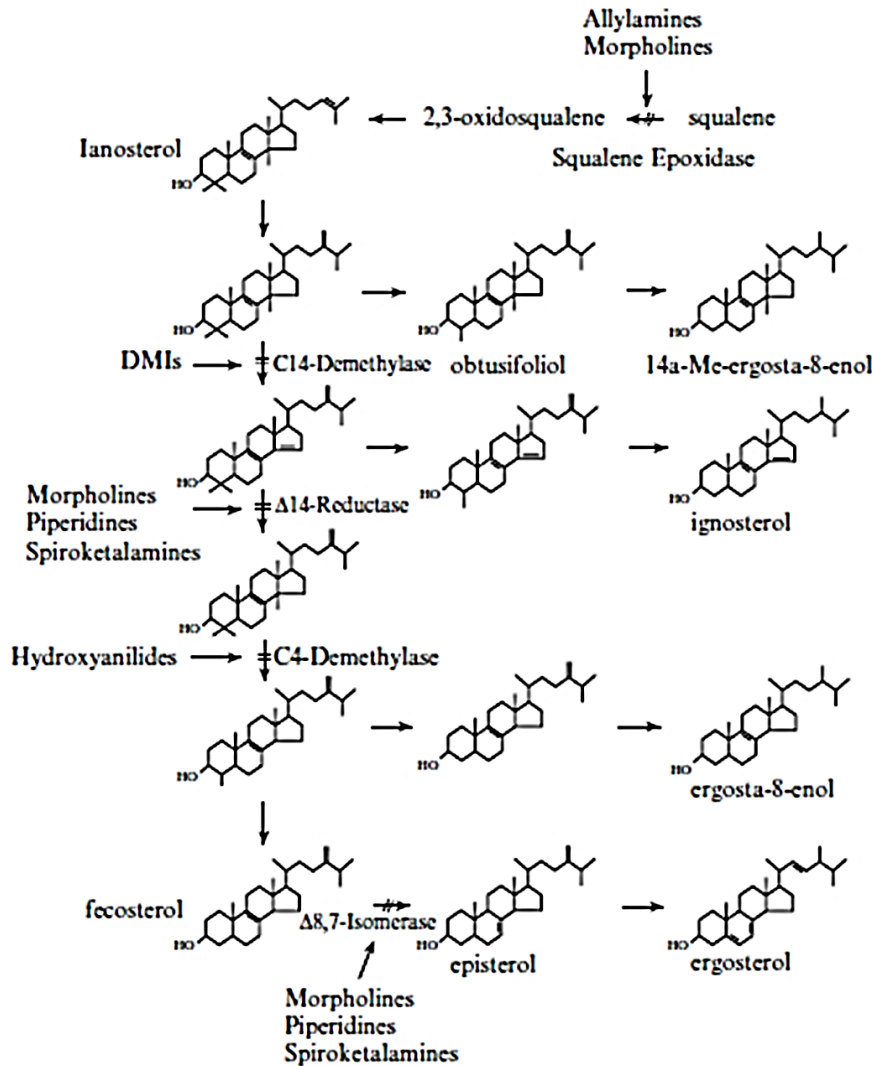
Due à la généralisation de ces fortes résistances pour les QoI chez *Z. tritici*, les traitements utilisés pour protéger les cultures de blé contre la septoriose reposent aujourd'hui sur l'emploi d'autres fongicides.

#### 4.2.2.3 Les inhibiteurs de la biosynthèse des stérols (IBS)

Introduit dans les années 70 avec l'imazadil (1973, traitement des semences) et le triaméfon (1973, traitement des céréales), puis largement utilisée depuis les années 80, cette famille de fongicides systémiques est majoritairement utilisée dans la lutte contre la septoriose (Parker, 2014). Visant à inhiber la biosynthèse des stérols, molécules fongiques essentielles à la stabilité des membranes, les IBS inhibent la germination des spores et la croissance mycélienne (Cools *et al.*, 2010). Cet important groupe de molécules est composé de 4 classes selon leur enzyme cible : les inhibiteurs de la 14 $\alpha$ -déméthylation (IDM) inhibant la 14 $\alpha$ -déméthylase, les morpholines inhibant la  $\Delta^{1,4}$ -réductase et la  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -isomérase (classe II), les hydroxyanilides inhibant la 3-kéto-réductase (classe III) et les thiocarbamates et les allylamines inhibant la squalene époxydase (classe IV) (figure 23).



**Figure 23.** Formule chimique des fongicides inhibiteurs de la 14-alpha déméthylase (IDM) : l'époxiconazole (a), le tébuconazole (b), le metconazole (c), le prothioconazole (d) et le prochloraz (e). Source : Pubchem.

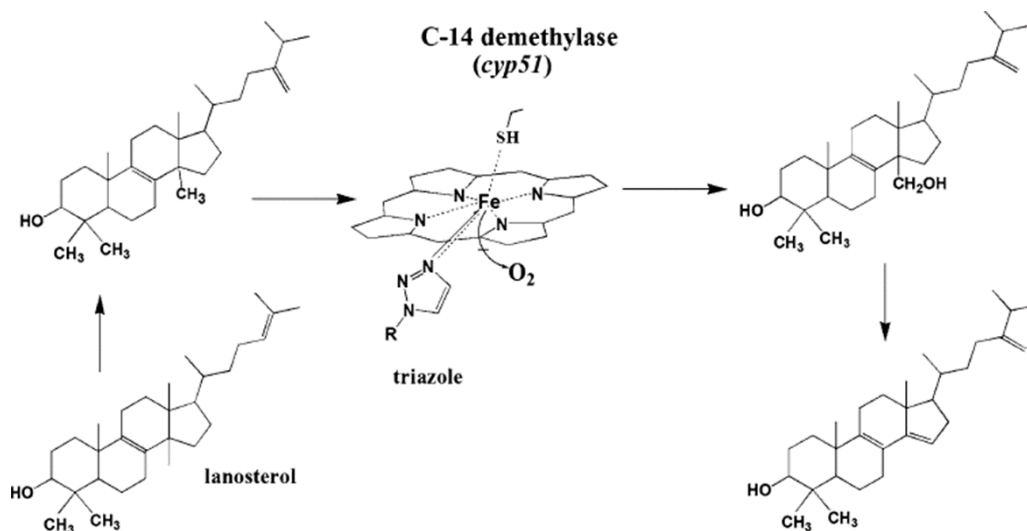


**Figure 24.** Mode d'action des inhibiteurs de la biosynthèse des azoles. Adapté de Ziogas et Markoglou (2010).

Parmi ces classes, les substances les plus actives et leader du marché des fongicides appartiennent à la catégorie des IDM (28% en 2015, FRAC 2019). Elles comprennent les triazoles (par exemple : l'époxiconazole, le tébuconazole ou le metconazole), les imidazoles (par exemple, le prochloraz) et un dérivé de triazolinthione, le prothioconazole introduit plus tard sur le marché (Leroux et Walker, 2011 ; Price *et al.*, 2015). Les IDM inhibent spécifiquement la 14 $\alpha$  déméthylase (CYP51), une enzyme régulatrice du cytochrome P450 impliquée dans la synthèse de l'ergostérol (Leroux et Walker, 2011 ; Parker *et al.*, 2011). Située dans la membrane externe du réticulum endoplasmique, la CYP51 catalyse l'élimination du groupement méthyle du carbone 14 du lanostérol. Les triazoles se lient par une coordination directe de l'azote en position 4 ou en position 3 s'il s'agit d'un imidazole, occupant la place du 6<sup>ème</sup> ligand de l'hème ferrique du site catalytique (figure 25 ; Jefcoate 1978).



Le complexe enzyme-azole résultant ne peut catalyser la déméthylation du lanostérol et de l'éburicol, ce qui conduit à l'inhibition de la synthèse de l'ergostérol. Sans ce composé, le champignon ne peut maintenir la fluidité et la perméabilité, nécessaires au bon fonctionnement des membranes cellulaires. La spécificité des composés azoles dépend de l'interaction entre les groupes latéraux des composés azole-CYP51. Le complexe azole-CYP51 n'étant pas compétitif, la réaction pourrait également conduire à l'accumulation de stérols 14-méthylés qui perturbent les transports actifs membranaires (Marichal *et al.*, 1999). Toutefois, ce dernier mécanisme n'a été démontré que chez des champignons pathogènes de l'homme, comme *Candida albicans* ou *Candida glabrata* (Price *et al.*, 2015). Dernièrement, l'utilisation massive de ces composés due à leur large spectre d'action a conduit à l'apparition de souches manifestant une sensibilité réduite à certaines molécules.



**Figure 25.** Réaction de déméthylation par la CYP51 et son inhibition par les IDM (Ziogas et Malandrakis, 2015).

Les azoles sont utilisés pour lutter contre de nombreux phytopathogènes du blé, dont *Oculimacula yallundae* (piétin-verse), *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici* (oidium), *Puccinia triticina* (rouille brune), *Pyrenophora tritici-repentis* (helminthosporiose du blé), *Fusarium* sp. (fusariose) et *Z. tritici*. Aujourd'hui, la plupart des stratégies de lutte en Europe reposent sur l'efficacité des IDM, qui représentent encore environ 50 % des intrants fongicides dans la production européenne de blé (McDougall, 2015). Malgré l'introduction progressive de triazoles plus récents comme le prothioconazole qui sont plus actifs, l'efficacité des azoles est de plus en plus comprise.



Jorgensen *et al.* (2018) ont réalisé 26 essais en Europe pour déterminer l'efficacité des quatre fongicides les plus utilisés : l'époxiconazole, le tébuconazole, le metconazole et le prothioconazole. Les données collectées pour les années 2015 et 2016 montrent que ces IDM dispensés à pleine dose fournissent un contrôle significatif de la septoriose allant de 50 à 70%. Cependant, une baisse d'efficacité entre les deux années été observée et les mélanges entre IDM sont préconisés. En effet, les essais réalisés ont montré un effet protecteur (5 à 15% d'efficacité en plus) avec les co-formulations prothioconazole-époxiconazole. Blake *et al.* (2018) aboutissent à la même conclusion sur les mélanges d'IDM au Royaume-Uni et en Irlande. De même, une étude irlandaise (Dooley *et al.*, 2016a) a montré que le mélange époxiconazole-metconazole contrôle la septoriose plus efficacement que les azoles utilisés seuls. Toutefois, l'efficacité varie selon les pays en fonction des niveaux de sensibilités présents dans les différentes populations de *Z. tritici*. L'inconvénient des co-formulations pourrait être la sélection de combinaisons de altérations CYP51, ce qui complexifierait grandement la gestion de la maladie. Malgré cette inquiétude, aucune donnée n'informe sur l'efficacité à long terme des mélanges d'IDM.

Contrairement aux familles de fongicides uni-sites précédemment citées, la résistance aux azoles n'est pas totale, mais progressive. En effet, c'est une résistance de type unimodale, due à l'association de différents mécanismes qui contribuent au phénotype final (Fraaije *et al.*, 2007 ; Cools *et al.*, 2013). Il existe trois principaux mécanismes de résistance : mutations ponctuelles dans le gène codant l'enzyme CYP51, la surexpression de *cyp51* et la surexpression de gènes codant pour des protéines de pompes à efflux.

#### 4.2.2.3.1 Mutations

Mécanisme le plus présent sur le terrain, la présence de mutations ponctuelles portées par le gène entraîne des modifications d'un ou plusieurs acides aminés lors de sa traduction en protéine. Ils provoquent des changements dans l'affinité des fongicides avec l'enzyme, conduisant à une diminution de la sensibilité aux azoles. L'apparition de résistances aux azoles est très probablement apparue au Nord-Ouest de l'Europe et s'est propagée, via les ascospores, peu à peu vers l'Est (Brunner *et al.*, 2008). La recombinaison des souches mutantes couplée à la pression fongicide conduit à l'émergence de génotypes combinant plusieurs altérations ainsi qu'à la diminution de la sensibilité aux azoles. En 2013, *Z. tritici* dénombre pas moins de 30 altérations dont 12 apparues en raison de l'utilisation intensive des azoles depuis 1980 (tableau 3 ; Cools et Fraaije 2013 ; Huf *et al.*, 2018). La littérature comptabilise jusqu'à 8 altérations possibles pour un seul haplotype (Parker, 2014).



Les altérations seules peuvent avoir un effet létal et doivent obligatoirement exister avec une autre mutation pour que la fonction de l'enzyme soit maintenue. C'est le cas pour la mutation I381V qui, introduite seule lors d'une étude de complémentation chez *Saccharomyces cerevisiae*, conduit à la mort cellulaire. Seule l'introduction de la double mutation I381V-Y461H permet la survie et redonne une fonctionnalité partielle de CYP51 (Cools *et al.* 2010). Néanmoins, ce genre d'associations d'altérations ne permet pas de déterminer clairement l'impact individuel des mutations sur la sensibilité aux IDM ; seules des tendances sont observables. Des altérations occupant les positions 459-461 confèrent par exemple une forte résistance à de nombreux azoles, mais sont également nécessaires à la viabilité de la protéine si les mutations I381V ou V136A sont présentes (Cools *et al.*, 2010). Cependant, l'accumulation séquentielle d'altérations au sein de l'enzyme mène à des isolats présentant de fortes résistances pour une gamme variée d'azoles, due à la pression exercée de l'adaptation des programmes fongicides (Cools *et al.*, 2013). Toutefois, grâce à des analyses *in vitro* et de complémentation chez la levure, des mutations clés ont été corrélées à des phénotypes de résistance ou des sensibilités amoindries pour certaines matières actives ; c'est le cas des altérations V136A, I381V, la double délétion Y459/G460 ou des mutations ponctuelles situées entre les positions 459 et 461 (Leroux *et al.*, 2007, Mullins *et al.*, 2011 et Cools *et al.*, 2013). Au cours des 15 dernières années, de nombreuses altérations de CYP51 ont émergé et ont été documentées (tableau 3, Cools et Fraaije, 2013). Les altérations se produisent en combinaisons et influent sur la sensibilité de certains IDM.



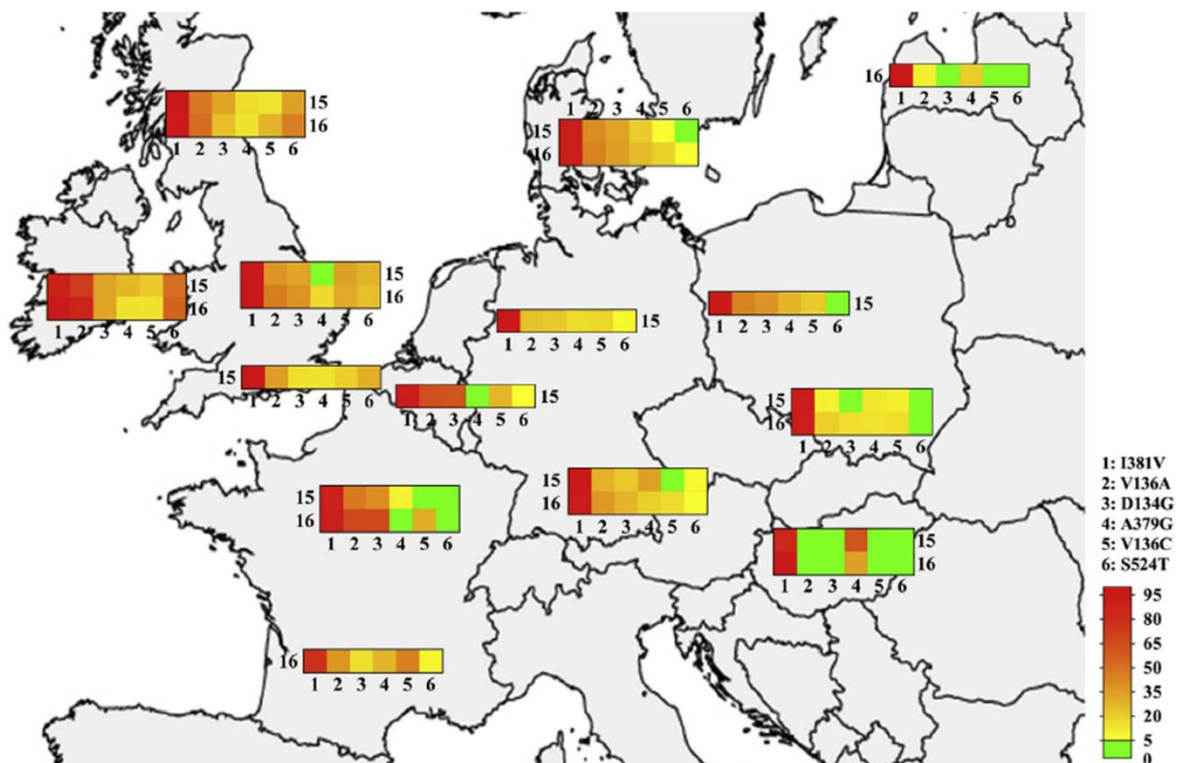
**Tableau 3.** Altérations de la 14-alpha-déméthylase reportées dans la littérature chez *Z. tritici*. Adapté de Cools *et al.* (2013).

Altérations CYP51	Détails
L50S	Mutation commune dans les populations européennes. Sans effet sur la résistance.
D107V	Rare, identifiée seule ou en combinaison dans des isolats résistants.
D134G	Commune. Identifiée en combinaison avec Y459-Y461.
V136A	Détectée en 2003, elle est présente en combinaison avec Y459-Y46. Commune.
V136C	Commune. Identifiée dans les isolats résistants avec les altérations Y459-Y461.
V136G	Mutation rare détectée en combinaison avec D134G.
Y137F	Identifiée seule ou en combinaison avec S524T, elle est néanmoins rare.
M145L	Rare identifiée comme mutation unique dans un isolat français très résistant.
N178S	Identifiée en combinaison avec L50S et S188N dans une souche isolée sur blé dur.
S188N	Commune, sans effet sur la sensibilité aux azoles.
S208T	Mutation rare identifiée en combinaison dans des isolats sensibles et résistants.
N284H	Mutation rare présente dans des isolats sensibles et résistants en combinaison.
H303Y	Rare, détectée avec 6 altérations dans des isolats résistants au Royaume-Uni.
A311G	Mutation rare combinée avec L50S, Y461S et V490L.
G312A	Mutation rare combinée avec d'autres altérations.
A379G	Commune, identifié dans les isolats résistants toujours en association avec I381V.
I381V	Commune, identifiée dans des isolats résistants avec les altérations Y459-Y461.
A410T	Mutation rare combinée avec d'autres altérations.
G412A	Mutation rare combinée avec d'autres altérations.
Y459C	Mutation rare seule ou combinée avec d'autres altérations.
Y459D	Mutation commune détectée seule ou en combinaison dans des isolats résistants.
Y459N	Mutation rare combinée avec d'autres altérations.
Y459P	Mutation rare combinée avec d'autres altérations dans des isolats résistants.
Y459S	Rare, présente dans des isolats résistants.
G460D	Mutation rare combinée avec d'autres altérations dans des isolats résistants.
Y461D	Mutation rare combinée avec d'autres altérations dans des isolats résistants.
Y461H	Commune, identifiée en combinaison dans des isolats résistants.
Y461S	Très commune dans les populations irlandaises, présente dans des isolats résistants.
$\Delta$ Y459, $\Delta$ G460	Très rare, présente dans des isolats allemands.
$\Delta$ Y459/G460	Très commune, cette altération est présente dans les isolats résistants.
V490L	Mutation rare combinée avec L50S, A311G et Y461S.
G510C	Présente dans des isolats français sensibles et résistants, rare.
N513K	Commune, sans effet sur la sensibilité aux azoles.
S524T	Commune. Identifiée dans des isolats résistants en combinaison.





Jorgensen *et al.* (2018) ont récemment mené une étude sur la répartition européenne de 6 mutations impliquées dans la résistance aux IDM : I381V, V136A, D134G, A379G, V136C et S524T. Une variabilité majeure au niveau des altérations CYP51 a été identifiée parmi les différentes populations de *Z. tritici* (figure 26). Cette différence résulte d'une grande variation dans la pression de la maladie et la diversité des programmes fongicides. Les taux de mutations sont élevés, notamment dans les régions situées au Nord-Ouest et Sud-Est. Brunner *et al.* (2008) ont supposé qu'une apparition des mutations au niveau du Royaume-Uni ou au Danemark se serait propagé vers l'est par le vent, d'où la présence d'un gradient à travers l'Europe, et ce malgré la variabilité des mutations. L'Irlande et le Royaume-Uni se démarquent de la tendance européenne avec une fréquence élevée concernant la mutation S524T. Associée avec d'autres mutations comme V147F ou V126A, celle-ci diminuerait la sensibilité au prothioconazole et à l'époxiconazole (Fraaije *et al.*, 2007 ; Leroux et Walker, 2011). La France, la Belgique et l'Irlande présentent des proportions élevées concernant les mutations I381V, D134G et V136A. La Hongrie se distingue des autres pays par le fait que seules deux mutations sur six sont recensées (I381V et A379G) dans les populations, probablement en raison d'une faible pression fongicide exercée.

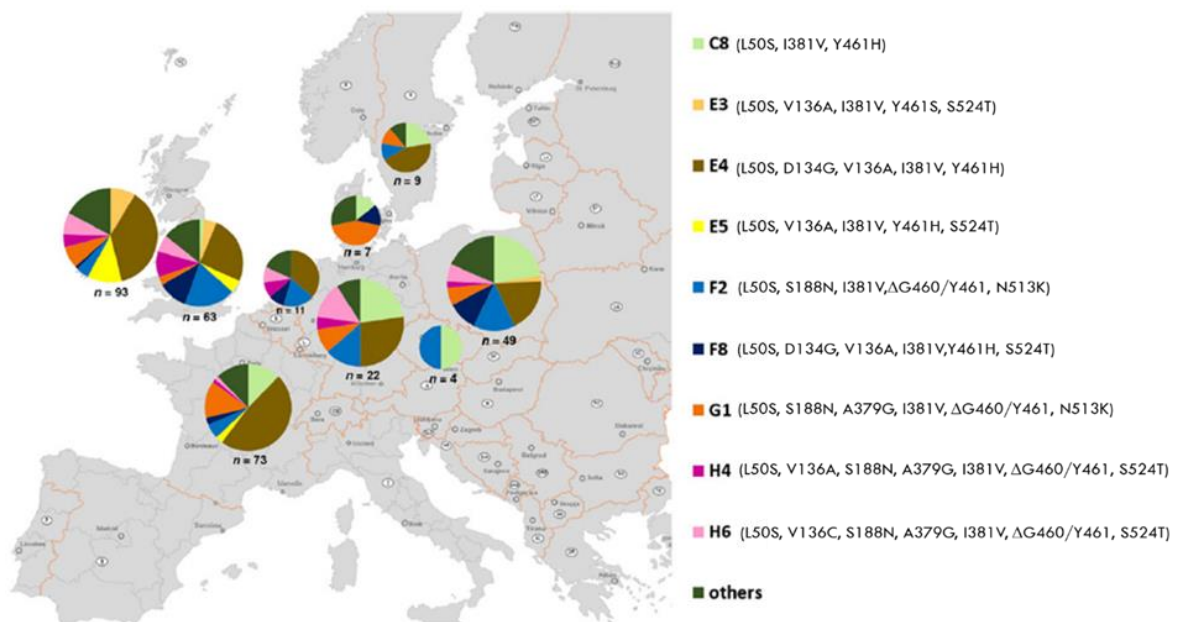


**Figure 26.** Fréquence (%) de six principales altérations de CYP51 en Europe durant les années 2015 et 2016. Les fréquences sont exprimées sous forme de heatmap : vert correspond à un intervalle 0-4%, jaune-orange : 5-50% et orange-rouge pour 51-100% (Jorgensen *et al.* 2018).



Le processus dynamique de la sélection de la résistance aux IDM dépend de matières actives utilisées. L'exemple le plus parlant pour *Z. tritici* est l'usage du triadiménol, associé à la mutation Y137F (Leroux *et al.*, 2007). Appartenant à la première génération des IDM, cet azole est désormais peu présent sur le marché, entraînant, de ce fait, une rare fréquence de cette mutation dans les populations actuelles. L'introduction du prothioconazole couplé à l'époxiconazole coïncide également avec l'émergence de nouveaux haplotypes incluant la mutation S524T (Cools *et al.*, 2011). Ces changements temporels montrent que les populations de *Z. tritici* s'adaptent continuellement à l'évolution des fongicides utilisés.

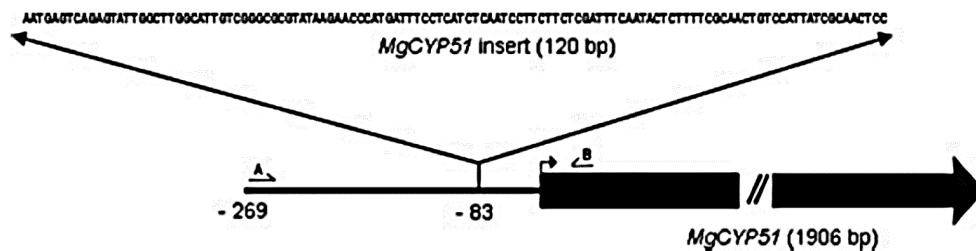
Grâce à un séquençage entier du gène *cyp51* chez des haplotypes européens, Huf *et al.* (2018) révèlent la présence de 33 haplotypes dont neuf sont présents dans 85% de la population (figure 27). Ces derniers semblent présents de façon hétérogène, due à des différences dans la pression de la maladie et à l'utilisation des fongicides (nombre d'applications et doses appliquées) dans les différents pays étudiés. La mutation S524T reflète bien ces observations. En effet, celle-ci est très présente en Irlande et au Royaume-Uni (50% de la population en 2016) mais reste très peu présente dans les autres pays européens (Huf *et al.*, 2018).



**Figure 27.** Distribution et fréquence en Europe des neuf haplotypes de CYP51 les plus présents en 2016. Le nombre d'haplotypes analysé est indiqué pour chaque pays (n). Les séquences de CYP51 pour chaque haplotype sont indiquées (modifié de Huf *et al.*, 2018)

4.2.2.3.2 Surexpression de *cyp51*

En 2012, Cools *et al.* ont identifié une différence de sensibilité *in vitro* chez des isolats possédant les mêmes altérations portées par CYP51 (L50S, S188N, I381V, ΔY459/G460, N513K). Ces isolats présentent une sensibilité à tous les azoles testés réduite de 7 à 16 fois. De plus, la surexpression de *cyp51* est constatée entre 10 et 40 fois supérieures à l'isolat sensible de référence IPO323. Cette expression est due à la présence d'un insert de 120 paires de base (figure 28). Malgré l'identification de ce mécanisme, trois études relatent sa présence en Europe et ceux pour le même haplotype de CYP51 : L50S, S188N, I381V, Δ459-460, N513K (Buitrago *et al.*, 2014, Kirikyali *et al.*, 2017, Kildea *et al.*, 2019). L'étude de Kildea *et al.* (2019) sur les populations irlandaises entre 2011 et 2015 montrent une augmentation de leur fréquence, suggérant un avantage dans la *fitness* des souches en présence d'IDM.



**Figure 28.** Région promotrice de *cyp51* (MgCYP51) chez *Z. tritici*. La figure montre les 269 pb en amont du codon start du gène. Les flèches A et B indiquent la position des primers qui ont servi à identifier l'insert de 120 pb inséré en position -83 pb, responsable de la surexpression de *cyp51* (Cools *et al.*, 2012).

Une autre insertion d'une taille d'environ 1000 pb a été signalée mais aucun impact sur l'expression de *cyp51* n'a jusqu'ici été démontré (Chassot *et al.*, 2008 ; Leroux et Walker, 2011, Omrane *et al.* 2015 et Kildea *et al.*, 2019).

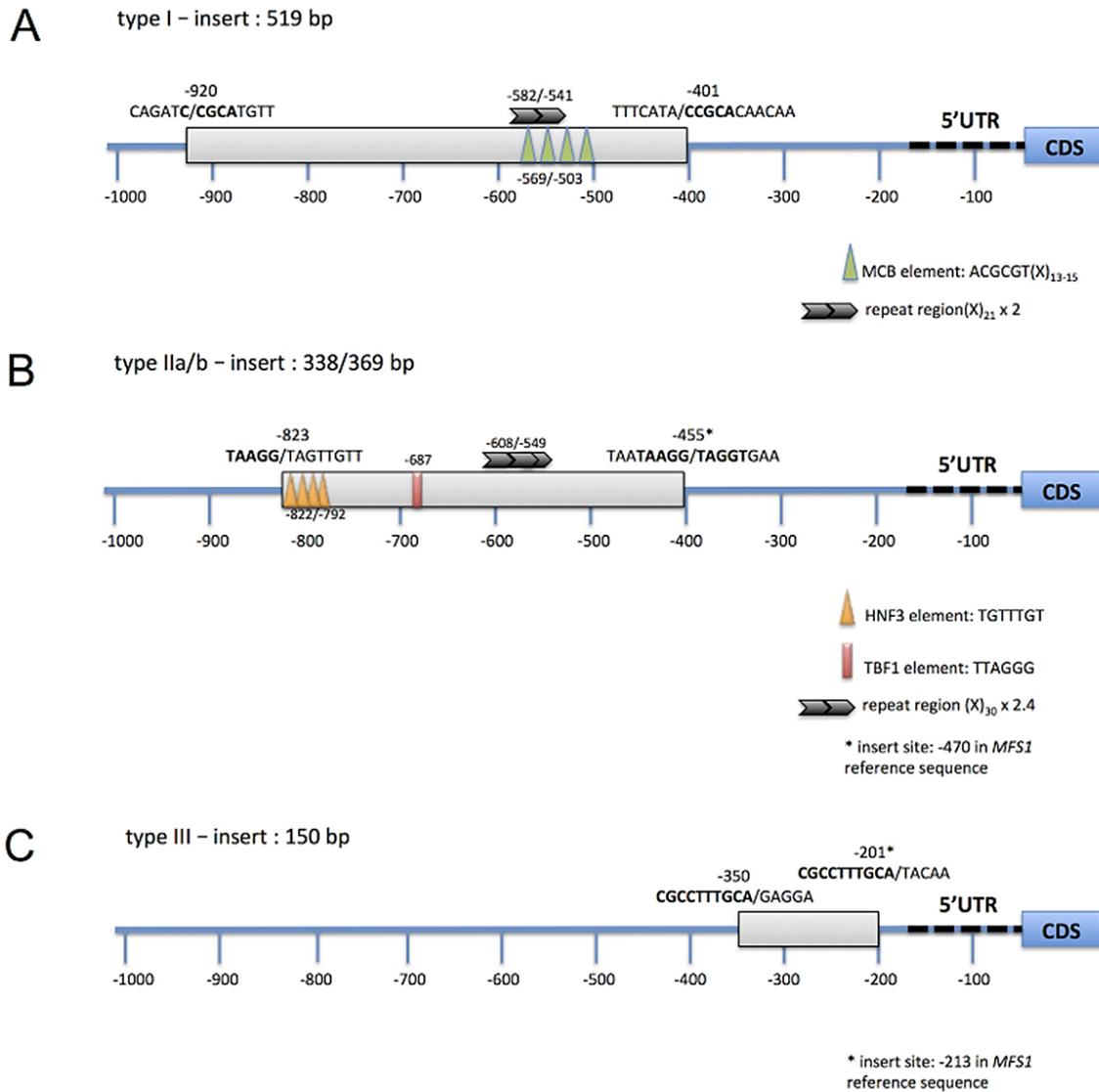
4.2.2.3.3 Surexpression de *MgMfs1*

Chez *Z. tritici*, le mécanisme de surexpression de pompes à efflux a été suspecté chez certains isolats exprimant une forte tolérance pour de nombreux fongicides comme le tolnaftate ou le boscalid (Stergiopoulos *et al.*, 2003 ; Cools *et al.*, 2007 ; Leroux et Walker, 2011). Ce phénotype appelé « *multidrug resistance* » ou MDR, peut-être dû à la surexpression des gènes codant pour les transporteurs membranaires de la superfamille des ABC (*ATP binding cassette*) ou des MFS (*Major Facilitator Superfamily*).



Ces protéines membranaires catalysent le fongicide vers l'extérieur de la cellule grâce à un transport actif en utilisant le mécanisme d'hydrolyse de l'ATP dans le cas de la famille ABC, de la force proton-motrice dans le cas des MFS. Leur surexpression confère une résistance à de nombreux composés toxiques par le biais d'une diminution de la concentration intracellulaire. Ce mécanisme se traduit par une perte d'efficacité de composés toxiques comme les fongicides. Les transporteurs ABC (*MgAtr1*, *MgAtr4* et *MgAtr5*) identifiés par Stergiopoulos *et al.* (2003) possèdent une expression modulée par des composés fongicides (naturels ou synthétiques) qui varient également en fonction de la souche étudiée. Néanmoins, cette étude indique qu'aucune corrélation n'est observée entre la surexpression des transporteurs d'efflux et le niveau de résistance aux fongicides.

Omrane *et al.* (2015) démontrent que certains isolats hautement résistant aux IDM expriment une surexpression du gène codant pour le transporteur MFS, causée par un insert de 519 pb en position -383 de son promoteur (type I). Cet insert se révèle identique à une séquence « *long terminal repeat* » (LTR) localisée sur le chromosome 18, suggérant un évènement de transposition. Le rôle de ce transporteur dans la résistance aux fongicides a déjà été caractérisé par Roohparvar *et al.* (2008) comme déterminant dans la sensibilité aux strobilurines, en plus de la substitution G143A. En réalisant une inactivation du gène *MgMFS1* dans des souches de phénotype MDR, les mutants présentent des niveaux de sensibilité similaires aux souches sensibles pour les SDHI et les inhibiteurs de la squalène époxydase, comme le tolnaftate et la terbinafine (Omrane *et al.*, 2015). Fait intéressant, l'inactivation ne rétablit pas totalement la sensibilité de la souche pour les IDM, ce qui confirme le caractère multi-facteur de la résistance aux IDM. La combinaison des deux mécanismes (mutations et surexpression des transporteurs membranaires) contribue donc à des niveaux de résistance plus élevés. De plus, l'étude de Kirikyali *et al.* (2017) informe que certaines souches peuvent exprimer ces deux mécanismes et cumuler en plus, une surexpression de *cyp51*. Omrane *et al.* (2017) décrivent deux autres types d'inserts dans le promoteur de *MgMFS1* : l'insert de type II de 369pb (type IIa) ou 339 pb (type IIb) et de l'insert de type III, très présent dans les populations irlandaises, de 149 pb (figure 29 ; Omrane *et al.*, 2015, 2017 ; Kildea *et al.*, 2019). Les types I et II renferment un site de liaison potentiel avec un facteur de transcription ; cependant, le rôle des éléments régulateurs de la transcription est encore à l'étude.

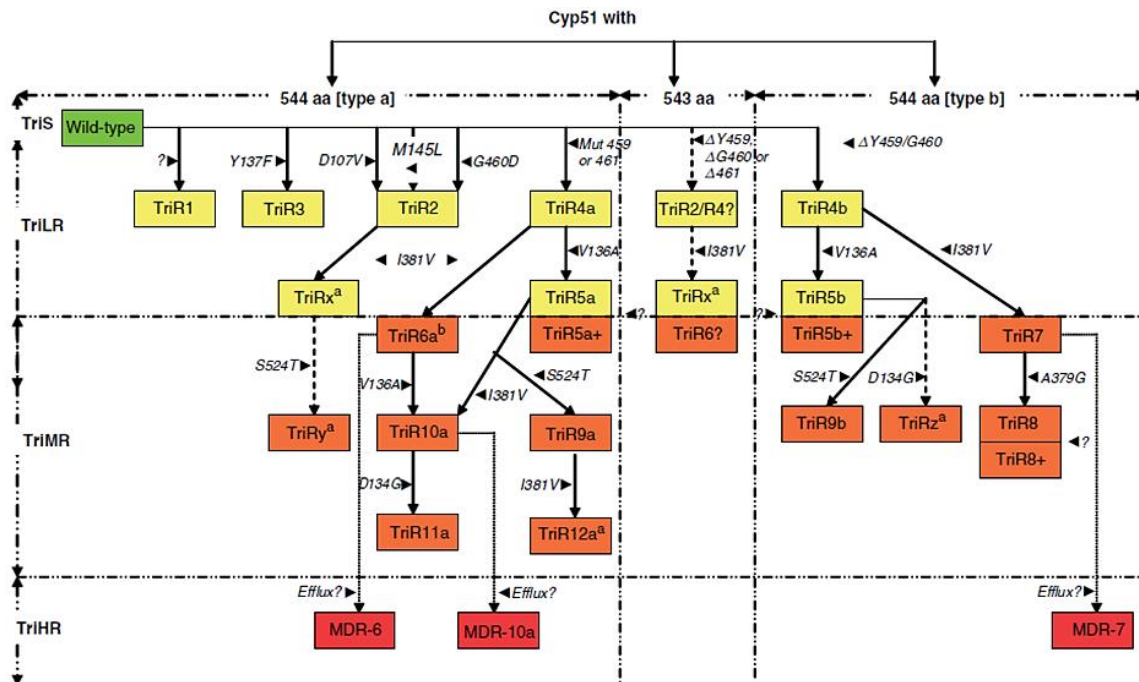


**Figure 29.** Structure moléculaire des trois inserts identifiés dans le promoteur de *MgMFS1* chez *Z. tritici*. Les figures indiquent l'emplacement, la longueur et les sites d'insertions des inserts de types I (a), IIa/b (b) et III (c). Les séquences répétées entre les deux insertions sont indiquées en gras. Les séquences consensus de potentiels éléments régulateurs sont indiquées par des triangles et des carrés. Les longues séquences répétées sont représentées par des flèches noires (Omrane *et al.* 2017).



#### 4.2.2.3.4 Corrélation génotype et phénotype

Différentes tentatives ont été menées pour obtenir une classification des haplotypes. En France, le système adopté est celui des « *triazoles resistant types* » ou TriR types créé par Leroux *et al.* (2007). Cette classification s'appuie sur l'étude de la sensibilité de 58 souches pour 12 fongicides dont 9 triazoles (metconazole, tébuconazole, époxiconazole, cyproconazole, propiconazole, triadimenol, fluzilazole, fluquinconazole, prothioconazole), deux imidazoles (prochloraz et triflumizole) et une pyridine (pyrefenox). Cette analyse conduit à la réalisation d'une classification en sept phénotypes regroupés en quatre paliers : *triazole sensible* (TriS), *triazole low resistant* (TriLR), *triazole moderate resistant* (TriMR) et *triazole high resistant* (TriHR). Un facteur de résistance est associé à chaque phénotype en fonction de l'IDM testé. La présence ou l'absence d'une altération impactant grandement la sensibilité aux IDM (la délétion  $\Delta Y459/G460$ ) permet de distinguer le type a du type b (figure 30).



**Figure 30.** Relations entre génotype et phénotype de résistance aux IDM basées sur le polymorphisme présent au sein de la protéine CYP51. Deux types sont représentés : le type a (aucune substitution entre les positions 458 et 462) et le type b (délétions d'une tyrosine (Y) et d'une glycine (G) aux positions 459 et 460). Les mutations accumulées influençant le phénotype sont indiquées entre chaque type, faisant progresser le niveau de résistance (Tri S : sensible aux IDM, TriLR : faiblement résistant aux IDM, TriMR : moyennement résistant aux IDM et TriHR : hautement résistant aux IDM). Cette dernière catégorie contient les individus possédant le phénotype *multi-drug resistant*, appelé aussi MDR (Leroux *et al.*, 2011).



En 2011, cette classification est complétée par huit nouveaux phénotypes comme par exemple le TriR8 identifié par Stammler *et al.* (2008) et la découverte de mécanismes additionnels de type *multi-drug resistant* (phénotype MDR).

La classification permet de visualiser l'accumulation graduelle des mutations corrélées avec une augmentation de la tolérance vis à vis des IDM : plus il y a d'altérations, plus la tolérance augmente. Les facteurs de résistance (rapport entre les concentrations efficaces médianes (EC<sub>50</sub>) de l'isolat et celui de la souche de référence sensible) sont également établis selon le phénotype (figure 31; Leroux *et al.*, 2007 ; Leroux et Walker, 2011).

Fungicide	EC <sub>50</sub> (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup> TriS (6)	Resistance factors (RFs) <sup>b</sup>														
		TriR1 (2)	TriR2 (3)	TriR3 (3)	TriR4 (6)	TriR5 (6)	TriR5+ (4)	TriR6 (7)	TriR7 (3)	TriR8 (5)	TriR8+ (2)	TriR9 (4)	TriR11a (1)	MDR-6 (2)	MDR-7 (2)	MDR-10a (1)
Pyrifénox	0.0013	2.7	6.9	10.0	23.1	27.7	126.9	36.2	30.8	40.0	123.1	192.3	153.8	192.3	246.2	230.8
Fenarimol	0.035	0.3	2.3	1.4	5.7	5.7	6.3	17.1	17.1	22.9	22.9	7.6	14.3	114.3	114.3	28.6
Nuarimol	0.040	0.3	4.0	2.0	6.3	6.3	ND <sup>c</sup>	15.0	12.5	15.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bifonazole	0.0060	ND	3.3	5.0	6.7	0.8	ND	6.7	4.2	4.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clotrimazole	0.030	ND	2.0	8.3	4.0	6.7	ND	6.7	3.3	3.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fenapanil	0.030	ND	10.0	23.3	23.3	8.3	ND	66.7	66.7	66.7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Prochloraz	0.0018	2.7	3.9	9.4	6.7	15.0	27.8	6.7	1.5	0.8	2.3	66.7	22.2	111.1	122.2	166.7
Triflumizole	0.0036	0.3	8.3	0.8	27.8	30.6	59.7	333.3	194.4	722.2	111.1	68.8	833.3	1388.9	1111.1	416.7
Bitertanol	0.010	2.0	2.0	7.0	4.0	0.4	ND	10.0	4.0	8.0	ND	ND	ND	ND	100.0	ND
Bromuconazole	0.017	8.0	2.1	23.5	14.7	23.5	33.8	47.1	41.2	47.1	176.5	79.4	117.6	253.3	264.7	88.2
Cyproconazole	0.049	2.0	2.0	6.5	4.3	8.5	18.3	11.2	7.6	13.1	40.8	16.3	34.7	112.2	61.2	40.8
Dichlobutrazole	0.060	2.5	5.0	4.2	6.7	8.3	ND	13.3	4.2	4.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Difenoconazole	0.00025	3.0	6.0	20.0	20.0	1.6	2.8	32.0	32.0	60.0	60.0	6.3	6.0	800.0	600.0	28.0
Diniconazole	0.0080	0.6	4.0	1.3	10.0	7.5	ND	80.0	25.0	75.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Epoxiconazole	0.0020	3.5	2.5	13.5	5.0	8.5	18.3	25.5	11.0	23.0	75.0	29.9	60.0	225.0	210.0	60.0
Fenbuconazole	0.0020	1.5	3.0	12.5	12.5	1.5	5.9	50.0	50.0	75.5	175.0	18.6	15.0	650.0	500.0	40.0
Fluquinconazole	0.0031	0.5	2.9	1.3	6.5	14.2	34.7	20.3	14.5	22.6	64.5	75.8	103.2	387.1	387.1	112.9
Flusilazole	0.0057	3.5	5.3	21.1	12.3	19.3	21.9	31.6	40.4	43.9	140.4	61.4	105.3	438.6	350.9	122.8
Flutriafol	0.070	2.5	4.3	14.3	8.6	14.3	ND	17.1	14.3	28.7	ND	42.9	ND	ND	64.3	ND
Hexaconazole	0.0045	0.7	2.0	1.6	5.6	4.4	5.3	8.9	6.7	8.9	17.8	8.9	11.1	55.6	44.4	26.7
Metconazole	0.0020	4.0	4.0	8.5	10.0	8.0	7.9	15.5	10.0	17.5	50.0	23.6	30.0	110.0	150.0	40.0
Myclobutanil	0.10	ND	8.0	10.0	20.0	3.0	ND	30.0	30.0	50.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pacloutrazole	0.060	ND	6.7	4.2	13.3	26.7	ND	16.7	13.3	13.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Propiconazole	0.0037	2.4	5.9	14.3	12.2	20.5	29.1	35.1	27.0	54.1	94.8	70.9	54.1	459.5	270.3	162.2
Tebuconazole	0.011	3.6	6.8	13.6	18.2	1.8	6.4	74.5	51.8	90.9	363.6	12.0	18.2	636.4	500.0	45.5
Tetraconazole	0.020	1.5	6.0	10.0	12.5	25.0	ND	100.0	100.0	100.0	ND	ND	ND	ND	500.0	ND
Triadimenol	0.57	16.7	2.6	24.6	7.4	3.3	6.6	27.2	21.1	26.3	>43.9	9.6	26.3	>43.9	>43.9	26.3
Triticonazole	0.050	3.5	6.0	6.0	16.0	1.4	ND	44.0	44.0	50.0	ND	8.0	ND	ND	200.0	ND
Prothioconazole	0.040	ND	2.3	3.5	3.8	5.3	10.2	7.8	7.0	7.3	12.5	16.3	25.0	25.0	25.0	12.5

<sup>a</sup> Mean EC<sub>50</sub> values were calculated for six wild-type isolates (TriS).

<sup>b</sup> Mean resistance factors (ratios EC<sub>50</sub> TriR/EC<sub>50</sub> TriS) were calculated for the number of isolates indicated in brackets below each TriR or MDR type.

<sup>c</sup> Not determined.

**Figure 31.** Effet *in vitro* des IDM sur la longueur du tube germinatif pour 15 phénotypes de résistance aux IDM chez *Z. tritici* (12 TriR et 3 MDR). a : moyenne des EC<sub>50</sub> calculée pour 6 isolats sensibles (TriS). b : moyenne des facteurs de résistance (EC<sub>50</sub> souches TriR / EC<sub>50</sub> souches TriS). c : ND correspond à non déterminé (Leroux et Walker, 2011).



La résistance aux IDM évolue et se complexifie continuellement au sein des populations de *Z. tritici*. Les populations ont évolué face à la pression sélective des azoles et il est admis que la majorité des isolats contient des altérations sur la CYP51, entraînant ainsi une grande variabilité dans les CE<sub>50</sub>. Jorgensen *et al.* (2018) identifient de grandes variabilités parmi les différentes populations européennes de *Z. tritici* au niveau de la fréquence des altérations de CYP51 et de facteurs de résistance (RF) obtenus *in vitro* (figure 32). Aucun lien n'a cependant pu être clairement défini entre les fréquences d'altérations de CYP51, la sensibilité observée *in vitro* et l'efficacité des différents azoles en Europe. Cette étude montre le caractère complexe de la résistance aux IDM, qui ne serait pas uniquement dûe aux mutations présentant un impact direct sur la résistance, mais dépendrait plutôt d'un effet de synergie.

De nouveaux haplotypes de CYP51 continuent d'apparaître, principalement dans les régions où la pression fongicide est très forte comme le Royaume-Uni, l'Irlande, le Nord de la France et l'Allemagne (Cools et Fraaije, 2013 ; Huf *et al.*, 2018). Aujourd'hui, plus de 100 haplotypes ont pu être identifiés en raison de l'accumulation des différentes altérations de CYP51 (Huf *et al.*, 2018). Le système des « *triazoles resistant types* » s'est avéré un outil valable mais la complexité croissante des haplotypes font que cet outil n'est plus d'actualité dans la caractérisation des souches. De plus, aucune mise à jour récente n'a été effectuée, ce qui induit une incapacité à détecter de nouveaux haplotypes qui pourraient se différencier selon d'autres mécanismes. Toutefois, si certaines mutations ne sont pas connues pour leur implication dans la résistance, telles que L50S, S188N et N513K, il n'est pas exclu qu'elles puissent avoir un rôle additionnel dans des haplotypes plus complexes (Leroux *et al.*, 2007 ; Huf *et al.*, 2018).

La résistance croisée existe entre les IDM, mais reste incomplète pour certaines combinaisons. Cependant, les souches présentant le phénotype MDR présentent, en plus, une résistance croisée avec d'autres familles de fongicides comme les QoI et les SDHI (Omrane *et al.*, 2015).





		Frequencies of mutations (%) in 2015						RF (isolates EC <sub>50</sub> /referenceEC <sub>50</sub> )			
Country	Trial	I381V	V136A	D134G	A379G	V136C	S524T	EPX	MCA	TCA	PTH-desthio
DNK. E	2	91	28	17	30	0	2	30	34	195	14
DNK. E	3	89	43	37	14	21	1	56	26	88	18
DNK. S	4	95	52	47	19	0	1	58	26	53	32
DEU. N	12	98	24	22	16	18	8	90	52	118	41
DEU. S	14	98	29	22	34	0	8	42	34	161	14
FRA. M	10	89	47	40	10	0	3	32	14	73	18
GRB. N	19	100	48	33	16	14	34	198	82	114	105
GRB. S	21	97	35	15	14	20	30	110	106	249	45
GRB. M	16	NA	NA	NA	NA	NA	NA	132	106	198	64
GRB. M	20	100	38	33	0	34	29	114	78	226	50
IRL. E	22	88	73	33	27	22	51	164	92	99	82
BEL. W	24	94	64	62	0	28	6	62	20	15	41
POL. MW	6	96	44	39	28	22	4	NA	NA	NA	NA
POL. S	8	94	10	0	13	11	2	26	16	160	9
HUN. SE	25	76	0	0	50	0	0	10	10	67	5
HUN. SE	26	95	0	0	73	0	0	10	12	118	5
Avr.		93.3	35.7	26.7	22.9	12.7	11.9	75.6	47.2	128.9	36.2

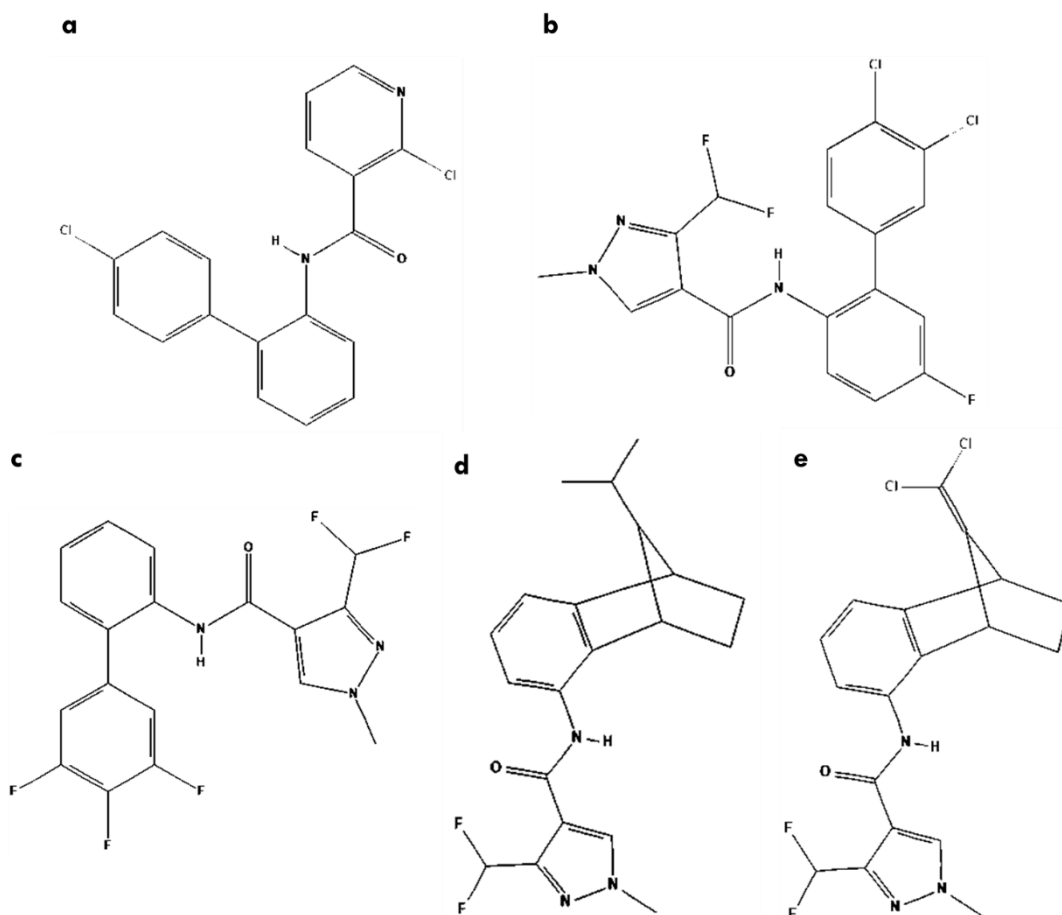
		Frequencies of mutations (%) in 2016						RF (isolates EC <sub>50</sub> /referenceEC <sub>50</sub> )			
Country	Trial	I381V	V136A	D134G	A379G	V136C	S524T	EPX	MCA	TCA	PTH-desthio
DNK. E	1	92	33	21	33	12	4	127	142	170	4
DNK. E	2	92	54	49	19	25	5	48	35	100	33
FRA. N	3	91	68	66	0	30	3	57	17	23	38
FRA. S	4	78	38	15	28	45	9	27	23	122	21
DEU. S	9	94	37	28	20	16	7	NA	NA	NA	NA
GRB. E	6	100	46	39	17	31	25	168	132	171	129
GRB. N	5	95	52	25	14	28	45	168	113	286	54
GRB. M	7	99	57	47	22	26	20	160	107	156	67
IRL. E	12	95	86	33	14	14	56	195	100	37	108
POL. S	10/11	94	20	15	14	15	3	108	25	130	71
LVA. M	13	99	11	0	21	0	0	17	15	157	8
HUN. MN	14	95	0	0	34	0	0	13	13	46	4
Avr.		93.7	41.8	28.2	19.7	20.2	14.8	98.9	65.6	127.1	48.8

**Figure 32.** Fréquence moyenne de six mutations portées par CYP51 (en %) en 2015 et 2016 détectées sur des isolats provenant de parcelles non traitées de pays européens (Danemark (DNK), France (FRA), Allemagne (DEU), Royaume-Uni (GRB), Irlande (IRL) Pologne (POL), LVA (Lettonie) et Hongrie (HUN)). Les facteurs de résistance sont renseignés pour quatre azoles testés : époxiconazole (EPX), metconazole (MCA), tébuconazole (TCA) et le desthio-prothioconazole (PTH-desthio). Un code couleur a été appliqué sur les fréquences de mutations ; vert : aucune mutation, jaune : basse fréquence (1-10%), orange : fréquence moyenne (11-50%) et rouge : haute fréquence (> 50%). NA = aucune donnée disponible. Issu de Jorgensen *et al.*, 2018.



#### 4.2.2.4 Les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase

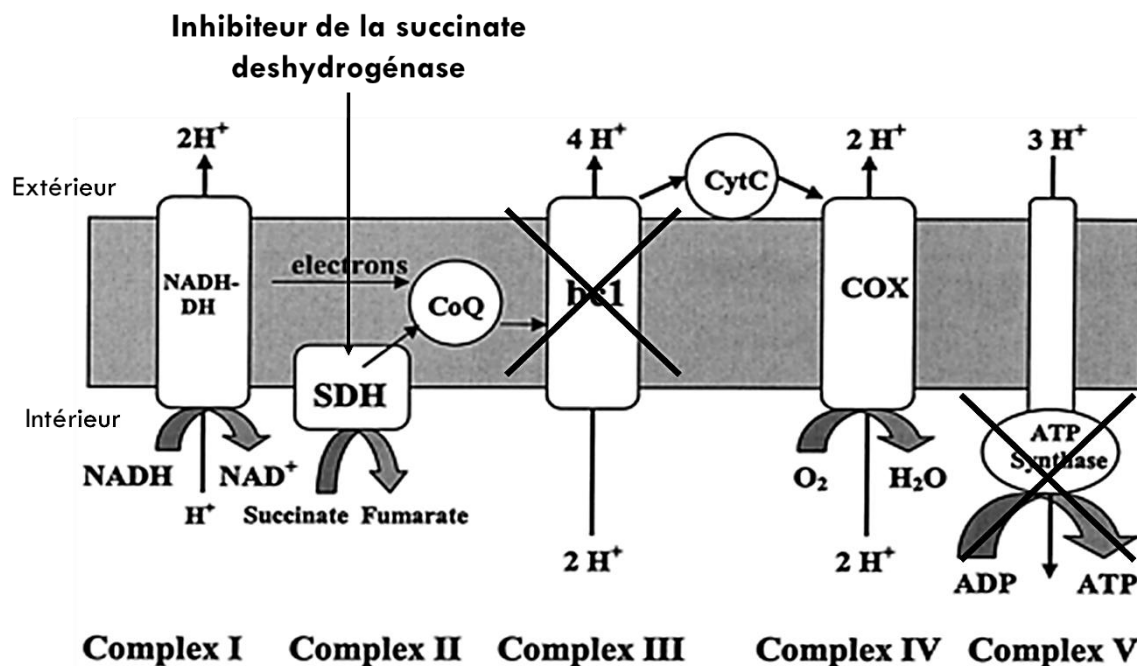
Mise en circulation en 1969 avec la carboxine pour la désinfection des semences, les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI) ont subi une évolution constante pour augmenter leurs spectres d'activité grâce au progrès de la chimie (Fraaije *et al.*, 2012 ; Kirikyali *et al.*, 2017). C'est en 2003 qu'apparaît le boscalid, premier représentant de la nouvelle génération des SDHI, actif contre de nombreux ascomycètes responsables de maladies des céréales, comme la septoriose. Plus récemment, d'autres molécules ont été introduites sur le marché contre la septoriose du blé, telles que le bixafen, le fluxapyroxad, l'isopyrazam et le benzovindiflupyr (figure 33 ; Yamashita et Fraaije, 2017).



**Figure 33.** Formule chimique des fongicides inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI) : le boscalid (a), le bixafen (b), le fluxapyroxad (c), l'isopyrazam (d) et le benzovindiflupyr (e).  
Source : Pubchem.



Le mode d'action de ces molécules vise à inhiber le fonctionnement de la succinate déshydrogénase (SDH), une protéine du complexe II de la chaîne respiratoire, en se fixant dans le site catalytique de l'enzyme. Constituée de 4 sous-unités, elle catalyse le transfert de deux électrons sur l'ubiquinone lors de l'oxydation du succinate en fumarate (figure 34). En bloquant la réaction de la chaîne respiratoire, ces molécules préviennent la germination des spores et inhibent la croissance mycélienne et la sporulation, permettant ainsi leur utilisation à la fois préventive et curative (Fraaije *et al.* 2012). Le risque d'apparition de résistances a été identifié comme « moyen à fort » par le FRAC.



**Figure 34.** Mode d'action des inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI) au niveau de la respiration cellulaire. Les fongicides bloquent la réaction de synthèse du fumarate et toute la chaîne enzymatique. Modifié de Ritov *et al.*, (2005).

Comme tous fongicides uni-sites systémiques, les SDHI ne sont pas à l'abri de développement de résistances par *Z. tritici*. Une étude de mutagenèse *in vitro* par UV réalisée par Scalliet *et al.* (2012) a mis en évidence des possibilités de mutations ponctuelles associées à des phénomènes de résistance sur les sous unités SDHB, SDHC et SDHD de la SDH du champignon. Une étude réalisée par Rehfus *et al.* (2018) informe de l'émergence en Europe des souches mutantes dès 2012 avec la présence de mutations telles que C-T79N, C-W80S, C-N86S en 2013 ; B-N225T et C-T79N en 2014 ; et C-V166M, B-T268I, C-N86S, C-T79N et C-H152R en 2015. Dooley *et al.* (2016b) ont montré que, sur 93 souches de *Z. tritici* isolées en Irlande, deux d'entre elles présentent une réduction de la sensibilité au penthiopyrad car elles possédaient les mutations C-H152R (déjà rapporté par Scalliet *et al.* 2012) et SdhD-R47W.



La mutation C-H1 52R est associée à une forte tolérance au SDHI ; elle est principalement retrouvée au Royaume-Uni ainsi qu'en Irlande. D'autres mutations sont présentes en Europe dont la C-T79N détectée en France en 2012, traduisant une faible résistance envers ces fongicides (Kirikyali *et al.*, 2017 Rehfus *et al.*, 2018 ; Yamashita et Fraaije, 2018). Pour prévenir ou retarder l'apparition de résistances aux SDHI dans les pathogènes des céréales, le FRAC recommande l'utilisation préventive des SDHI en mélange et avec un maximum de deux pulvérisations par saison, généralement après le déploiement de la dernière feuille. Pour la septoriose, la plupart des produits SDHI entrent sur le marché sous forme de co-formulations avec des azoles. En 2015, les SDHI représentent 8% des parts du marché global des fongicides, soit environ un milliard d'euros dépensés toutes cultures confondues (FRAC 2019). Yamashita et Fraaije (2018) ont réalisé une étude comparative entre des souches résistantes au fluopyram et à l'isofetamid et une souche de laboratoire mutante SdhC-A84V. Après séquençage des sous unités SdhB, C et D des souches présentant de fortes tolérances aux SDHI, aucune mutation n'a été détectée, ce qui semblerait indiquer une résistance non spécifique à la cible des SDHI. Cette résistance a été détectée sur des souches isolées avant la généralisation de l'utilisation des SDHI et semblerait toucher le nord-ouest de l'Europe mais aussi la Nouvelle-Zélande, ce qui sous entends que ces molécules sont à utiliser avec précautions.

### 4.3 PRODUITS DE LUTTE ALTERNATIVE : LE BIOCONTROLE

Le biocontrôle vise à utiliser des composés naturels ou des organismes vivants pour lutter contre les bio-agresseurs des cultures (Herth, 2011). Les produits de biocontrôle utilisés contre les agents phytopathogènes peuvent avoir un mode d'action direct (bio-fongicides) ou indirect (stimulateurs des défenses des plantes (SDP), appelés également éliciteurs). Les bio-fongicides et SDP peuvent être de nature biotique ou abiotique. Les composés d'origine biotique peuvent être constitués de micro-organismes vivants, d'extraits de plantes (spermatophytes ou algues), d'extraits de parois cellulaires microbiennes (chitosan, lipopolysaccharides, flagellines, lipopeptidoglycanes et exopolysaccharides), de métabolites microbiens (rhamnolipides, lipopeptides, harpines, ergostérols et protéines microbiennes purifiées), d'autres molécules organiques ( $\beta$ -aminobutyric acid (BABA), vitamines, sucres, acides aminés et biochar) mais également de minéraux comme le cuivre, le bore, le silicone, les phosphites et autres composés à base de calcium (Siah *et al.*, 2018b).



Dans la lutte contre la septoriose, le premier SDP de type abiotique homologué et commercialisé en Europe est le Bion<sup>®</sup> (Syngenta). Sa formulation contient de l'acibenzolar-S-methyl (ASM) stimulant la défense naturelle des plantes. Il permet également de lutter contre d'autres bioagresseurs du blé comme l'oïdium et la rouille (Görlach *et al.*, 1996). Il est utilisé en préventif et possède une action systémique. Le Vacciplant<sup>®</sup> (auparavant Iodus40<sup>®</sup>) commercialisé par Goëmar, Arista LifeScience, (France), est le seul SDP d'origine biotique homologué dans la lutte contre la septoriose. Sa substance active est la laminarine, un  $\beta$ -1,3-glucane linéaire et hydrosoluble, extrait de l'algue brune *Laminaria digitata*, dont l'efficacité a été démontrée en laboratoire (Shetty *et al.*, 2009 ; Walters *et al.*, 2014).

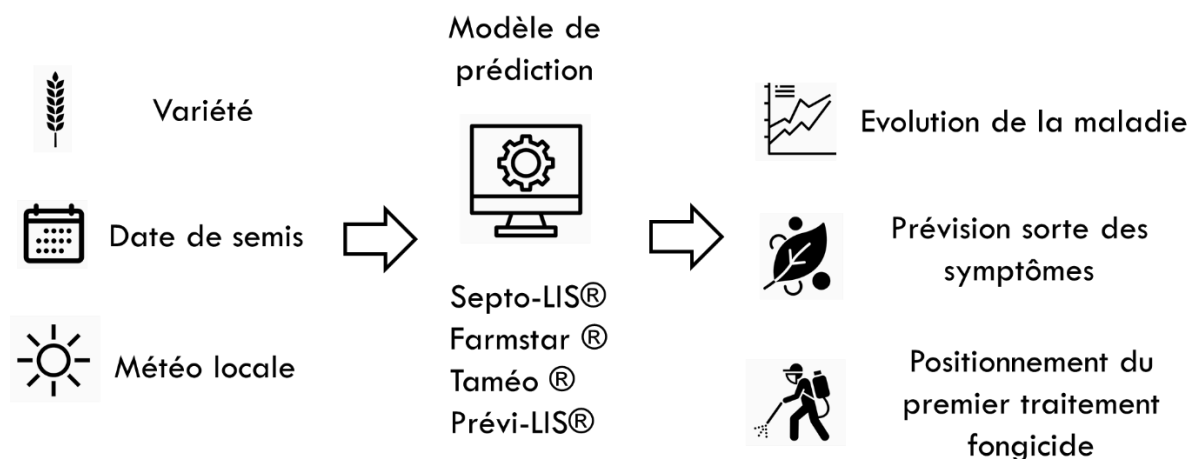
Les recherches menées par la communauté scientifique ont permis d'identifier de nouveaux SDP contre la septoriose, comme le  $\lambda$ -carraghénine, le CpG-oligodésoxynucléotides, la glycine bêtaïne, l'ergostérol et la spiruline (*Spirulina platensis*) (Le Mire *et al.*, 2019). Ces biomolécules induisent les voies de signalisation dépendantes de l'acide salicylique (AS) et/ou de l'acide jasmonique (JA) chez la plante et confèrent une protection allant jusqu'à 70 % contre la septoriose. Les lipopeptides de *Bacillus subtilis* ont également une activité bio-fongicide vis-à-vis de *Z. tritici* : le mélange mycosubtiline et surfactine permet de réduire de 82% la sévérité de la septoriose en conditions semi-contrôlées (Mejri *et al.*, 2017). Par ailleurs, l'extrait de rhizomes de jonc maritime ainsi que l'extrait brut de houblon et son huile essentielle présentent également une forte activité antifongique directe *in vitro* contre *Z. tritici* (Sahli *et al.*, 2017 ; Bocquet *et al.*, 2018). Le traitement du blé avec l'acide pyroglutamique et ses dérivés permet de réduire de 49% les symptômes de septoriose (Mejri *et al.*, 2019). D'autres composés ou microorganismes vivants, comme l'acide oxalique, *Cryptococcus sp.*, *Bacillus sp.* et *Trichoderma spp.*, ont également été rapportés pour leur activité protectrice contre *Z. tritici* (Cordo *et al.*, 2007 ; Kildea *et al.*, 2008 ; Zhuk *et al.*, 2014 ; Lynch *et al.*, 2016).

Malgré ce panel de molécules, le catalogue des produits de biocontrôle reste lacunaire car l'homologation d'une nouvelle substance reste longue et subit la même réglementation que les pesticides conventionnels autorisés en Europe, celle du CE n° 1107/2009 (Chandler *et al.*, 2011). Le statut de cette nouvelle catégorie a récemment été réévalué avec la création de nouvelles directives permettant un enregistrement moins long que pour les molécules de synthèses (Czajka *et al.*, 2015). La principale limitation de ces molécules reste cependant leur spectre d'activité qui est restreint à un seul groupe ou une seule espèce d'agent pathogène. Actuellement, l'emploi de ces molécules reste marginal à cause du manque d'efficacité et d'information qui limite leurs utilisations par les agriculteurs.



#### 4.4 LES OUTILS D'AIDE A LA DECISION (OAD)

De nombreux outils sont actuellement à la disposition des agriculteurs pour les aider à prendre les bonnes décisions dans leur programme fongicide. Développé par Arvalis - Institut du végétal dans la lutte contre la septoriose, Septo-LIS<sup>®</sup> est un modèle agro-climatique permettant de déterminer la période du premier traitement ainsi que les suivants ([www.septolis.arvalisinstitutduvegetal.fr](http://www.septolis.arvalisinstitutduvegetal.fr)). En renseignant la variété de blé, la date du semis et la localisation du champ cultivé, le modèle anticipe l'évolution de la septoriose par simulation hebdomadaire de l'évolution physiologique de la culture, de la contamination des étages foliaires et du temps d'incubation de chaque contamination (figure 35). D'autres OAD du même genre sont également disponibles pour permettre aux agriculteurs de déclencher leurs traitements fongicides : Farmstar<sup>®</sup>, Taméo<sup>®</sup> et Prévi-LIS<sup>®</sup> ([www.ecophytopic.fr/tr/cepp/cepp-bl%C3%A9-oad2](http://www.ecophytopic.fr/tr/cepp/cepp-bl%C3%A9-oad2)).



**Figure 35.** Mode de fonctionnement des outils d'aide à la décision dans le positionnement du premier traitement fongicide (adapté d'ARVALIS – institut du végétal).

Ces outils de prévision sont des atouts pour la protection des cultures, notamment contre la septoriose, dans le but de maintenir les rendements. Toutefois, dans le contexte du changement climatique, les variations météorologiques peuvent entraîner des perturbations au niveau de la croissance de la plante et du cycle infectieux du pathogène. L'optimisation de ces modèles devra donc évoluer en fonction de l'incidence du changement climatique et de la *fitness* du pathogène (Ghini *et al.*, 2008).



## 5 LA FITNESS DE *Z. TRITICI*

---

### 5.1 DEFINITION ET CONCEPT

La *fitness* est définie comme la faculté qu'a un organisme (ou plus rarement, une population) à survivre et à se reproduire dans l'environnement dans lequel il se trouve (Orr, 2009). La conséquence de cette survie est que sa reproduction apportera une contribution génique pour la prochaine génération (Orr, 2009). Occupant de nombreux biotopes, les champignons ont développé la capacité de détecter différents stimuli environnementaux et à répondre de façon adéquate à ces signaux afin de maximiser leur *fitness* (Brown *et al.*, 2017). Les organismes sont ainsi soumis à de nombreux stress, telles que les fluctuations de température et de pH ainsi que le stress oxydatif (Brown *et al.*, 2017). Face à ces pressions de nature biotique ou abiotique, les organismes vont acquérir de nouveaux caractères génotypiques et/ou phénotypiques permettant d'obtenir un avantage sélectif ou non. La *fitness* regroupe les traits d'histoire de vie, qui se définissent par l'ensemble des caractéristiques phénotypiques observables et mesurables d'un organisme. Il peut être mesuré grâce à plusieurs composantes qui correspondent à plusieurs étapes du cycle du pathogène, comme la production de spores, la capacité d'infection, la croissance mycélienne ou la capacité à survivre entre les saisons. L'un des points essentiels de la *fitness* réside dans la compétition entre souches au champ. Les souches vont être soumises aux fluctuations environnementales mais également aux interactions avec d'autres souches ou d'autres micro-organismes composant le microbiote (Mikaberidze et McDonald 2015). Les souches les mieux adaptées, possédant une bonne capacité reproductive, contribueront à la plupart des gènes de la génération future. Dans le cas de pressions de sélection biotiques (par l'hôte et/ou d'autres bio-agresseurs) et/ou abiotiques (par les fongicides et/ou l'environnement), les agents pathogènes peuvent acquérir de nouveaux caractères génétiques et/ou phénotypiques leur conférant un avantage sélectif, donc une meilleure *fitness*, ce qui leur permet de s'adapter plus facilement aux moyens de lutte déployés (comme les fongicides et les résistances variétales).

L'étude des traits d'histoire de vie d'un agent pathogène permettent de mieux comprendre l'interaction plante-pathogène grâce à l'évaluation de paramètres tels que l'agressivité et l'adaptation face aux facteurs environnementaux. L'agriculture a diminué la diversité des cultures pour obtenir des espèces ayant de meilleurs rendements, permettant aux populations des phytopathogènes de se développer et de se disséminer (Stukenbrock et McDonald, 2007).



L'évolution des pathogènes entraîne la sélection de certaines mutations qui conféreront un avantage dans l'environnement comme par exemple, l'apparition d'une mutation entraînant une résistance aux fongicides.

Cependant, les mutations conférant une aptitude particulière peuvent également perturber l'activité d'importants processus physiologiques et biochimiques (Anderson, 2005). Une mutation peut donc entraîner une diminution de la *fitness* des agents pathogènes. Cette conséquence est appelée le *fitness cost* et se définit comme la différence entre la *fitness* d'une souche adaptée à une condition et présentant une ou plusieurs mutations et une souche non adaptée ou « *wild type* » dans un environnement non sélectif.

## 5.2 *Z. TRITICI* FACE AUX STRESS

Face aux fluctuations des facteurs biotiques et abiotiques locaux, *Z. tritici* doit être capable de s'adapter à ces changements s'il veut survivre, croître et se reproduire. L'adaptation à un stress dépend de trois principes fondamentaux : la capacité à détecter les signaux environnementaux, de transduire les signaux et enclencher les réponses adaptatives adéquates pour la survie du pathogène (Brown *et al.*, 2017). L'une des réponses possibles est le changement de morphologie.

*Z. tritici* possède une plasticité phénotypique permettant des changements morphologiques lors de différents stress environnementaux. L'appauvrissement du milieu en carbone et en azote favorise la croissance filamenteuse et la formation d'anastomoses, ce qui permettrait lors de la contamination des feuilles de mieux explorer le milieu à la recherche de nutriments, relativement pauvres à la surface de la feuille. Sous l'effet du stress oxydatif causé par l' $H_2O_2$ , un composé de défense de la plante, Frascico *et al.* (2019) a montré que les blastospores de *Z. tritici* forment des pseudohyphes (hyphes possédant des jonctions septales entraînant une perte de continuité cytoplasmique entre les cellules mères et filles) afin de mieux résister à ce stress. La densité de l'inoculum joue un rôle dans la tolérance au  $H_2O_2$  : une forte densité permet une meilleure détoxification par les protéines d'hydroperoxydases fongiques comme les catalases et peroxydases, conduisant à une toxicité moindre comparée à une faible densité d'inoculum.



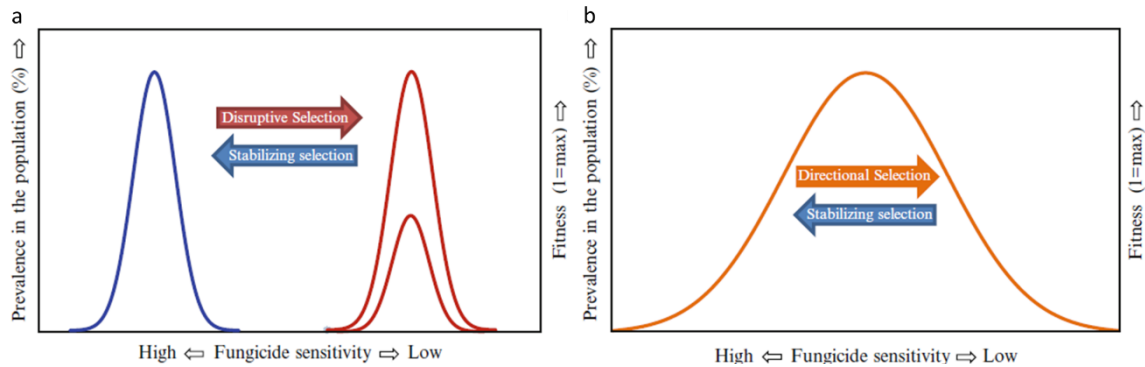


### 5.3 ADAPTATION AUX FONGICIDES

Indispensable dans la lutte contre la septoriose, les fongicides sont un levier important dans la gestion de la maladie. Cependant, pendant de nombreuses années, les producteurs s'alarment sur la baisse d'efficacité de certaines matières actives, parfois devenues totalement inactives (Qol) ou partiellement efficaces (IDM) contre *Z. tritici*. Ces résistances apparaissent à la suite de l'évolution du pathogène. *Z. tritici* est connu pour posséder une forte diversité génétique, un flux de gènes important ainsi qu'une forte activité de reproduction (sexuée et asexuée), permettant aux génotypes les mieux adaptés de se propager sur le terrain (Siah et al., 2018).

Dans certains cas, la résistance aux fongicides peut être conférée par une mutation unique conférant une résistance totale vis à vis du fongicide, comme la résistance aux Qol (Torriani et al., 2009). Dans le cas des IDM, plusieurs mutations doivent être accumulées dans le même ou dans différents gènes afin d'acquérir une résistance considérable (Cools 2008 ; Zhan et al. 2006). Le modèle dominant considère que les mutations sont préexistantes mais peu fréquentes avant l'introduction du fongicide (Torriani 2009 ; Camps et al., 2012). Les individus résistants sont alors sélectionnés via le fongicide et gagne en compétitivité au fil des traitements (Hawkins et al., 2014).

Dans une résistance monogénique, une évolution rapide peut conduire à des sous-populations résistantes, tandis que dans le cas de la résistance polygénique, la transition vers la résistance progresse lentement, ce qui conduit à une sensibilité réduite de l'ensemble de la population. Les sous-populations résistantes et sauvages (sensibles) sont en équilibre dynamique en raison de deux types de pressions sélectives : i) la sélection disruptive (monogénique) ou directionnelle (polygénique), due à des pulvérisations répétées de fongicides ayant le même mode d'action en faveur des souches résistantes et ii) la sélection stabilisatrice causée par un possible effet négatif des mutations de résistance entraînant une diminution de la *fitness* en faveur des souches sensibles (figure 36). La stabilité de la résistance aux fongicides est définie comme la capacité à conserver le même niveau d'insensibilité aux fongicides après des générations successives d'exposition ou d'absence d'exposition (Ishii, 2015).



**Figure 36.** Dynamique des populations dans le cas de résistances aux fongicides de type monogénique (a) et polygénique (b). La sélection disruptive ou directionnelle est observée en cas d'usage de fongicides ayant le même mode d'action. La stabilisation est due potentiellement en cas de réduction de *fitness* des souches résistantes (De Miccolis Angelini *et al.*, 2015).

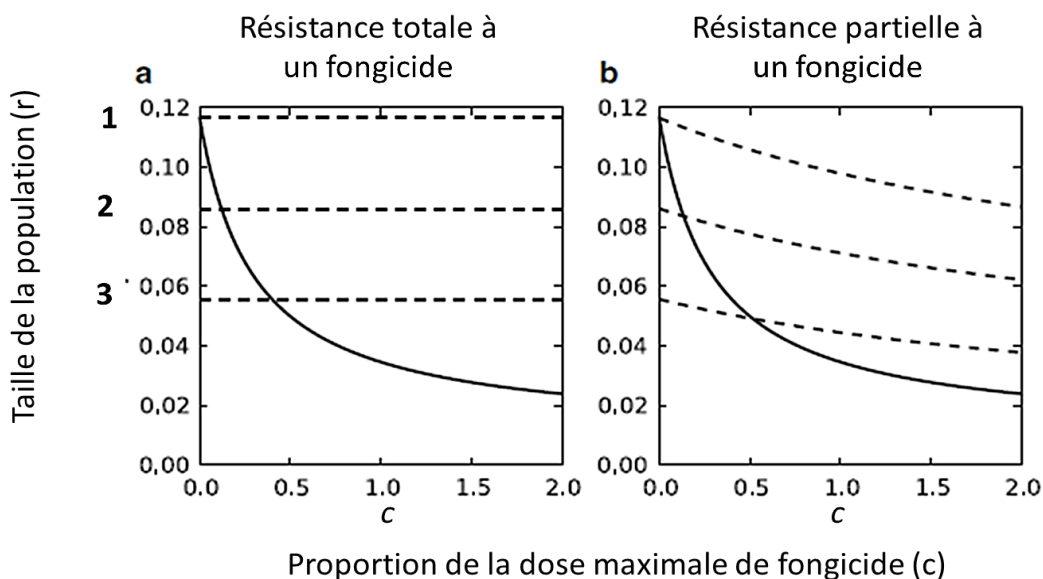
Toutefois, il est important de ne pas négliger le *fitness cost* entre la *fitness* d'une souche résistante portant une ou des mutations et la souche sensible en absence de pression fongicide. On suppose que la résistance aux fongicides n'est avantageuse que dans des environnements sélectifs, où l'utilisation intensive du fongicide en question a lieu (Boukef *et al.*, 2012). Pour tester la capacité de compétition chez *Magnaporthe oryzae*, un champignon ascomycète pathogène du riz, Ma et Uddin (2009) ont inoculé un mélange de souches sensibles et résistantes à l'azoxystrobine. L'expérience a révélé que la gravité de la maladie causée par les souches sensibles était plus importante que celle causée par les souches mutantes résistantes. Cependant, la souche mutante a produit un plus grand inoculum secondaire. Lorsque le mélange a été réalisé avec trois populations, l'expérience a montré que les souches sensibles produisent plus de conidies par rapport au mutants (Ma et Uddin, 2009). Cette étude démontre que les souches sauvages de *M. oryzae* possèdent un avantage compétitif sur les souches résistantes à l'azoxystrobine. Une étude de compétition par Karaoglanidis *et al.* (2001) a été réalisée sur de souches résistantes aux IDM chez *Cercospora beticola*, un agent pathogène de la betterave. La conclusion est que les souches résistantes aux IDM testées possèdent un *fitness cost* élevé, ce qui fait significativement diminuer leurs fréquences en faveur des souches sensibles. Cependant, chez d'autres pathosystèmes, aucun *fitness cost* n'est observé entre les souches résistantes à un fongicide et les souches sensibles. C'est le cas pour les souches de *Phytophthora erythroseptica* et de *Phytophthora nicotianae* résistantes au méfenoxam (Chapara *et al.*, 2011 ; Hu *et al.*, 2008) et des souches d'*Alternaria alternata* résistantes au QoI (Karaoglanidis *et al.*, 2010). La plupart des études menées en conditions contrôlées indiquent que le *fitness cost* lié à la résistance aux fongicides est faible (Kim et Xiao, 2011 ; Billard *et al.*, 2012) ou absent (Corio-Costet *et al.*, 2011).



Si aucun *fitness cost* en lien avec la résistance aux fongicides n'est découvert, les souches mutantes persisteront dans les populations, même en absence de fongicides.

Cependant, il est nécessaire de rappeler que les conditions de laboratoire ne reflètent pas obligatoirement les conditions du terrain. Il est difficile d'étudier le *fitness cost* à travers le temps car de multiples paramètres peuvent intervenir comme la sélection d'autres traits d'histoire de vie liés aux mutations causant la résistance, la dérive génétique ou l'immigration des isolats sensibles (Billard *et al.*, 2012). En effet, les souches du terrain sont plus susceptibles de développer des mutations compensatoires pour faire face aux conditions environnementales fluctuantes, pouvant de ce fait améliorer leurs *fitness* (Peever et Milgroom, 1995).

Dans un contexte de résistance aux fongicides, l'une des mesures de *fitness* la plus pertinente est le taux de croissance en début d'épidémie. La figure 37 présente les différents cas de *fitness cost* dans le cas d'une résistance totale ou partielle. On observe que, chez les souches résistantes totales (comme les Qol chez *Z. tritici*), la croissance reste constante malgré la dose employée, ce qui leur confère un avantage sélectif lors du traitement par rapport aux souches sensibles.



**Figure 37.** Effet du *fitness cost* sur la sélection de la résistance aux fongicides. Deux conditions sont représentées : dans le cas d'une résistance totale à un fongicide (a) et dans le cas d'une résistance partielle (b). La courbe de croissance de la souche sensible est indiquée en trait continu, alors que les souches résistantes sont représentées en traits discontinus. Trois types de croissance de souches résistantes sont indiqués : une sans *fitness cost* (1) et deux avec des *fitness cost* différents (2 et 3). (Mirakeridze et Mc Donald, 2015).



Toutefois, dans le cas d'un *fitness cost*, la sélection de la souche sensible est favorisée lors d'une application à faible dose de fongicide. Le schéma serait le même dans le cas d'une résistance partielle, seule la *fitness* sera modifiée en fonction de la dose employée. Cette figure montre l'importance de la sélection des souches lors de pression fongicide car si un *fitness cost* est observé, la sélection des souches résistantes peut être lentement inversée en absence de fongicides, sauf en cas de mutations compensatoires (Mikaberidze et Mc Donald (2015).

Des stratégies de management visent à utiliser la différence de *fitness cost* grâce à l'application de faibles doses de mélange de fongicides, permettant d'éviter la sélection de la résistance tout en contrôlant efficacement les maladies. En effet, les mutants inaptes ne sont en compétition que sous la pression de sélection des traitements fongicides. Par conséquent, la résistance est partiellement réversible lorsque la pression de sélection est éliminée ou minimisée par l'application de stratégies de gestion de la résistance. Cependant, le *fitness cost* finit par être compensé par le pathogène (Levin *et al.* 2000 ; Schoustra *et al.* 2006).

Pour les souches MDR, la question de la *fitness* se pose également. Une étude menée chez *B. cinerea* indique que les souches MDR ne présentent aucun *fitness cost* (Kretschmer *et al.*, 2009). De plus, l'augmentation annuelle du phénotype MDR1h confirme la capacité compétitive des souches MDR comparativement aux souches non MDR, ainsi qu'une absence de *fitness cost* pour les souches non MDR pendant et entre les saisons (Kretschmer *et al.*, 2009). Toutefois, des tests comparatifs sur des paramètres de *fitness*, comme la croissance et la sporulation, n'ont pas révélé de différences entre ces souches et la souche mère sensible (Hahn et Leroch, 2015).

## 5.4 ADAPTATION A LA TEMPERATURE

La température est un facteur abiotique important qui affecte fortement la croissance, la reproduction, le développement et la survie des champignons (Zhan et Mc Donald, 2011). Les différences d'environnement d'un territoire à un autre conduisent à une adaptation locale des populations (Nuismer et Gandon, 2008). En effet, la littérature rapporte des exemples comme les populations européennes de *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* adaptées à des gammes thermiques plutôt fraîches. Après les années 2000, deux nouvelles lignées clonales capables de se développer dans des climats chauds, ont émergé, créant ainsi une propagation du pathogène dans les zones auparavant défavorables (Mboup *et al.*, 2012). Il en est de même pour *Rhynchosporium commune*, pouvant s'adapter à des températures plus élevées (22°C) que celles de son climat scandinave d'origine (Stefansson *et al.*, 2013). Cependant, *Z. tritici* est présent dans les régions productrices de blé du monde entier couvrant une large gamme de températures, ce qui montre une plasticité élevée face à ce stress (Zhan et McDonald, 2011 ;



Jorgensen *et al.*, 2014 ; O'Driscoll *et al.*, 2014). Les deux stratégies des pathogènes fongiques pour s'adapter à différents environnements thermiques en constante évolution reposent sur la différenciation génétique et la plasticité phénotypique (Yamori *et al.*, 2010 ; Lendenmann *et al.*, 2016).

La différenciation génétique est une réponse basée sur la population où les individus porteurs d'allèles différents sont sélectionnés en fonction de l'environnement local. Au fil des générations, la pression de sélection pour différentes températures peut entraîner des changements dans l'architecture génétique de l'adaptation à la température. Une étude menée sur un total de 138 souches de *Z. tritici* prélevées sur trois continents balayant divers environnements thermiques, a mis en évidence des preuves d'adaptation thermique (Zhan et McDonald, 2011). Les auteurs ont conclu que l'adaptation thermique était principalement due à une différenciation génétique plutôt qu'à une plasticité phénotypique.

La plasticité phénotypique est définie comme une réponse individuelle qui permet au même génotype de produire différents phénotypes dans différents environnements (Murren *et al.*, 2015). L'une d'entre elles repose sur la transition morphologique. Elle est observée chez certains pathogènes fongiques et varie en fonction de l'espèce mais également en fonction de la température ou selon le support où elles se développent (Gauthier, 2015). Chez *Z. tritici*, l'effet du stress thermique sur la transition morphologique a été évalué sur les blastospores (forme levure). Francisco *et al.* (2019) ont obtenu une augmentation de l'allongement des hyphes et la formation de cellules similaires à des chlamydospores (cellules sphériques à paroi épaisse formées sur les parties distales des hyphes, au niveau des cellules du suspenseur). Ces structures sont connues pour leurs résistances à de nombreux stress permettant la survie à long terme. Les auteurs ont testé ces formes cellulaires à différents stress : températures froides (azote liquide), environnement sec et température élevée (30, 35 et 40°C) et ont démontré que les chlamydospores ont un taux de survie supérieur aux autres structures (blastospores et pseudohyphes). Cette découverte de l'aptitude pléomorphe de *Z. tritici* est non négligeable, notamment dans les cycles épidémiques car chlamydospores serait alors une nouvelle source d'inoculum primaire.

Une étude basée sur des *quantitative trait loci* (QTL) a montré une corrélation entre l'adaptation thermique de *Z. tritici* et le taux de croissance, la mélanisation et la morphologie des hyphes (Lendenmann *et al.*, 2016). En effet, les champignons mettent en place plusieurs mécanismes pour faire face aux changements de température, comme l'induction ou l'augmentation de la synthèse des protéines liées au stress thermique (protéines de choc thermique (HSP)) (Feder et Hofmann, 1999), des changements dans la composition cellulaire



(activation de la voie du glycérol) (Panadero *et al.*, 2006) et l'ajustement de la composition des membranes (saturation en lipides des membranes) (Leach et Cowen, 2014). Les interactions régissant les interactions entre pathogènes sont également influencées par la température. L'analyse d'une métapopulation de *Podosphaera plantaginis* montre une adaptation locale concernant la période de latence et la production de spores. Ces deux facteurs sont influencés par la température : la période de latence a été signalée comme étant plus grande à des températures non optimales (Nopsa et Pfender, 2014 ; Laine, 2008).

Dans l'optique du réchauffement climatique, une meilleure compréhension de la base génétique de l'adaptation thermique permettra de mieux comprendre la capacité des espèces à s'adapter aux fluctuations de température.

## **5.5 FITNESS LIE AUX CARACTERES QUANTITATIFS DE L'INTERACTION HOTE-PATHOGENE**

Les différents paramètres quantitatifs les plus couramment mesurés sont l'efficacité de l'infection, la période de latence, le taux de production de spores, la durée de la période infectieuse, la taille des lésions et, pour certains pathogènes, la production de toxines (Lannou, 2012). La variabilité de ces caractères est le reflet de la diversité génétique des individus qui intervient dans l'adaptation, la pathogénicité et la survie.

### **5.5.1 Etats des lieux des caractères**

Dans le cas du pathosystème blé-*Z. tritici*-, les paramètres étudiés se situent en fin du cycle infectieux (21 dpi), en évaluant par exemple le pourcentage des lésions sur la troisième feuille (Chartrain *et al.*, 2004 ; Arraiano et Brown, 2006). Cette donnée correspond à la surface de sporulation de la feuille infectée et indique la capacité de colonisation du tissu (Lannou, 2012). La capacité de sporulation peut être estimée en notant la densité des pycnides sur les feuilles infectées, ce qui permet d'évaluer le potentiel de la multiplication asexuée chez le champignon (Simon et Cordo, 1997). La taille des spores permet également d'évaluer ce potentiel (Delmotte *et al.*, 2014). En effet, ce paramètre peut influencer deux étapes clés du cycle infectieux : la dispersion et la germination. Des simulations ont montré que les spores d'un diamètre inférieur à 40  $\mu\text{m}$  présentent une dispersion similaire influencée par les mouvements d'air (Kuparinen *et al.*, 2007). Il faut nuancer le cas des spores de taille comprises entre 1-10  $\mu\text{m}$  dont la dispersion dépend de leur taille (Norros *et al.*, 2014). Par ailleurs, les spores de grande taille pourraient contenir davantage de réserves nutritives et donc avoir un meilleur taux de germination (Sadeghi *et al.*, 2011 ; Larios *et al.*, 2014).



Chez *Plasmopara viticola*, responsable du mildiou de la vigne, la taille des sporanges chez les oomycètes est corrélée avec le nombre de zoospores produites ; les grands sporanges auraient ainsi une plus grande probabilité d'infecter l'hôte (Demas *et al.*, 2014). Chez *Z. tritici*, le pouvoir pathogène entre ces deux types de spores (ascospores et pycnidiospores) a été étudié via la période de latence. L'infection par une ascospore est plus longue d'environ trois ou quatre jours, qu'une infection par une pycnidiospore (Morais *et al.*, 2015). Les auteurs expliquent ces différences par le fait qu'elles pourraient être dues à leur taille, les spores les plus grosses ayant davantage de ressources nutritives permettant une capacité d'infection supérieure.

La production de toxines représente une composante majeure de la pathogénicité de certains agents pathogènes. Chez *P. nodorum*, la présence de toxines (ToxA) contribue à la croissance du pathogène dans l'hôte (Frieser *et al.*, 2008). Cependant, ce paramètre n'est pas mesurable chez *Z. tritici* car aucune toxine n'a été détectée chez *Z. tritici*. Suffert *et al.* (2013) proposent une approche pour caractériser quantitativement le développement des lésions via l'analyse de dynamique temporelle de la croissance des lésions. La quantification directe de seulement cinq composantes de la maladie (la chlorose, la nécrose, la zone sporulante, le nombre de pycnides et le nombre de spores) a permis de déterminer 18 variables permettant d'avoir simultanément un ensemble complet de traits d'agressivité. Des corrélations positives significatives ont été trouvées dans cette étude entre plusieurs traits d'agressivité de *Z. tritici*, élargissant ainsi la gamme des corrélations rapportées auparavant, comme par exemple la corrélation entre la zone nécrotique et le nombre de pycnides (Eyal *et al.*, 1987), entre la période latente, la zone nécrotique et la densité des pycnides (Chartrain *et al.*, 2004) et enfin entre le nombre de spore et la densité des pycnides (Simon et Cordo, 1997). Curieusement, aucune corrélation négative n'a été identifiée, alors que les compromis entre les traits d'agressivité sont courants chez de nombreux phytopathogènes (Pariaud *et al.*, 2009 ; Lannou, 2012). Les auteurs évoquent le faible nombre d'isolats testés (4 souches) et la résistance de l'hôte, pouvant masquer d'éventuels compromis chez *Z. tritici*.

Sans surprise, les conditions environnementales, telles que la température ou la présence d'autres pathogènes, influencent fortement l'expression des composantes du *fitness*. Toutefois, les études démontrant cet impact sont habituellement réalisées dans des environnements contrôlés, qui peuvent différer considérablement des conditions naturelles. En effet, la densité de pathogène dans l'environnement influence la taille des lésions et la production de spores par lésion chez des pathogènes biotrophes, car les individus pathogènes sont en compétition pour les ressources de l'hôte et les tissus potentiellement colonisables (Pariaud *et al.* 2009). Cette dépendance de densité a des conséquences majeures pour les mesures expérimentales comme chez l'agent de la rouille où une forte densité diminue le taux de production de spores par lésion.



L'état physiologique de l'hôte influence l'expression du pouvoir pathogène, comme le stade de croissance, la photosynthèse, la teneur en azote et l'âge des tissus (Lannou, 2012).

## **5.5.2 Sélection des caractères quantitatifs liée à l'infection**

### **5.5.2.1 Caractères liés aux types du pouvoir pathogène**

Le pouvoir pathogène est défini comme la somme des capacités d'un agent pathogène à causer la maladie, comprenant la virulence (capacité spécifique à infecter et à causer la maladie) et l'agressivité (capacité non spécifique quantifiable par les dégâts provoqués) (Vanderplank, 1968). Elle est la résultante de l'interaction des composantes quantitatives de la résistance de l'hôte et du pouvoir pathogène du champignon. La sélection peut agir à la fois sur ces facteurs, entraînant un changement dans les populations conduisant à la co-évolution de l'interaction hôte-parasite.

Chez *Z. tritici*, l'évolution de l'agressivité des souches se fait grâce à la sélection réalisée par les cultivars tolérants à la maladie ainsi que par les fongicides (Cowger & Mundt, 2002). De nombreux articles suggèrent que l'emploi de cultivars de blé d'hiver sensibles à la maladie sélectionne des isolats agressifs (Kema et Van Sighout, 1997 ; Eyal, 1999 ; Cowger *et al.*, 2000 ; Cowger et Mundt, 2002). Cependant, Cowger et Mundt (2002) ont testé cette hypothèse sur un panel de cultivars de blé et de populations de *Z. tritici* et ont démontré l'inverse. En effet, les hôtes tolérants à la maladie vont sélectionner les individus les plus agressifs, possédant probablement un ou plusieurs caractères conférant un avantage vis-à-vis de l'hôte. Portées par plusieurs gènes, la résistance et l'agressivité ne sont pas spécifiques, les souches sélectionnées par un hôte tolérant possèdent probablement un ou plusieurs caractères conférant un avantage pour infecter les hôtes de même génotype. En effet, le modèle de Gandon et Michalakis (2000) prédit que l'augmentation des niveaux de résistance quantitative de l'hôte se traduira par une augmentation des dommages causés par un parasite à l'hôte. Suffert *et al.* (2015) ont testé la *fitness* d'isolats de *Z. tritici* prélevés en début du cycle épidémique et en fin de cycle épidémique. Ces derniers étaient plus agressifs avec une meilleure sporulation sous les conditions hivernales et une période de latence plus courte pendant le printemps que les isolats prélevés au début du cycle. Cette étude conclut sur une adaptation à deux caractères exprimés à deux périodes présentant des conditions environnementales différentes. Cela sous-entend que la saison possède un effet sur la *fitness* de *Z. tritici*.





### 5.5.2.2 Influence des fongicides sur l'agressivité

L'étude de Cowger et Mundt (2002) concluent que l'utilisation des fongicides comme le chlorothalonil, un multisite, sélectionne les souches les plus agressives et de façon significative par rapport aux souches provenant de parcelles non traitées. Yang *et al.* (2013) ont mis en évidence une corrélation positive entre la virulence et la tolérance au cyproconazole (famille des IDM). Même si ces deux études tendent à montrer une association entre ces 2 caractères quantitatifs, cette corrélation n'est peut-être pas la même selon les matières actives testées, et également selon l'endroit où les souches ont été isolées (adaptation locale à la pression fongicide). Toutefois, il est admis que les populations européennes de *Z. tritici* possèdent des tolérances similaires en raison du fort flux de gènes présents (Zhan *et al.*, 2003 ; Yang *et al.* 2013). Afin d'éliminer l'effet potentiel de la structuration de la population, Yan *et al.* (2013) informent que l'association positive entre ces deux caractères ne peut être attribuée à une adaptation locale ou la différenciation des populations. En effet, les souches étudiées ont été prélevées dans des champs non traités, et de surcroît, dans une région où l'utilisation des fongicides se fait rare. Les auteurs émettent l'hypothèse que les souches sont d'abord sélectionnées pour leur forte virulence sur un cultivar donné puis par un second facteur comme par exemple la résistance aux fongicides (Gandon et Michalakis 2000 ; Pariaud *et al.* 2009). Comme la résistance quantitative de l'hôte diminue le taux de croissance des pathogènes, les pathogènes peuvent compenser les taux de croissance plus faibles en évoluant vers une capacité concurrentielle (résistance aux fongicides), pouvant à son tour entraîner une virulence accrue.

### 5.5.2.3 Implication d'autres facteurs en lien avec l'agressivité

D'autres facteurs peuvent exercer une influence sur le pouvoir pathogène de *Z. tritici*, comme par exemple des mutations sur des gènes codant pour les effecteurs, les transporteurs d'efflux et la mélanisation, ainsi que dans les chromosomes accessoires. En effet, on sait que certaines familles multigéniques telles que les transporteurs ABC peuvent affecter à la fois l'agressivité et la sensibilité aux fongicides IDM avec leur rôle de détoxification (Stergiopoulos *et al.*, 2001). Il a été documenté que la mélanine peut augmenter d'une part, la résistance aux composés antimicrobiens en réduisant la sensibilité des cellules mélanisées et d'autre part, la virulence en interférant avec de nombreux mécanismes (Yang *et al.*, 2013). Chez *Z. tritici*, le gène pléiotropique *PKS1* impliqué dans la synthèse d'une mélanine (la dihydroxynaphtalène) aurait une fonction sur la croissance des souches (Lendenman *et al.*, 2015).



La présence de l'allèle 3D7 PKS1 augmente la mélanisation, conduisant ainsi à une croissance plus lente (donc une agressivité moindre) en présence et en absence du propiconazole (famille des IDM), tout en diminuant la sensibilité à ce fongicide (Anderson *et al.*, 2003 ; Lendenman *et al.*, 2015).

Ce modèle suit le paradigme général que les isolats fongiques avec plus de mélanisation sont moins sensibles aux fongicides mais présentent une croissance plus lente (Nosanchuk et Casadevall, 2006 ; Taborda *et al.*, 2008). Lendenman *et al.* (2015) ont montré que la présence de 4 chromosomes accessoires est associée à des augmentations faibles, mais significatives, de plusieurs traits de virulence.

#### **5.5.2.4 Le *fitness cost* de la virulence**

Le *fitness cost* lié à la virulence est la réduction de l'aptitude des agents pathogènes induite par une mutation liée à la virulence, définie dans le contexte de la relation gène pour gène proposé par Sidhu *et al.* (1975). Si la virulence d'un pathogène augmente, il est alors capable d'infecter plus de plantes tout en accumulant un *fitness cost* qui peut affecter sa capacité à se reproduire. Ce compromis a été décrit avec un modèle simple par Groth (1976). L'estimation du coût de la virulence peut s'avérer difficile, car l'effet du bagage génétique doit être éliminé lors de l'analyse des résultats. Montarry *et al.*, (2007) ont ainsi révélé l'existence d'un compromis chez *P. infestans* entre l'agressivité (la période de latence, la taille des lésions et la production de spores) et son taux de survie en hiver. Ainsi, une forte agressivité diminuerait le taux de survie des souches. Les souches les mieux adaptées sont celles présentant un équilibre entre l'agressivité et la survie.



# **Contexte et objectifs de la thèse**



## CONTEXTE DE LA THESE

Cette thèse a été mise en place dans le cadre de la Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE). Cette convention fait partie d'un programme de l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT), subventionnant les entreprises françaises qui engagent un doctorant pour conduire un projet scientifique dans l'entreprise, en collaboration avec un laboratoire de recherche. Pour cette thèse, l'accord CIFRE a été signé par l'entreprise Bayer CropScience et Yncréa Haut-de-France et réalisée dans le laboratoire multi-site régional en Biotechnologies et Agroalimentaire, Institut Charles Viollette (EA 7394).

*Zymoseptoria tritici* un champignon ascomycète hémibiotrophe responsable de la septoriose du blé, la maladie foliaire la plus fréquente et la plus nuisible sur cette culture. Quand les conditions environnementales lui sont favorables, elle peut causer jusqu'à 50% de pertes de rendement (Eyal, 1999). Ses modes de reproduction asexuée et sexuée, très actifs, lui permettent une propagation rapide à l'échelle locale (pycnidiospores issues de la reproduction asexuée dispersées par les éclaboussures de pluie) mais aussi sur des distances plus lointaines (ascospores issues de la reproduction sexuée dispersées par le vent). En France, *Z. tritici* est caractérisé par une très grande diversité génétique et une structuration de ses populations en plusieurs groupes génétiques, mettant en évidence sa forte capacité d'adaptation aux conditions agro-climatiques locales (El-Chartouni *et al.* 2011 ; Siah *et al.* 2018). L'analyse par marqueurs microsatellites d'une population de 240 souches issues de deux champs de blé du Nord de la France, a révélé une forte diversité et un important potentiel de reproduction sexuée de l'agent pathogène à l'échelle régionale (Siah *et al.*, 2018). Ces résultats sont obtenus dans le cadre d'un projet préliminaire à ma thèse auquel j'ai participé et ont été valorisés par un article présenté en annexe (annexe 3).

Actuellement, la lutte contre *Z. tritici* repose essentiellement sur l'utilisation des produits phytosanitaires conventionnels et l'exploitation des ressources variétales. Toutefois, la durabilité de ces stratégies de lutte au champ est de plus en plus compromise par l'apparition régulier de souches résistantes aux fongicides et le contournement fréquent des résistances variétales par le champignon. Cela est dû principalement à l'adaptation (*fitness*) du parasite caractérisant son potentiel adaptatif, qui est amplifié par sa reproduction sexuée active et continue, réalisant des brassages génétiques au champ. Ces recombinaisons génétiques permettent de générer de nouveaux génotypes pouvant présenter des caractères plus favorables à l'environnement du champignon comme par exemple l'adaptation aux fortes pressions fongicides, aux résistances variétales et aux températures fluctuantes.



La reproduction asexuée de *Z. tritici* intervient aussi dans son adaptation car les nouveaux génotypes mieux adaptés vont pouvoir se propager et se multiplier pour générer encore de nouveaux individus potentiellement mieux adaptés. La propagation rapide des résistances aux fongicides au sein des populations de *Z. tritici* est très probablement due à ses deux modes de reproduction mais aussi à son fort potentiel adaptatif. Par exemple, un travail préliminaire à cette thèse a mis en évidence une généralisation de la résistance aux strobilurines (à 100 %) au sein de la population régionale de *Z. tritici* (Cheval *et al.*, 2017). Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude à laquelle j'ai participé sont également valorisés dans un autre article présenté en annexe (annexe 2). Il est ainsi intéressant de comprendre le processus d'adaptation aux fongicides chez *Z. tritici* pour développer de nouvelles stratégies de protection et de pérenniser les moyens de lutte existants.



## OBJECTIFS

L'objectif principal de cette étude est de caractériser la résistance aux IDM dans le Nord de la France pour ensuite étudier la *fitness* de ces souches en lien avec la résistance. La progression des souches présentant de hauts niveaux de résistance est inquiétante, et aucune étude n'a jusqu'ici été menée pour évaluer le potentiel évolutif de ces souches. Ce projet de thèse vise donc, après caractérisation d'une population récente de *Z. tritici*, de comparer la *fitness* de souches de phénotypes de résistance aux IDM distincts par l'étude des composantes du pouvoir pathogène (comme la période de latence, la période d'incubation, les symptômes et la sporulation) et de la compétition entre souches *in planta*. Les résultats permettront de déterminer si la progression des souches hautement résistantes aux IDM sur le terrain peut être expliquée par leur *fitness*, comme des capacités d'infection et/ou de compétition, plus élevées. Par ailleurs, l'effet de la température sur l'expression des mécanismes de résistance aux IDM est également abordé, car aucune étude n'a jusqu'ici été menée pour déterminer si les résistances aux fongicides s'expriment quand les températures sont basses ou hautes durant les périodes d'application des fongicides (sortie d'hiver et fin de printemps).

Les résultats obtenus permettront de mieux comprendre l'évolution des souches résistantes aux IDM constatée sur le terrain ; ces souches étant à l'origine des résistances les plus problématiques actuellement sur la culture de blé. En outre, ils permettront également, en particulier pour Bayer CropScience, de contribuer à la recherche de stratégies adaptées pour limiter l'augmentation de la fréquence de ces souches fortement préoccupantes sur le terrain.



# Résultats



## ARTICLE 1 : DECIPHERING MECHANISMS UNDERLYING ZYMOSEPTORIA TRITICI RESISTANCE TOWARDS DEMETHYLATION INHIBITORS IN NORTHERN FRANCE

La septoriose, maladie foliaire causée par *Zymoseptoria tritici*, est actuellement la principale maladie du blé, en particulier dans le nord de la France, où les conditions agro-environnementales sont favorables au développement de la maladie. Au total, 100 isolats monospores de *Z. tritici* ont été collectés, sélectionnés pour n'obtenir que des génotypes distincts à l'aide de marqueurs microsatellites. Ces souches ont été caractérisées aux niveaux phénotypique et moléculaire afin d'examiner le statut de résistance dans cette région vis-à-vis des inhibiteurs de la déméthylation (IDM), les fongicides les plus utilisés pour lutter contre ce pathogène. Le séquençage du gène *cyp51* a révélé la présence de 18 altérations d'acides aminés au sein de l'enzyme CYP51, la cible des fongicides IDM; parmi celles-ci, cinq sont nouvelles et n'ont jamais été signalées (E6D, D176Y, F218L, L385M et T447I). Les analyses *in silico* de docking et de dynamiques ont montré que, parmi les nouvelles altérations détectées, seules F218L et L385M pourraient provoquer une diminution de l'affinité de liaison des IDM au site catalytique de CYP51. Les altérations L50S, D134G, V136A, I381V et Y461H sont les plus répandues dans la population, avec des fréquences de 100, 65, 71, 97 et 72 %, respectivement. Les 18 altérations ont regroupé la population en 23 haplotypes (combinaisons) du CYP51, avec un nombre d'altérations par haplotype allant de trois à huit. Les haplotypes les plus représentatifs sont H5 (L50S D134G V136A I381V Y461H) avec 64 % de la population, et H11 (L50S S188N I381V  $\Delta$ Y459-D460 N513K) avec 10 % de la population. D'autres analyses moléculaires ont montré que parmi les 100 isolats évalués, 15 d'entre eux (15 %) surexpriment le gène *cyp51* et sept d'entre eux (7 %) sont multirésistants (MDR). Le phénotypage des isolats vers cinq MDR (prothioconazole, metconazole, époxiconazole, tébuconazole et prochloraze) n'a révélé aucune corrélation entre les concentrations inhibitrices médianes (CI<sub>50</sub>) et les altérations du CYP51. Toutefois, les isolats MDR ont affiché des niveaux de résistance globalement plus élevés aux cinq IDM testées, tandis que les isolats surexprimant *cyp51* ont affiché des facteurs de résistance plus élevés uniquement contre le tébuconazole. Il est intéressant de noter que, parmi les trois mécanismes de résistance évalués, les altérations du CYP51 sont le plus important contributeur à la résistance aux IDM chez *Z. tritici* (de 62 à 99 % de la résistance totale, selon le fongicide considéré), suivi du caractère MDR (de 1 à 24 %) et de la surexpression du gène *cyp51* (de 0 à 14 %). La présence de mécanismes de résistance inconnus à la MDR est également suggérée pour *Z. tritici*, car une forte variabilité du niveau de résistance a été observée parmi les isolats portant des profils moléculaires identiques pour les trois mécanismes examinés. Dans l'ensemble, nos résultats fournissent de nouvelles informations sur les mécanismes de résistance





Article 1 : *Deciphering mechanisms underlying Zymoseptoria tritici resistance towards demethylation inhibitors in northern France*  
aux IDM chez *Z. tritici* et font le point sur leur prépondérance dans les populations fongiques du nord de la France.

**Mots-clés** : *Zymoseptoria tritici*, blé, fongicides IDM, altérations CYP51, MDR phenotype



## **Deciphering mechanisms underlying *Zymoseptoria tritici* resistance towards demethylation inhibitors in northern France**

M. Bomble<sup>1,2</sup>, M. Holvoet<sup>1</sup>, C. Tuffet<sup>2</sup>, C. Payet<sup>2</sup>, A. Farce<sup>3</sup>, J-L. Hilbert<sup>1</sup>, P. Brunner<sup>4</sup>, P. Halama<sup>1</sup>, A. Siah<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut Charles Viollette (ICV-EA 7394), ISA, Univ. Lille, INRA, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d'Opale, F-59000 Lille, France

<sup>2</sup> Bayer CropScience, 16 rue Jean-Marie Leclair, CS 90106, 69266 Lyon Cedex, France

<sup>3</sup> Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U995 - LIRIC - Lille Inflammation Research International Center, F-59000 Lille, France

<sup>4</sup> Plant Pathology, Institute of Integrative Biology, ETH Zurich, 8092 Zurich, Switzerland

Corresponding author: Ali Siah (ali.siah@yncrea.fr ; +33 3 28 38 48 48)



## Abstract

*Septoria tritici* blotch caused by *Zymoseptoria tritici* is currently the main disease on wheat, especially in northern France, where agro-environmental conditions are suitable for disease development. A total of 100 single-spore isolates of *Z. tritici* were collected, and first verified as different genotypes using microsatellite markers, were characterized at both phenotypical and molecular levels in order to examine the resistance status in this region towards demethylation inhibitors (DMIs), the most used fungicides to control this pathogen. Sequencing of the *cyp51* gene revealed the occurrence of 18 amino-acid alterations within the CYP51 enzyme, the target of DMIs fungicides; among them five are new and have never been reported (E6D, D176Y, F218L, L385M, and T447I). Docking and dynamic in silico analyses showed that, among these detected new alterations, only F218L and L385M might cause a decrease in the binding affinity of DMIs to the CYP51 catalytic site. Alterations L50S, D134G, V136A, I381V and Y461H are the most prevalent in the population, with frequencies of 100, 65, 71, 97, and 72 %, respectively. The 18 alterations clustered the population into 23 CYP51-haplotypes (combinations), with a number of alterations per haplotype ranging from three to eight. The most representative haplotypes are H5 (L50S D134G V136A I381V Y461H) with 64 % of the population, and H11 (L50S S188N I381V  $\Delta$ Y459-D460 N513K) with 10 % of the population. Further molecular assays showed that among the 100 assessed isolates, 15 of them (15 %) overexpress the *cyp51* gene and seven of them (7 %) are multidrug resistant (MDR). Isolate phenotyping towards five DMIs (prothioconazole, metconazole, epoxiconazole, tebuconazole and prochloraz) revealed no correlation between half-maximal inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) and CYP51 alterations. However, MDR isolates displayed overall higher levels of resistance to the five tested DMIs, while the *cyp51*-overexpressing isolates exhibited higher resistance factors only against tebuconazole. Interestingly, among the three assessed resistance mechanisms, CYP51 alterations are the most important contributor to DMIs resistance in *Z. tritici* (from 62 to 99 % of the total resistance, depending on the considered fungicide), followed by MDR character (from 1 to 24 %) and *cyp51*-overexpression (from 0 to 14 %). An occurrence of unknown DMIs resistance mechanisms in *Z. tritici* is also suggested since a strong variability in the resistance level was observed among isolates carrying identical molecular patterns for the three examined mechanisms. Taken together, our findings provide new insights into DMIs resistance mechanisms in *Z. tritici* and reports an update regarding their preponderance in the fungal populations of northern France.

**Keywords :** *Zymoseptoria tritici*, wheat, DMIs fungicides, CYP51 alterations, MDR phenotypes



## Introduction

Fungicides are currently the most efficient method to control wheat mycophytopathogens, including *Zymoseptoria tritici* (teleomorph: *Mycosphaerella graminicola*), the agent responsible for the Septoria Tritici Blotch (STB). This latter is the most frequently occurring and damaging disease on wheat crops, causing up to 50 % of yield loss, especially in regions where climatic conditions are suitable for STB development such as northern Europe (i.e. United Kingdom, Ireland), especially in northern France (Fones and Gurr, 2015). Several families of fungicides have been introduced to manage STB, including antimetabolites in the 1960's, Sterol Biosynthesis Inhibiting (SBI), such as demethylation inhibitors (DMIs), in 1970's, Quinone outside Inhibitors (QoI), referred also to as strobilurins, in the late 1990's, and more recently the next generation of succinate dehydrogenase inhibitors (SDHI) in the 2010's. Nevertheless, the important adaptation of *Z. tritici*, due to its frequent sexual reproduction and high gene flow, lead to appearance and dispersion of resistances to the most used fungicides (Fraaije *et al.*, 2005; Leroux *et al.*, 2007; Torriani *et al.*, 2015; Dooley *et al.*, 2016). In the case of QoI, a rapid apparition and widespread was observed within the European populations of *Z. tritici* early in the 2000's, due to a single amino-acid substitution (G143A) occurring in the mitochondrial cytochrome *b* protein (Fraaije *et al.*, 2005; Siah *et al.*, 2010). In 2015, this substitution is occurring in 99.6 % of northern of France population and is common in European population (Cheval *et al.*, 2017). Because of this resistance generalization, STB control relies today mainly on DMIs and SDHIs fungicides.

The DMIs family, including triazoles such as tebuconazole, epoxiconazole and metconazole, as well as derivatives such as imidazole (prochloraz) and triazolinthione (prothioconazole), is the most used fungicide in crop protection, with around 20 % of the market share (Price *et al.*, 2015). DMIs target the sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) enzyme that is involved in the ergosterol biosynthesis pathway, a fundamental component of the fungal cell membrane. However, the intensive use of DMIs fungicides to control *Z. tritici*, led to the development and the establishment of resistance in the field *Z. tritici* populations, since the early 1990s (Zhan *et al.*, 2007). In contrast to QoI, DMIs resistance is considered as polygenic and involve a combination of multiple mechanisms. The most common resistance mechanism is the presence of alterations in the *cyp51* gene, causing amino-acid substitutions in the CYP51 enzyme associated with a reduction in azole sensibility (Leroux *et al.*, 2007). Cools and Fraaije (2013) inventoried 34 alterations in *Z. tritici* field isolates and revealed the occurrence of specific combinations between these different substitutions. These combinations result from an accumulation of mutations within the *cyp51* gene, due to the emergence of new mutations or intragenic recombination and selective replacement (Brunner *et al.*, 2008). Many combinations



Article 1 : Deciphering mechanisms underlying *Zymoseptoria tritici* resistance towards demethylation inhibitors in northern France

affect the conformation of the catalytic site or the structure of the CYP51 enzyme, leading to a significant decrease in fungicide activity (Mullins *et al.*, 2011). Indeed, a correlation between the alteration combinations and DMIs resistance phenotypes have been reported (Fraaije *et al.*, 2005; Leroux *et al.*, 2007; Leroux and Walker, 2011; Cools *et al.*, 2013; Cools and Fraaije, 2013).

Other mechanisms involved in *Z. tritici* DMIs resistance were also reported, such as *cyp51* gene overexpression caused by the presence of a 120 pb insertion in the *cyp51* promoter, leading to a 7-16-fold increase in azole tolerance (Cools *et al.*, 2012; Cools and Fraaije 2013; Buitrago *et al.*, 2014; Kirikyali *et al.*, 2017). Chassot *et al.*, (2008) identified another insertion in the *cyp51* promoter (1000 bp approximately), but Omrane *et al.* (2015) reported that this insert is not associated with reduced azole sensitivity. However, the reduced sensitivity of *Z. tritici* to DMIs can be due to a reduced intracellular accumulation of the fungicides, resulting from an overexpression of the efflux transporter *MgMsf1* caused by the presence of a 519 bp insert in the promoter of the gene encoding this protein (Omrane *et al.*, 2015; 2017). This latter mechanism is in the origin of the highly resistant multi-drug resistant (MDR) phenotype, conferring cross-resistance to several fungicides (Omrane *et al.*, 2015). The MDR phenotype could also be due to an altered expression of efflux pumps encoded by ATP-binding cassette (ABC) transporters, but the role of this mechanism is unclear (Stergiouopoulos *et al.*, 2003).

Monitoring performed since the emergence of DMIs resistance revealed a gradual shift of DMIs sensitivity in *Z. tritici* populations, but this shift was accelerated over the past few years, due to an accumulation of a large number of CYP51 alterations associated with high resistance levels in field isolates, complicating STB field control. Leroux and Walker (2011) proposed a classification of DMIs-resistant genotypes into four main classes of DMIs-phenotypic resistance: wild type (TriS), low-resistant (TriLR), moderately resistant (TriMR) and highly resistant (TriHR). In these different classes, several resistance-types (R-types) are associated with single amino-acid substitutions or deletions in CYP51 enzyme, conferring resistance to specific molecules of DMIs. Previous studies have shown that the presence of particular alterations determines the level of resistance. For instance, L50S, S188N and N513K alterations did not confer any DMIs resistance (Leroux *et al.*, 2007; Cools and Fraaije 2012), while other common alterations such as D134G, V136A, I381V, Y461H and  $\Delta$ Y459-460 cause a reduced DMIs sensitivity. Likewise, *Z. tritici* strains having some alterations such as I381V are resistant to tebuconazole but remain sensitive to prochloraz, whereas other strains possessing V136A substitution are resistant to prochloraz but remain sensitive to tebuconazole (Leroux *et al.*, 2007; Fraaije *et al.*, 2007; Stammler *et al.*, 2008; Mullins *et al.*, 2011). These data indicate the complexity of DMIs resistance mechanisms in *Z. tritici*. Several reports showed an erosion of DMIs efficacy in the field and an increase of



Article 1 : Deciphering mechanisms underlying *Zymoseptoria tritici* resistance towards demethylation inhibitors in northern France

resistant genotypes, especially when using DMIs products with single a molecule (Jorgensen *et al.*, 2018), or when applied with high doses (Clark, 2006). Actually, managing strategy using other classes of fungicides as multi-site inhibitors with folpet or chlorothalonil ou SDHI, in association with a component of the DMIs. This family of fungicides is therefore essential for the control of STB.

DMIs resistance in *Z. tritici* has been surveyed in several wheat-producing regions in the world, especially in Europe where the highest levels of resistance were detected (Stammler and Semar, 2011; Cools *et al.*, 2012; Wieczorek *et al.*, 2015; Heick *et al.*, 2017). In France, previous studies have showed an occurrence of several resistant phenotypes with distinct levels of resistance towards DMIs (Leroux *et al.*, 2007; Leroux and Walker, 2011; Omrane *et al.*, 2015). However, no recent study was performed to determine the status of *Z. tritici* DMIs resistance in France, especially in the northern part of the country where STB pressure is very high and fungicide treatments are very frequent. Thus, the objective of the present study was to investigate DMIs resistance in *Z. tritici* populations from northern France and to characterize the corresponding resistance molecular mechanisms using phenotypic, genotypic and *in silico*-modeling assays. Such a study would provide new knowledge on the status and evolution of DMIs resistance in *Z. tritici*.

Our study is based on a population of 100 pycnidiospores from fungicide-untreated fields in the Northern France. An analysis of the sequences of the target for DMIs, *cyp51* gene with IC<sub>50</sub> values i.e, the concentration of a fungicidal compound, at which fungal growth is inhibited by 50 % (Gisi *et al.*, 2005; Stammler and Semar 2011) for 5 DMIs fungicides (prothioconazole, epoxiconazole, metconazole, tebuconazole and prochloraz) was done to determine the presence of *Z. tritici* resistant strains. The total sequence analysis of CYP51 may reveal the appearance of new mutations and promoter analysis could provide information on the presence of inserts involved in the overexpression of *cyp51* (Cools *et al.*, 2012). The presence of MDR individual presenting the 519bp insert described by Omrane *et al.* (2015) will also be presented in the study.



## Materials and methods

### Fungal collection and isolation

A total of 100 single-spore isolates of *Z. tritici* were collected in June 2016 from two locations of northern France: Tilloy-les mofflaines (50 isolates) and Lorgies (50 isolates). Fungal isolates were isolated according to the protocol described by Siah *et al.* (2018) from non-fungicide-treated and naturally infected wheat plants (cultivar Bergamo and Terroir). Briefly, wheat leaves with STB symptoms were incubated in a humid chamber during 48 hours for cirrus emission. Using a sterile needle, the cirrus was removed and then dissolved in 1 mL of sterile water. After spreading on potatoes dextrose agar medium (PDA), the petri dishes were placed at 20 °C for 7 days in the dark. For each leaf, a single colony was selected and transplanted on a new PDA plate.

The obtained isolates were then stored at -80°C for further analyses. An allelic diversity analysis was performed to remove existing clones in the population. Characterization using microsatellite markers according Siah *et al.* (2018) reported that all strains were different multi-locus-genotypes.

### DNA extraction, *cyp51* amplification and sequencing, and mating type determination

Genomic DNA was extracted from two-week PDA-growing culture of each strain, according to Siah *et al.* (2010b). Polymorphism of the *cyp51* gene was analyzed by sequencing, using PCR method and primers reported by Leroux *et al.* (2007). For ideal amplification and sequencing, *cyp51* gene was amplified to -207 at 1812bp in four parts: 5'-GAAACAGCGTGTGTGAGAGC-3' and 5'-GCGTTGACGTCCTTCAGTTT-3' for the first part (amplified 564, 764 or 1464bp fragments), 5'-CTGCTGGGAAAGAAGACGAC-3' and 5'-TCTTCTTCTGCGCATAATCG-3' for the second (555bp fragment), 5'-GGGATTCACACCGATCAACT-3' and 5'-AGTTTCGAGAGGTTGGCGTA-3' for the third (614bp fragment), 5'-CACTTTCATCTGCGACCGAGTC-3' and 5'-CTGCTGTAATCCGTACCCACCAC-3' for the last part (622bp amplification). This method did not detect the S524T mutation. PCR reactions were performed in a 50 µL volume containing 4 mM of MgCl<sub>2</sub>, 50 mM of reaction buffer, 0.2 mM of dNTPs, 0.05 mM of each primer and 0.07 U of Taq DNA polymerase (Fisher scientific). The amplifications were carried out using a C1000 Touch™ Thermal Cycler (Biorad) with the following temperature program: initial denaturation at 94 °C for 10 min; followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min; 60 °C for CYP A primers, 55 °C for CYP B and CYP C primers and 62 °C for CYP D primer; and 72 °C for 1 min, with final extension at 72 °C for 10 min. PCR products were visualized with GelRed™ (Interchim) under UV light after separations by electrophoresis on 1.5 % agarose gels. Amplicons were sequenced



in the Genoscreen platform (Lille, France) with Sanger method, using the forward and the reverse of each couple of primers as sequencing primers. *cyp51* sequences were assembled using CAP3 software (<http://doua.prabi.fr/software/cap3>). The assembled DNA sequences were translated into protein sequences using ExPASy SIB Bioinformatics Resource Portal with the translate tool (<https://web.expasy.org/translate>). The protein sequences were aligned and compared to CYP51 protein of the sensitive reference IPO323 strain using Clustal W, and analyzed using BioEdit V.7.0.4 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) for detection of amino acid alterations. Mating-types of the isolates were determined according to the protocol described by Siah *et al.* (2010b).

### Determination of *cyp51* overexpression and MDR phenotype

Overexpression of the *cyp51* gene was determined by detecting the 120 bp insert at position -83, by sequencing the fragments obtained after PCR amplification of the -207 to 355 bp *cyp51* region (Cools *et al.*, 2012). Sequences of all isolates were analyzed by Blast on the NCBI website (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) with the subject sequence indicate by Cools *et al.* (2012). MDR character within the strains was determined by amplifying the *MgMfs1* promoter using primers described by Yamashita and Fraaije (2017) for insertion detection in *MgMsf1* upstream translation start site. PCR conditions were the same as *cyp51* gene amplification, except for the annealing temperature (58°C for 30s). Amplicon separation was performed by migration on 1.5% agarose gel amended with GelRed™ (Interchim) for UV revelation.

### Half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) determination

Phenotypic assays to determine IC<sub>50</sub> of 100 *Z. tritici* strains against five DMI (prothioconazole-desthio, metconazole, epoxiconazole, tebuconazole and prochloraz; Pestanal®, Sigma-Aldrich) were performed on 96 wells plates according to Siah *et al.* (2010). For possible crossed resistance and confirming MDR phenotype, three others fungicides molecules: boscalid (SDHI), fluxapyroxad (SDHI) (for both, Pestanal®, Sigma) and tonalftate (Sigma) has been include in the study. Briefly, fungicides were first solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck) and were then transferred into an autoclaved glucose-peptone medium containing 14.3 g.L<sup>-1</sup> dextrose (VWR), 7.1 g.L<sup>-1</sup> bactopectone (Difco Laboratories), and 7.1 g.L<sup>-1</sup> yeast extract (Merck). The final used fungicide concentrations in plate wells were: 75, 25, 8.33, 2.78, 0.93, 0.31, 0.10, and 0.03 mg.L<sup>-1</sup>. Then, 50 µL of fungal spore suspension at 2x10<sup>5</sup> spores.mL<sup>-1</sup> were added to 150 µL medium with or without the different fungicides (200 µL final volume in each well). Fours replicates were used for each strain and each fungicide concentration. Controls, including medium with the fungus and medium without the fungus, were





used. After incubation for 6 days at 20°C in darkness and under horizontal shaking at 140 rpm, fungal growth was measured in a plate reader (Biotek Elx808) at 405 nm.

### **CYP51 protein structural analyses, docking and dynamic modelling**

A homology model of CYP51 protein was built from *Saccharomyces cerevisiae* lanosterol 14- $\alpha$  demethylase, which showed the highest sequence similarity. The chosen crystallographic dataset was 4LXJ (Monk BC). The heme of 4LXJ was transferred to the CYP51 model before a thorough geometry optimization. It was divided in three steps. First, a general checkup of the side chains, keeping the backbone and the heme rigid, was realized with 1,000 steps of steepest descent. Second, a soft 500 steps of conjugated gradient without any constraints, up to a gradient of 0, 5 Kcal/mol/Å pushed aside any residual strain in the backbone. The model was checked for inconsistencies in the backbone torsions and chiralities and side chain orientation or bad contacts and submitted to a last round of energy minimization with a further 1,000 steps of conjugated gradient. The final structure integrity was assessed with Silicon Graphics octane 2 workstation using the molecular modeling Package Sybyl 6.9.2 and its associated Tripos force field. The residues were mutated with the mutate monomer tool in Sybyl and in case of steric clashes, the mutant structure was minimized as described previously. The resulting wild type and mutant models were the inputs of a molecular dynamic protocol run under GROMACS (Berendsen), using the gromos54a7 force field and spc water and run on a Dell Precision T1700 quadricore workstation. The protocol was as follow: first an optimization of the solvated, neutralized system with 40K steps of 0.001 fs of steepest descent followed by 40K steps of 0.0001 fs of conjugated gradient, then an equilibration of the system with 100 ps of NVT and 300 ps of NPT and finally 4 independent production runs of 10 ns. The analysis of the dynamic runs was done with the tools provided in the GROMACS package, complementary analysis and illustrations with UCSF Chimera 1.13.1. The results were expressed as root mean square deviation (RMSD), showing the difference of the whole protein from its original conformation across the time and root mean square fluctuation (RMSF), expressing the individual residue movement during the simulation. Docking studies were realized with GOLD (Jones), with the binding site defined as a sphere of 7 Å around lanosterol extracted from 4LXJ, taking advantage of the conservation of the heme position. 30 solutions were generated and ranked using ChemScore. A further refinement was done by judging the consistency of the best scored solution by a visual inspection of its interactions and the overall superimposition of the 30 solutions.



## Statistical analyses

The fungicide sensitivity of each isolate against each tested DMI was determined by calculating the  $IC_{50}$ , using a dose-response relationship and nonlinear regression model according to the XLSTAT software<sup>®</sup> (Addinsoft). The representation of the  $IC_{50}$  values in heatmap form was done using the R software and the package heatmaply. For cross-resistance among the five tested DMIs and SDHI (only for MDR phenotype), Spearman's correlation analysis was performed by Graphpad Prism 8 (2018 GraphPad Software). Correlation between  $IC_{50}$  and mating-types was performed with t-test of difference of means, according to the XLSTAT software<sup>®</sup> (Addinsoft). Rarefaction analysis and the haplotype TCS network according promoter region of *cyp51* was done with PopArt (Clement *et al.*, 2002).



## Results

### Identification of CYP51 alterations and CYP51 haplotypes

A set of 100 single-spore *Z. tritici* isolates were sequenced for the *cyp51* gene in order to assess their resistance behavior to DMIs. Analysis of the obtained corresponding protein sequences revealed that all isolates have CYP51 amino-acid sequences distinct from that of the sensitive reference strain IPO323 (**Supplementary data 1**). Blast analysis highlighted 18 CYP51 sequence alterations, clustered into 23 haplotypes (**Table 1, 2**). Most of the identified alterations have already been reported, except five of them, which are new (E6D, D176Y, F218L, L385M, and T447I). However, these new alterations are present in only one isolate. The alterations L50S, D134G, V136A, I381V and Y461H are the most prevalent in the population, with frequencies of 100, 65, 71, 97 and 72%, respectively. The population is 81 % composed by haplotypes with five alterations (**Table 1**). The two most representative haplotypes are H5 (L50S D134G V136A I381V Y461H) with 64 % of the population, and H11 (L50S S188N I381V ΔY459-D460 N513K) with 10 % of the population. The remaining isolates have 3 to 8 amino-acid changes, represented by one or two isolates (**Table 1**).

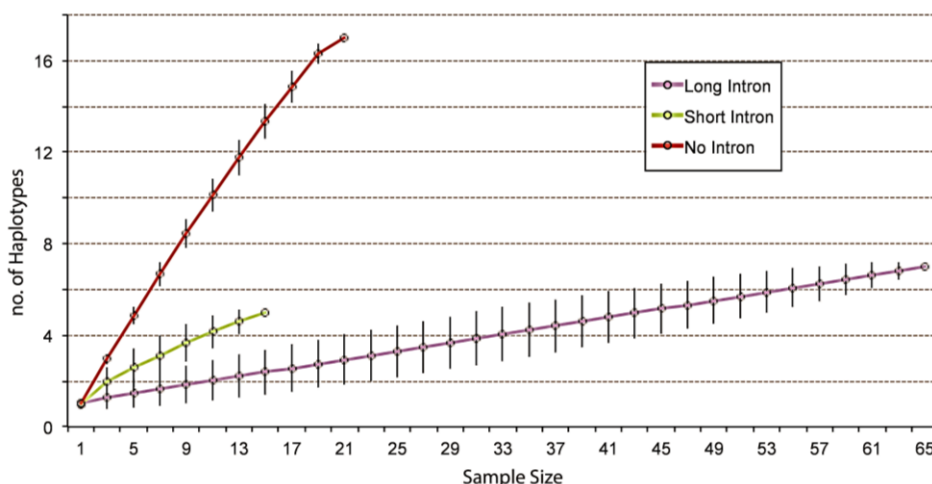
### Detection of *Z. tritici* isolates overexpressing *cyp51* gene or with MDR phenotype

The promoter region -207 to 355 bp of the *cyp51* gene has been amplified by PCR in order to evaluate the overexpression of this gene. Three amplification profiles were visualized. The first (20 % of the isolates) contains no insertion and is comparable to that of the reference strain IPO323, the second (15 % of the isolates) present a 120 bp insert, and the last one (65 % of isolates) show an approximatively 1000 bp insert. After sequencing, the 120 bp insertion was identified as that conferring the overexpression, as described by Cools *et al.* (2012). The 1000 bp insert could only be partially sequenced because of its large size. Rarefaction analysis of the *cyp51* promoter reveal that the long intron (1000 bp) is present in seven haplotypes, especially in H5, the most prevalent in our population. The absence of an intron was detected in a smaller sample (concerns 20 individuals) but indicate a greater richness in terms of diversity with 17 haplotypes (**Figure 1**). In order to trace the evolutionary history of CYP51 haplotypes, a network was developed based on the mutations/indels observed for the latter (**Figure 2**). This network of haplotypes revealed 2 founding haplotypes of the population (N°3 and 19 on the TCS network). The promoter region -470 to -6 bp of the *MgMSF1* gene involved in the MDR phenotype was also amplified by PCR. Only seven isolates showed the presence of an insert conferring the MDR character.

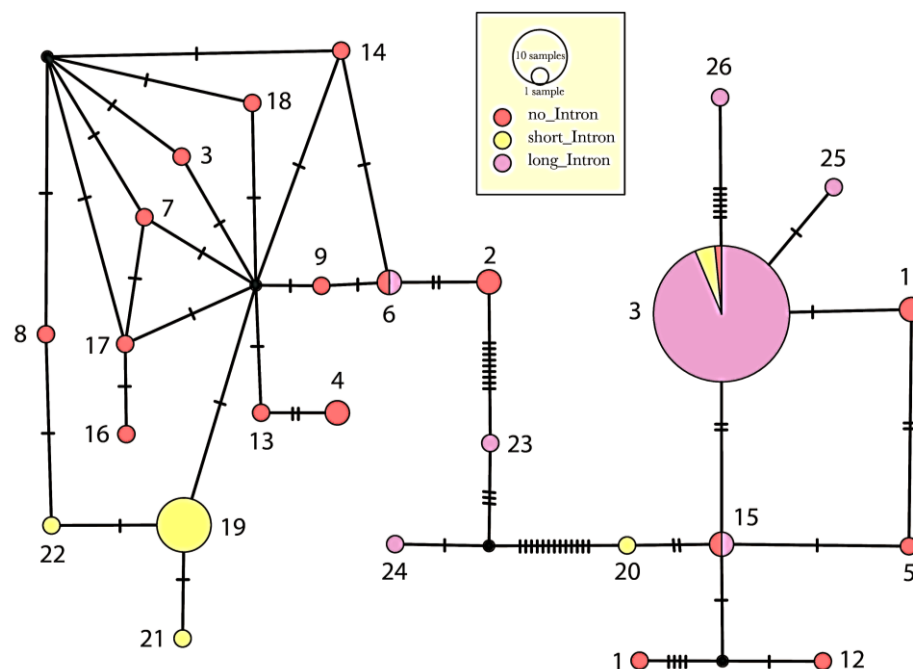


Article 1 : Deciphering mechanisms underlying *Zymoseptoria tritici* resistance towards demethylation inhibitors in northern France

Among the 100 tested isolates, no isolate cumulates MDR character and *cyp51* overexpression. However, all isolates with MDR character or overexpressing *cyp51* have CYP51 alterations linked to resistance.



**Figure 1** Rarefaction analysis of the promoter of the *cyp51* gene of *Z. tritici*. Three types were identified: no insert (promoter identical to the reference isolate IPO323), a short 120bp intron causing overexpression of the gene as identified by Cools *et al.* (2012) and a long 1000bp intron.



**Figure 2** TCS Network regrouping haplotype according intron insert : no intron corresponding to the reference strains IPO323, short intron corresponding to overexpression insert identified in Cools *et al.* (2012) and long intron corresponding to 1000bp sequence

**Table 1.** CYP51 haplotypes obtained from 100 isolates of *Zymoseptoria tritici* by *cyp51* gene sequencing (IPO323 considered as reference)

Number of alterations <sup>a</sup>	Haplotype CYP51 <sup>b</sup>	Haplotype code <sup>c</sup>	Number of strains
3	L50S I381V Y461H <sup>1,2,3</sup>	H1 (C8)	2
	L50S I381V Y461D <sup>1,2,3</sup>	H2 (C4)	1
4	L50S V136C I381V Y461H <sup>1,3</sup>	H3	1
	L50S I381V Y461H N513K	H4	1
5	L50S D134G V136A I381V Y461H <sup>1,2</sup>	H5 (E4)	64
	L50S V136A S188N ΔY459-D460 N513K	H6 (F5)	1
	L50S V136A S188N I381V ΔY459-D460	H7	1
	L50S V136C S188N I381V Y461H <sup>1,2</sup>	H8 (E8)	1
	L50S V136C S188N ΔY459-D460 N513K <sup>1,4</sup>	H9	2
	L50S S188N I381V ΔY459-D460 N513K <sup>1,2,3</sup>	H10 (F2)	10
6	L50S V136C S188N A379G ΔY459-D460 N513K	H11	2
	E6D L50S V136C S188N I381V Y461H	H12	1
	L50S D134G V136A I381V Y461H N513K	H13	2
	L50S D176Y S188N I381V ΔY459-D460 N513K	H14	1
	L50S S188N F218L I381V ΔY459-D460 N513K	H15	1
	L50S S188N A379G I381V ΔY459-D460 N513K <sup>1,2,3</sup>	H16 (G1)	1
	L50S V136A S188N A379G I381V ΔY459-D460	H17	2
7	L50S V136A S188N A379G I381V ΔY459-D460 N513K	H18	1
	L50S S188N N284H A379G I381V ΔY459-D460 N513K <sup>3</sup>	H19 (H3)	1
	L50S S188N F218L A379G I381V ΔY459-D460 N513K	H20	1
	L50S S188N A379G I381V L385M ΔY459-D460 N513K	H21	1
	L50S S188N A379G I381V A410T ΔY459-D460 N513K <sup>1,3</sup>	H22 (H5)	1
8	L50S S188N A379G I381V A410T T447I ΔY459-D460 N513K	H23	1

<sup>a</sup> Double deletion Y459-D460 was counted for unique alteration.

<sup>b</sup> Alterations reported by : 1. Huff *et al.*, 2018; 2. Buitrago *et al.*, 2014; 3. Lucas *et al.*, 2013; 4. Leroux & Walker, 2011.

<sup>c</sup> Haplotype code generated for our study, between in parenthesis correspondence with proposed nomenclature in Huff *et al.*, 2018.



**Table 2.** List and frequency of CYP51 substitutions found in 100 *Zymoseptoria tritici* strains collected from northern France. Mutations effect prediction of their functional consequences using *in silico* analyses was performed by three approach: sequence analysis, structural analysis and docking analysis.

CYP51 substitution	Occurrence frequency	Approach used	Functional consequences
E6D*	1	Sequence analysis	No effect potentially. Substitution located on the surface of the extracellular sheet of the transmembrane domain so far from the catalytic part of the enzyme.
L50S*	100	Sequence analysis	No effect potentially. Substitution located on the surface of the extracellular sheet of the transmembrane domain so far from the catalytic part of the enzyme.
D134G	65	Structural analysis	Potential strong effect
V136A	71	Docking	Potential strong effect. Potential modification of the point of heme's fixation environment.
V136C	7	Docking	Potential strong effect. Modification of the point of heme's fixation environment.
D176Y	1	Structural analysis	No potential effect. Substitution located (at the surface) outside the binding site.
S188N	29	Structural analysis	No potential effect. Substitution located outside the binding site.
F218L	1	Dynamic	Potential strong effect. Affects protein stability, causing a higher flexibility of the felexible part of the protein
N284H	1	Structural analysis	No potential effect. Substitution located (at the surface) outside the binding site.
A379G	11	Structural analysis	Potential slight effect. Induce higher flexibility of the biding site. As A and G differs only in one carbon, the difference should be low.
I381V	97	Docking	Potential strong effect. Induce direct interaction between the ligand and the protein catalytic site
L385M	1	Docking	Potential strong effect. Induces direct interaction between the ligand and the protein catalytic site.
A410T	2	Dynamic	Potential slight effect. Can destabilize the beta sheet and the steric hindrance of the catalytic site.
T447I	1	Structural analysis	No potential effect. Substitution located (at the surface) outside the binding site.
ΔY459-G460	27	Structural analysis	Potential strong effect. Modification of the heme attachment.
Y461D	1	Structural analysis	Potential slight effect. Substitution is outside the binding site but induces a modification of the heme attachment.
Y461H	72	Structural analysis	Potential slight effect. Modification of the steric hindrance at the local level resulting in a modification in the position of Y459
N513K	25	Structural analysis	No potential effect. Substitution is outside the binding site and no direct effect on the heme

\*No structural reference model.

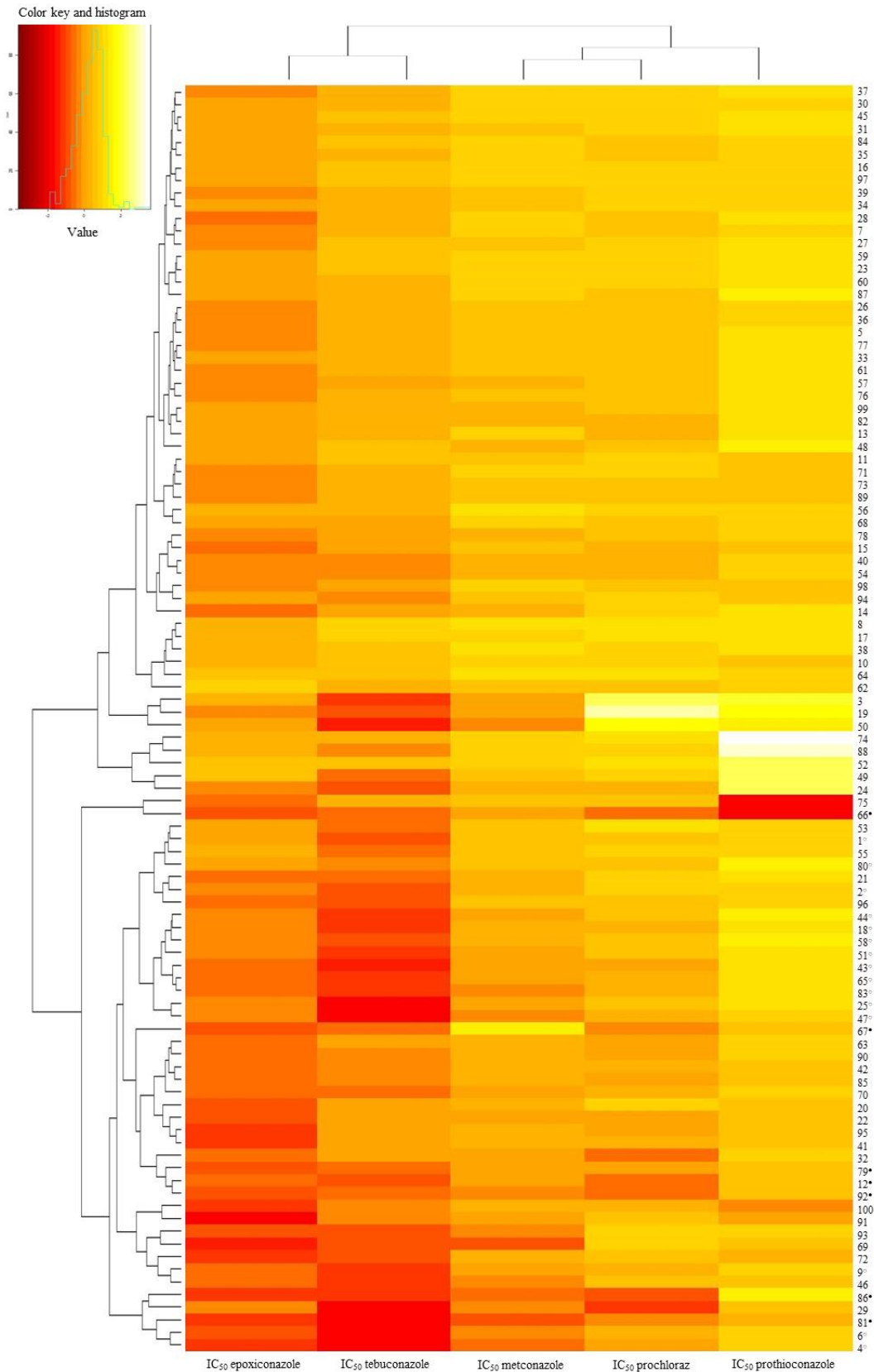


## Resistance phenotypic diversity of the isolates

All *Z. tritici* isolates were tested using microplate assays for their resistance levels against five DMIs (tebuconazole, metconazole, epoxiconazole, prothioconazole and prochloraz). Results highlighted a strong variability of the sensitivity levels among the isolates and the fungicides, as revealed by the heatmap (**Figure 3**) and the corresponding  $IC_{50}$  values (**Supplementary data 2**). All tested isolates showed  $IC_{50}$  values higher than the sensitive reference isolate IPO323, thus confirming the results found at the molecular level with *cyp51* sequencing. Overall, the isolates showed higher  $IC_{50}$  values for tebuconazole and epoxiconazole (6.8 and 3.91 mg.L<sup>-1</sup>, respectively) when compared to metconazole, prothioconazole and prochloraz (0.69, 0.68, and 1.66 mg.L<sup>-1</sup>, respectively). Nevertheless, in average, the higher resistance factor (ratio of  $IC_{50}$  value of a given isolate on  $IC_{50}$  value of the reference isolate IPO323) was observed for prothioconazole (680), followed by epoxiconazole (130), tebuconazole (97), prochloraz (69), and metconazole (17). Regarding the distribution of the isolates, these later seem to cluster into two groups, according to their sensitivity profiles towards the five fungicides. The first contains isolates with low to moderate resistance levels, while the second corresponds to isolates with, overall, high resistance levels to the tested fungicides (**Figure 3; Supplementary data 2**). Spearman correlative analysis revealed a positive cross-resistance between all tested DMIs, except between prothioconazole and tebuconazole ( $r = 0.07$ ) and between prothioconazole and metconazole ( $r = 0.074$ ) (**Figure 4**).

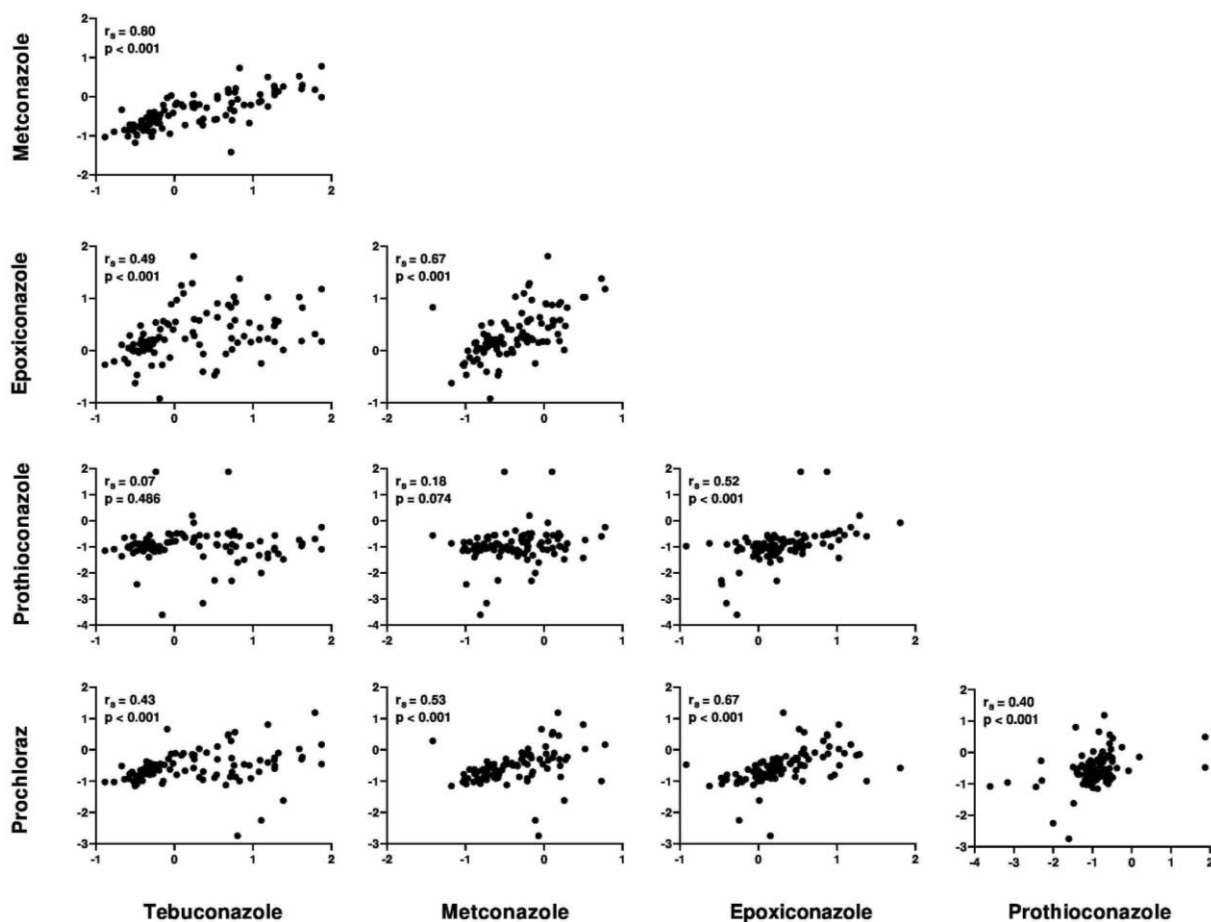
## Correlations between the genotype and the phenotype

Overall, all isolates with MDR character, and at lesser extent isolates overexpressing the *cyp51* gene, reflected a high  $IC_{50}$  values (**Figure 5**). In average, isolates with *cyp51* overexpression exhibit higher resistance levels ( $IC_{50}$ ) against tebuconazole and slightly against metconazole than the isolates lacking this character (**Figure 5**). The isolates with MDR character showed higher levels of resistance when compared to those lacking this character. Both MDR character and *cyp51* overexpression seem to confer close levels of resistance to tebuconazole (**Figure 5**). The importance of the MDR character in resistance was confirmed by the determination of  $IC_{50}$  averages for the same haplotypes (having the same alteration combinations) but differing only in the MDR character, such as H5 (L50S D134G V136A I381V Y461H), the most prevalent in the population. Indeed,  $IC_{50}$  averages of H5 haplotype with MDR character are overall higher than those of the H5 haplotype having only CYP51 alterations (**Figure 6**). Regarding the CYP51 alterations, our results cannot allow us to conclude reliably about the importance of each alteration in resistance since no isolate with a single CYP51 alteration was detected.

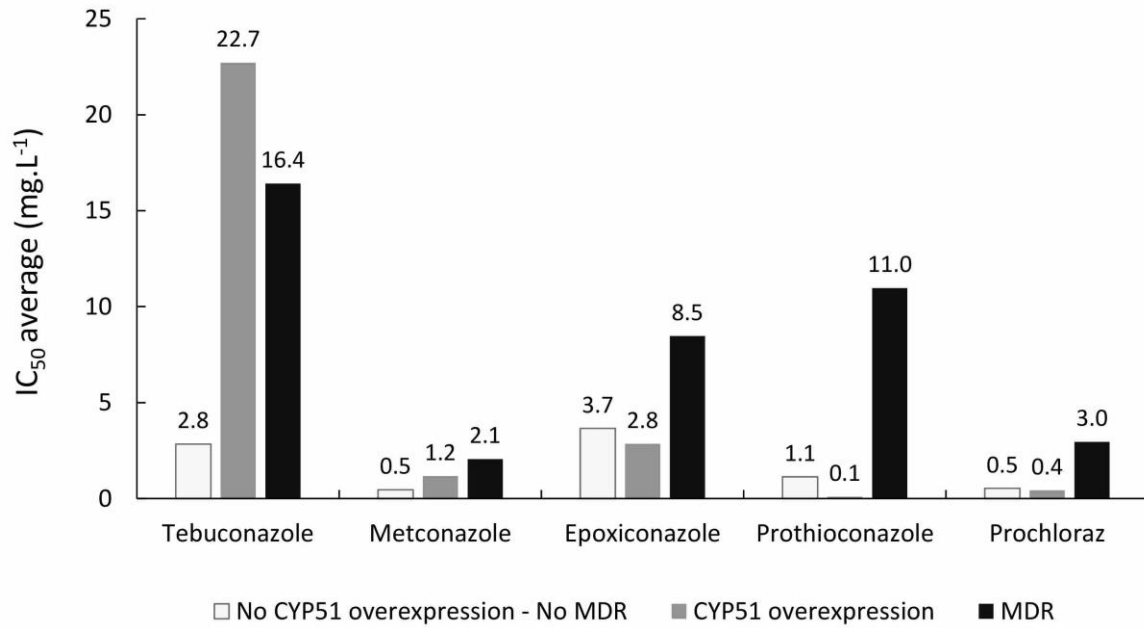


**Figure 3.** Heatmap of IC<sub>50</sub> (mg.L<sup>-1</sup>) towards five DMIs fungicides (tebuconazole, epoxiconazole, metconazole, prothioconazole and prochloraz) obtained for 100 *Z. tritici* strains from northern France. Black dot corresponding to MDR phenotype and white dot, at *cyp51* overexpression.

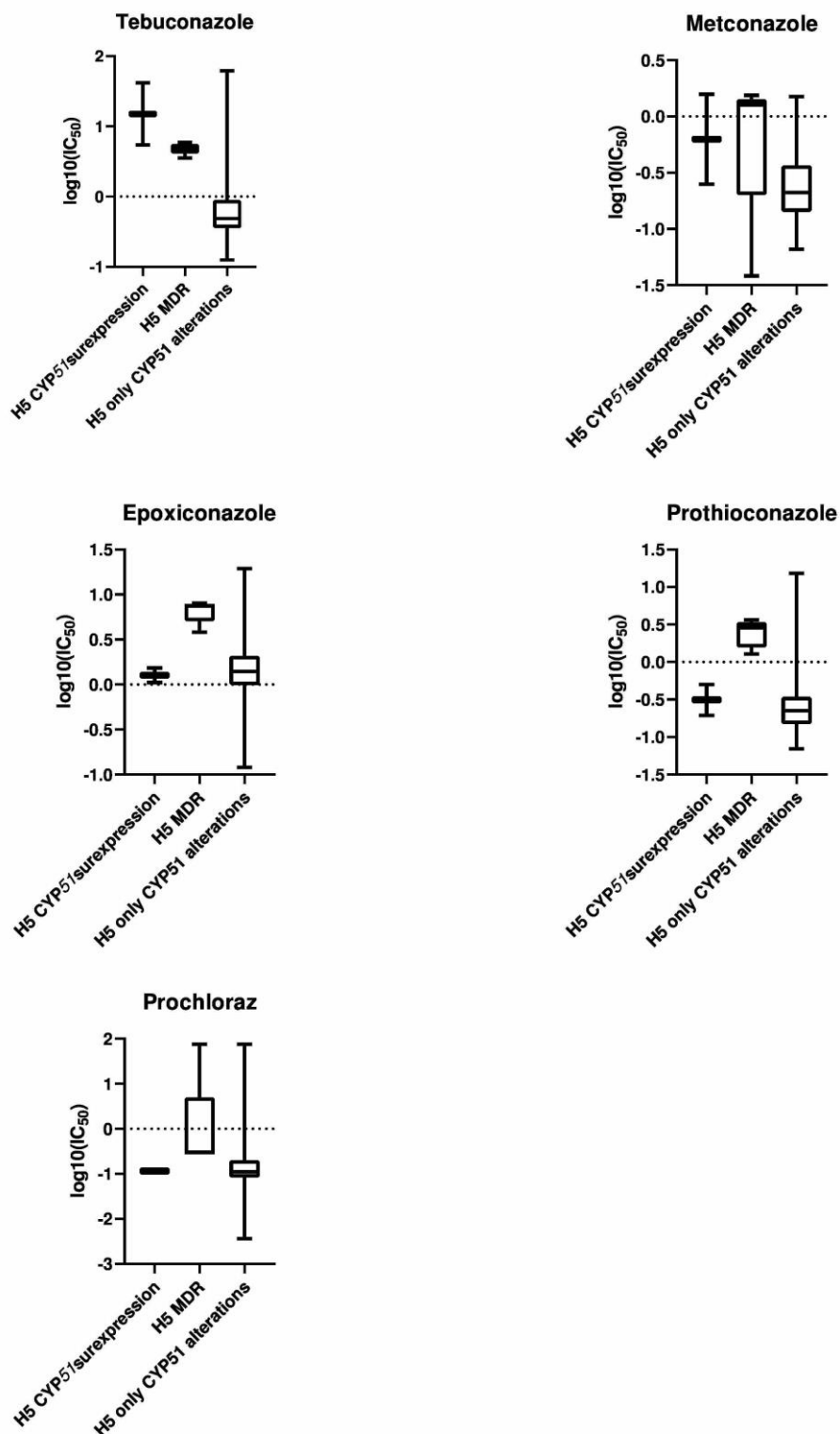




**Figure 4.** Spearman’s correlations between five DMIs for *Zymoseptoria tritici* isolates (n=100). P < 0.001 means the correlation was statistically significant.



**Figure 5.** Average of  $IC_{50}$  values towards five DMIs fungicides among *Zymoseptoria tritici* strains belonging to three different DMIs-resistant groups ( $n = 100$ , with  $n = 78$  for strains not overexpressing *cyp51* gene and without MDR phenotype,  $n = 15$  for strains overexpressing *cyp51* gene, and  $n = 7$  for strains with MDR phenotype). Values on the sticks indicate the averages of  $IC_{50}$  values.



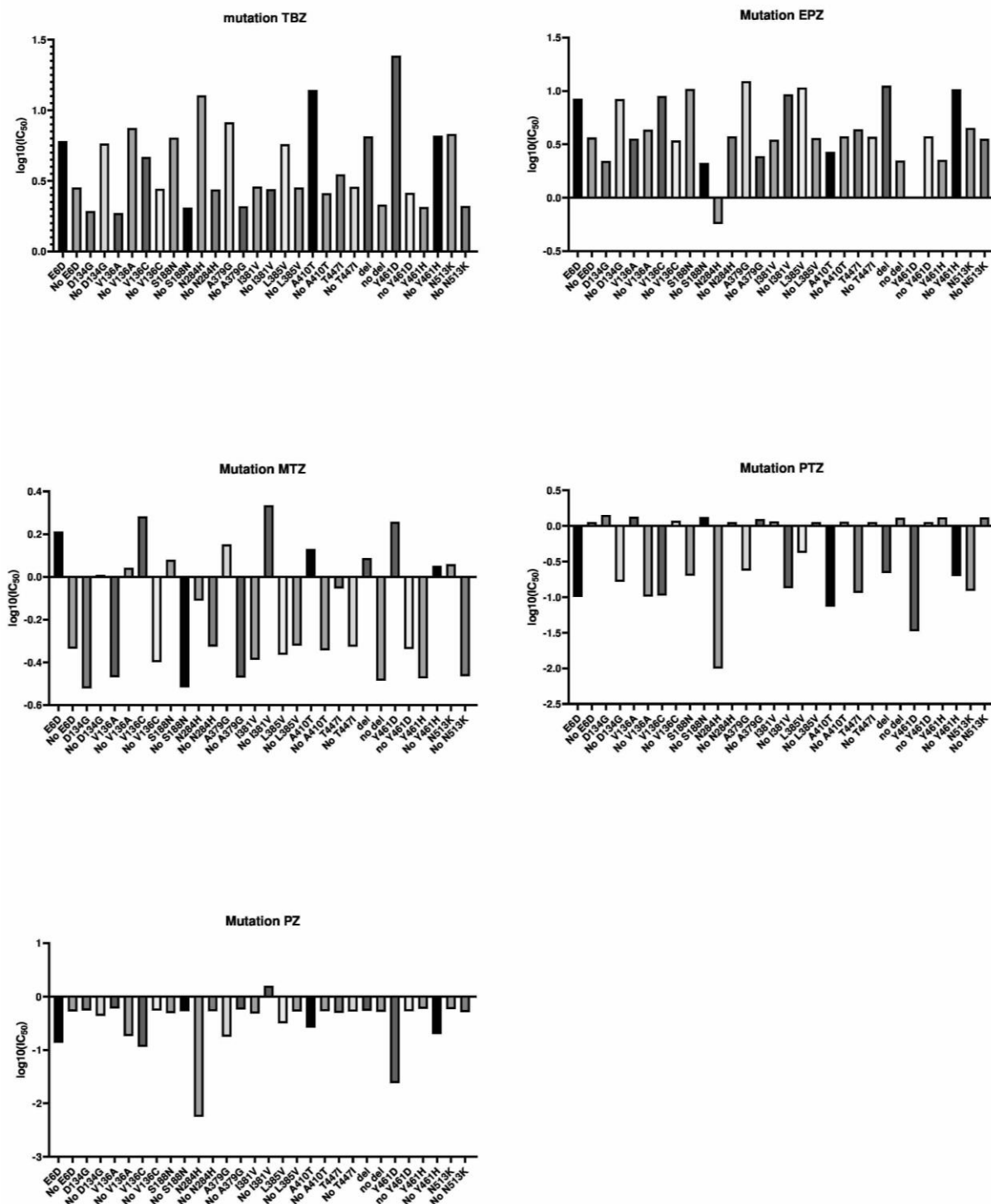
**Figure 6.** Representation of  $IC_{50}$  for 5 DMIs of H5 haplotypes with only CYP51 alterations (n=57), alterations with *cyp51* overexpression (n=2) and alterations with MDR phenotype (n=5).



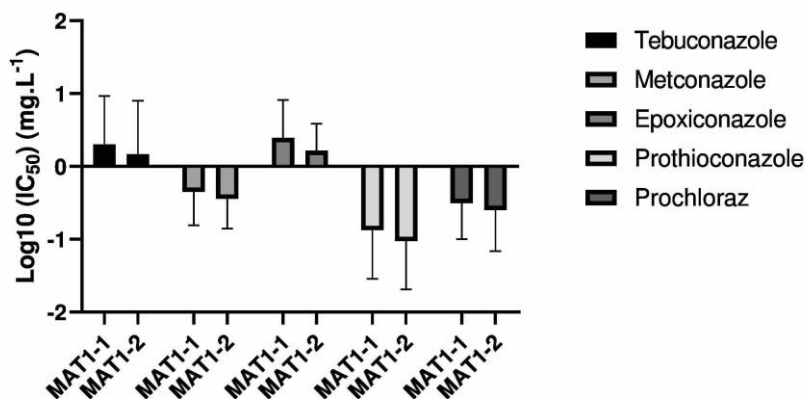
However, our results suggest an effect of most of the detected alterations on resistance since all IC<sub>50</sub> values of isolates having only alterations and without *cyp51* overexpression or MDR character were higher than those of the reference strain IPO323 (**Figure 5, Supplementary data 2**). However, a comparison of haplotypes differing in only one alteration and did not show neither *cyp51* overexpression nor MDR character (15 haplotypes in total) revealed differences in their IC<sub>50</sub> values (**Figure 7**). The presence of some alterations (such as E6D for metconazole) seems to increase the level of resistance, while others (such as D134G for metconazole) seem to decrease the level of resistance (**Figure 7**), thus suggesting an effect of some alterations on resistance. Finally, no correlation between the mating-types of the isolates and their resistance levels (IC<sub>50</sub> values) towards the five tested DMIs, as revealed by the *t*-test values for tebuconazole ( $P=0.34$ ), metconazole ( $P=0.26$ ), epoxiconazole ( $P=0.57$ ), prothioconazole ( $P=0.26$ ), and prochloraz ( $P=0.38$ ) (**Figure 8**).

### Contribution rate of each molecular resistance mechanism to DMI resistance

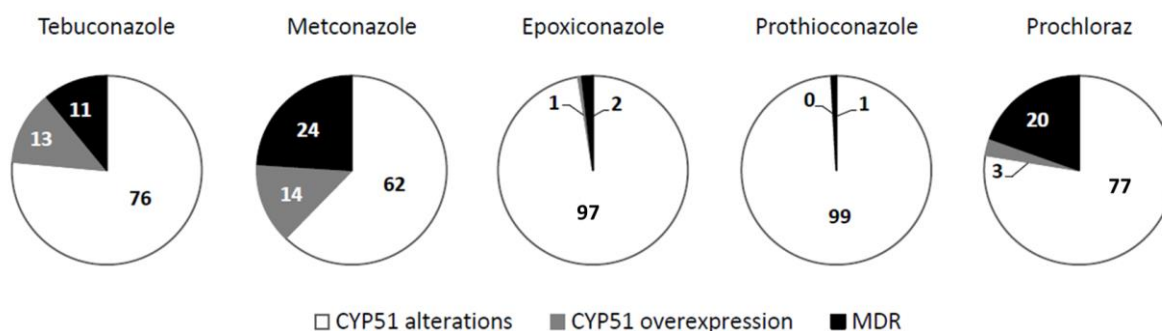
The contribution of each molecular mechanism (CYP51 alterations, CYP51 overexpression and MDR character) to the observed phenotypic resistance level (IC<sub>50</sub>) was analyzed in order to determine the mechanism contributing the most to DMIs resistance (**Figure 9**). This analysis was carried out using the average of the resistance factors observed for the three types of isolates (isolates with CYP51 alterations only, isolates with CYP51 alterations and overexpressing *cyp51* but not MDR, and isolates with CYP51 alterations, not overexpressing *cyp51* but MDR). The results revealed that, as a percentage of contribution, CYP51 alterations is the most important contributor to DMIs resistance in *Z. tritici* (by 62 % to 99 %, according to the fungicide), followed by MDR (by 1 % to 24 %, according to the fungicide) and then CYP51 overexpression (by 0 % to 14 %, according to the fungicide) (Figure 9). Therefore, MDR character, and at lesser extent *cyp51* overexpression, tend to increase in the isolates the already very high resistance levels conferred by CYP51 alterations. The contribution of CYP51 alterations to resistance is much more marked for epoxiconazole and prothioconazole, indicating that resistance towards these two fungicides in *Z. tritici* is due mainly to the presence of CYP51 alterations (**Figure 9**). Cross-resistance was tested for MDR and *cyp51* overexpression strains with the two molecules of the SDHI family (boscalid and fluxapyroxad) and a discriminative fungicide of the MDR strains (tolnaftate). Spearman correlation was detected with boscalid and metconazole ( $r=0.929$ ,  $p=0.007$ ) for MDR strains. For *cyp51* overexpression, Spearman correlation was found with boscalid and fluxapyroxad ( $r=0.571$ ,  $p=0.029$ ).



**Figure 7.** Effect of acid amino polymorphism in the CYP51 on the resistance to the 5 DMIs (tebuconazole (TBZ), epoxiconazole (EPZ), metconazole (MTZ), prothioconazole (PTZ) and prochloraz (PZ)). Resistance is expressed according to the  $IC_{50}$  values for each mutation.



**Figure 8.** Effect of mating-type on DMIs resistance on 100 strains. The population has a ratio of 50:50 for each mating-type. No significant differences could be observed according to the IC<sub>50</sub> of 5 DMIs tested.



**Figure 9.** Contribution of each resistance mechanism to the total observed resistance in 100 *Zymoseptoria tritici* strains towards five DMIs fungicides. Values percentages calculated from averages of resistance factors obtained for strains with only CYP51 alterations (n = 78), strains with CYP51 alterations and overexpression (n = 15), and strains with CYP51 alterations and MDR character (n = 7).

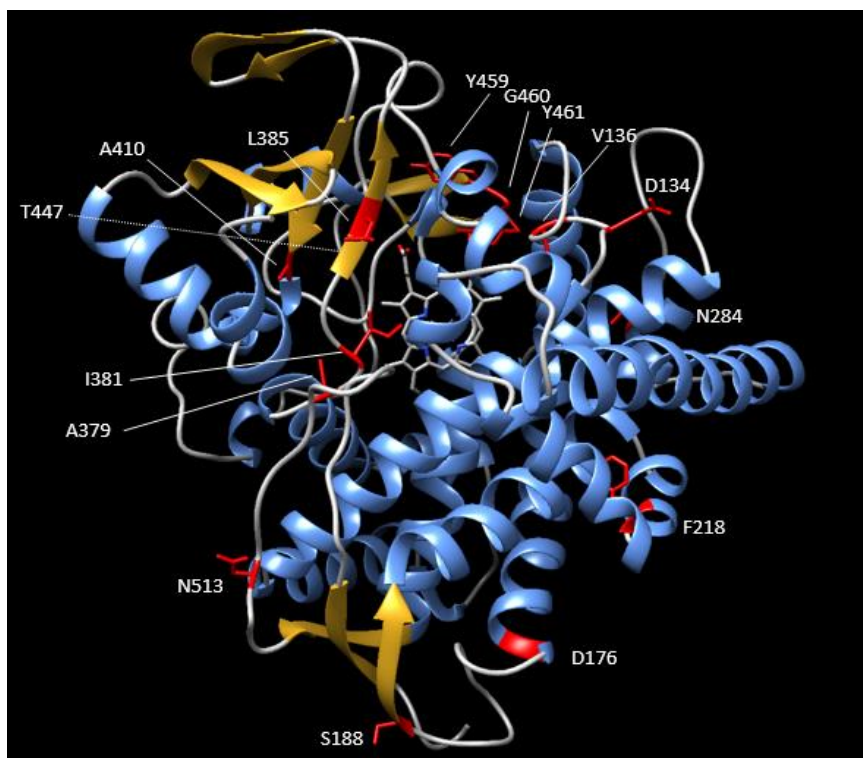


### Potential unknown additional mechanisms involved in DMI *Z. tritici* resistance

A complementary analysis was performed in order to examine the occurrence of additional mechanisms involved in *Z. tritici* resistance to DMIs. This analysis was carried out by measuring the IC<sub>50</sub> variability for the same fungicide within isolates having the same molecular pattern for all investigated resistance mechanisms (isolates with same CYP51 alterations and identical for *cyp51* overexpression and MDR character). The results obtained with the H5 haplotype (the most prevalent in the population) showed a great variability of the IC<sub>50</sub> values (as illustrated by high standard deviations), even within isolates with identical molecular profiles for the three tested mechanisms (**Figure 6**), thus suggesting the presence of other mechanisms involved in resistance of *Z. tritici* to DMIs. The observed variability is stronger within isolates showing only CYP51 alterations, due likely to the higher sample size of this H5 haplotype category.

### Structural analyses

The alignment produced a high degree of conservation of the residues lining the catalytic site, in particular the residues in direct interaction with the heme moiety (**Figure 10**) indicated by an X and H overhead respectively). It is not surprising, as the sequence identity is of 46.4% and the homology rises to a high 68.3%. Moreover, lanosterol 14- $\alpha$  demethylase is also a CYP51 enzyme, giving a close structural reference to the homology protocol. The resulting model proved fine under structural scrutiny by Ramachandran plot (**Supplementary data 4**). Only 14 residues were outside the generously allowed profil, of which only 3 were not prolines or glycines (Val 136, Ser 352 and Glu 454). Among them, Val 136 was one of the mutated residues, and it was only a few degrees away from the accepted restrictions profil. This may result from a slight overoptimization of the geometry and is not conclusive on the steric restrictions around this position. The investigated mutations are D134G, V136A and V136C, D176Y, S188N, F218L, N284H, A379G, I381M, L385M, A410T, Y459D, Y459 and G460 deletion, Y461H and N531K. A Chimera session is available in supporting information for an easier interaction with the model (colorprep.pyc). Please take note that there are two gaps in the numbering of the sequence (V347-S352 and K441-A453). While the sequence is in a single thread and these residues both adjacent and linked, there was a slight difference in numbering scheme between the homology model and the full length protein sequence due to some exon and to keep the numbering scheme consistent throughout the parts of this study, we chose to keep a single, biology derived numbering scheme.



**Figure 10.** CYP51 alterations localisation on the structural model building built from the crystallographic dataset of *Saccharomyces cerevisiae* lanosterol 14- $\alpha$  demethylase.

## Docking

Epoxiconazole, metconazole, prochloraz, prothioconazole and tebuconazole were docked in the four following mutants: V136A, V136C, I381V and L385M (**Supplementary data 5**). These mutations are present in the population respectively in the number of 71, 7, 97 and 1%. Interestingly, mutating the valine in position 136 does not modify drastically the binding mode, with nearly the same conformation for all the ligands tested. However, a slightly larger dispersion of the 30 solutions around an archetypal image of the binding mode was found for its mutation by an alanine, showing that the wider binding site is less optimal for tebuconazole, prochloraz and metconazole. On the contrary, epoxyconazole showed an increase in the number of solutions pointing their triazol toward the iron. With a cysteine in place of the valine, this effect is much reduced, with only metconazole showing this phenomenon. Tebuconazole and epoxiconazole have an increased number of solutions interacting with the iron. All the inhibitors present again a large dispersion around a nearly single binding mode with the triazol interacting with the iron of the heme, except prothioconazole, which has only a fourth of the solutions in such an interaction, in respect with a half for the wild type enzyme. The shorter side chain of the mutant does little to restrain the placement of the ligands, but also allows for an easier fit with the heme. Lastly, the effect of the L385M mutation increases the number of iron-interaction





solutions for tebuconazole and epoxyconazole, but reduces it slightly for prothioconazole, from one half of the solutions to one third. Prochloraz displays again a blurred positioning, with a rather good global placement of nearly a half of the solutions, but an equally bad superimposition of these solutions. In the meantime, metconazole can achieve three different conformations, all putting the triazol in interaction with the iron, whereas there was a single conformation for all the 30 solutions with the original protein.

### **Molecular dynamics simulations**

The D134G, F218L and A410T mutants (respectively 65, 1 and 2% of population) were submitted to a dynamics simulation. The most notable result is that the D134G mutation led to a system too unstable to even pass the preliminary energy minimization step. In the absence of any other difference with the wild type protein, this aspartate is apparently essential for the stability of the structure. Excluding this mutation for the analysis, the RMSD of the backbone of wild type CYP51 was very close to the crystallographic resolution, with a RMSD around 2.2 Å compared to 1.9 Å for the resolution, except for the first run, at a somewhat larger 3.94 Å. This is also evident from the RMSF on the alpha carbons. The first run has a slightly higher basal level and less cleanly defined ordered region normally exhibiting a low RMSF.

The other three runs are very similar in their RMSF profile, with well-defined ordered regions and only a few areas of higher mobility. Very few regions of the protein have a fluctuation higher than the threshold of 1.9 Å corresponding to the resolution of the crystallographic template. Below this level, we can assume that the movements are not significant enough to be distinguished from the original uncertainty on the position of the atoms. The exception of the few first and last residues, the areas of large movement correspond to the less order regions of the protein. One of the most stable regions is without surprise the paradoxically not so well conserved region around the iron binding Cys 482. On the contrary, the major areas of fluctuation conserved for all the profiles, discounting the first, are around Leu 93 - Gly 94, Asp 433 to Glu 455 and Val 508 to Asn 513. Interestingly, this last residue is among the mutants. Other regions of high fluctuation, albeit not common to all the runs, are Asn 111 to Asn 118, a large chunk at Gly 232 to Leu 245 including a short helix and Lys 273 to Glu 279.

Mutating Phe 218 to a leucine results in an increase of the RMSD. It is exactly the opposite of the wild type protein: three runs are above a RMSD of 3 Å, at 3.13, 3.03, 3.21 and the last is at a 2.58. This particular run also has a noticeable difference of profile for the RMSF curve, with lower but more numerous high fluctuation regions, and overall a higher number of increased mobility. The three other runs are quite comparable. The whole baseline up to Gly 232 is slightly higher than its counterpart for wild type, and overall, the profile appears to be less stable.



The high mobility areas at Leu 93 to Gly 94 is kept but with a slightly lower maximal value and more variation from one run to the other. On the contrary, the two regions at Gly 232 - Leu 245 and Lys 273 - Pro 297 are kept in all the three high RMSD runs, with higher RMSF values than for the non-mutated protein. In fact, the latter is present in all the runs with an increased maximum compared to its wild type equivalent, and the helix between the two high mobility loop is very close to the crystallographic resolution threshold, while the second loop of this segment was never reaching it for the wild type enzyme and exceeds it for two of the three high mobility runs. Two of these runs also have an increased mobility for Leu 345 to Ser 352. After a rather well conserved low mobility region around Ser 321, which keeps nearly the same low mobility than in the wild type, the profile diverges again noticeably from the unmutated protein, with a higher base line. Replacing Ala 410 with a threonine also increases the RMSD to a higher degree than mutating the phenylalanine, with 3.25, 3.2, 2.91 and 3.12. The four runs are more homogenous than for the other simulations. On the RMSF side, the baseline is much more stable than for the F218L mutant and keeps nearly the same value as for the wild type CYP51 on the second half of the mutant, while the first half an increased baseline.

The structural element marking the limit of these two behaviors is the helix Pro 246 - Ser 272, which has three low mobility profiles and the third nearing the crystallographic threshold, while it remains at a stable, low mobility in three runs, and is only comparable in the fourth simulation. Overall, the high mobility regions are much less well defined for this mutant, with no region keeping a high mobility profile across all the simulations on the first half of the protein. On the second half, the maximal fluctuations are also a bit flattened. The Asp 433 - Glu 455 region is therefore closer to the wild type profile for two runs, but the two others are very different. One is fully below the crystallographic resolution and the other, on the contrary, a much higher value. A high mobility is appearing at Val 508 - Asn 513, as in the wild type protein. It is however less consistent, with a higher spread of its maximal values through the runs.



## Discussion

Still on the market, DMIs remain central in fungicide programs, despite the introduction of the SDHI new generation family in 2010. Management of the use of plant protection products is recommended to limit the rapid onset of resistance, as observed in *Z. tritici* for QoI resistance (Cheval *et al.*, 2015). To avoid such resistance evolution scenarios, DMIs are currently used mainly in combination with SDHIs in the control *Z. tritici*. However, although these precautions, *Z. tritici* exhibits high levels of resistance against DMIs, as revealed by our results. Indeed, a total of 18 CYP51 amino-acid alterations (clustered into 23 haplotypes) and several isolates cumulating CYP51 alterations with either *cyp51* overexpression or MDR phenotype were detected among only 100 *Z. tritici* isolates. Such a high diversity in resistance patterns is in agreement with the high frequency of fungicide treatments due to the high disease pressure in the sampled northern French locations. The occurrence rates discovered for the alterations I381V, V136A, V136C, D134G and A379G in our study are consistent with that of Jorgensen *et al.* (2018) performed using 2016 sampled isolates. Five new low-frequencies mutations have been found in the population. *In silico* analyses made it possible to determine their impact on resistance. Only the L385M and F218L mutations have a potential strong effect. The first was due to the interaction between the ligand and the protein catalytic site and the second affect the protein stability causing high flexibility of part of protein.

Out of 23 haplotypes, 21 concern 1 to 2 individuals while the H5 and H11 haplotypes are the most represented with respectively 64 and 10% of the population. These haplotypes have been identified in Huf *et al.* (2018) as haplotypes E4 and F2. It could not be possible to adopt the nomenclature of Huf *et al.* (2018) for our study because only 9 haplotypes were identified (C4, C8, E4, F5, E8, F2, G1, H3 and H5). Among the most frequent, we notice the same conclusion with the authors with the majority haplotypes: E4 (32.9%) and F2 (10.6%). The haplotypes C8 and G1 was also found in the northern France population with 2 and 1% (9.4% and 8.5% according to Huf *et al.*, 2018). The sequencing of S524 could not be performed, we cannot conclude on the presence of the rest of haplotype like E3, E5, F8, H4 and H6).

Our results revealed that 21 % of the isolates possess additional mechanisms of DMIs resistance to CYP51 alterations. For instance, *cyp51* overexpression mechanism confer a complementary effect to DMIs resistance, due to the presence of a 120 bp insert in the *cyp51* promoter, at the position -83 bp of the *cyp51* gene (Cools and Fraaije, 2012). This unique insert was correlated with high *cyp51* transcriptional expression and approximately 7–16-fold increase in EC<sub>50</sub> values obtained with different DMIs fungicides (Cools and Fraaije, 2012). Our findings confirm this correlation since the 14 isolates with this insertion expressed higher IC<sub>50</sub>



values, especially for tebuconazole with 8-fold increase, when compared to the IC<sub>50</sub> values of haplotypes containing only CYP51 alterations. Most of these isolates are H11 haplotype (L50S, S188 N, I381V, Δ459–460, N513K), which was already reported by Cools *et al.* (2012), Buitrago *et al.* (2014) and Kirikyali *et al.* (2017). However, we showed that this insert can also occur in other haplotypes, such as H3, H5, H14 and H15. Kildea *et al.* (2019) demonstrated an increase of the frequency of isolates having this insert in Irish *Z. tritici* populations from 2011 to 2015, hence suggesting a potential fitness advantage conferred by this insert. For the second insert of approximately 1000 bp in the *cyp51* promoter, which was already reported by Chassot *et al.* (2008), 68% of our population exhibited this insert, compared to 77 % in the European population (Huf *et al.*, 2018). Our results cannot allow us to reliably examine the importance of this insert in DMIs resistance since only few haplotypes (isolates with same CYP51 alterations) differ in the presence or absence of this insert. The long insertion has a microsatellite-like starting region and it is a transposable element that has many, many copies in the genome (*data not show*). Indeed, isolates without this insert concerning only one or two individuals) and have more complex alteration combinations, which could greatly influence fungal sensitivity to DMIs. However, it has been demonstrated that this insert did not play a specific role in *Z. tritici* DMIs resistance (Omrane *et al.*, 2015; Kildea *et al.*, 2019). Kildea *et al.* (2019) informed that the frequency of this insert increased from 3 % to 69 % in 9 years in an Irish population, suggesting that this insert may be involved in other processes of pathogen adaptation. The rarefaction analyses inform that the isolates without insert in promoter have many more haplotypes (17) than the sequences with promoter-introns (120 and 1000bp). The most plausible hypothesis is that these introns have recently been introduced into the population and did not have time yet to accumulate many mutations.

Moreover, we also highlighted the occurrence of MDR isolates with a frequency of 7 %, in the tested population. The MDR phenotype is due to a 519 bp insert in the promoter of the gene encoding for the MgMSF1 efflux transporter (Omrane *et al.*, 2015). The MDR isolates are less frequent in northern France, compared to the French national scale of 11 %, in 2016 (Arvalis-Institut du vegetal). However, the methodology used for the determination of French MDR strains is based on the sampling of whole isolates of each sampled leaf (by pooling pycnidiospores from different pycnidia), differs from our methodology based on isolation of single-spore isolates confirmed using microsatellites. Such methodological differences could have an artefact on MDR frequency comparisons. Some isolates displayed small insertions within the MgMSF1 efflux transporter-encoding gene, with sizes less than 100 bp (*data not shown*). However, these insertions do not seem to have an impact on MgMSF1 overexpression and are not correlated with the MDR phenotype (Omrane *et al.*, 2015). Kildea *et al.* (2019) considered that MDR



Article 1 : Deciphering mechanisms underlying *Zymoseptoria tritici* resistance towards demethylation inhibitors in northern France

isolates have a reduced impact, masked by the diversity of alteration's combination. However, our results highlighted that MDR isolates display overall higher levels of resistance against all tested fungicides (especially prothioconazole) compared to non-MDR isolates, with increases ranging between 2 to 10 folds. Such finding indicates that MDR character contributes significantly to DMIs resistance in *Z. tritici*, although the main contribution to resistance is conferred by CYP51 alterations. Hence, the MDR phenotype is not the main mechanism providing resistance, but just amplifies resistance to DMIs fungicides, thus complicating *Z. tritici* management using this family of fungicides.

It is noteworthy that amino-acid alterations do not occur alone in the CYP51 protein within the *Z. tritici* field populations, thus complicating the determination of the effect of each single alteration on fungicide resistance. Hence, we performed *in silico* assays in order to decipher the effect of each single alteration separately, apart from the others, to avoid a global effect of the whole series of alterations occurring in each haplotype. Overall, three types of effects were noticed: alterations directly inducing a modification of the catalytic site accessibility, alterations modifying the binding of the heme moiety and alterations modifying the accessibility to the catalytic sites. Modifications in the catalytic site, excluding loss of stability of the heme, are the clearest contributors to the modification of sensitivity to DMIs. They were the easiest to study with a simple docking approach. By contrast, the loss of stability of the heme binding site is more likely contributing to the loss of enzyme functionality. The third class of alterations not easy to determine for their effect were submitted to a deeper study by running dynamic simulations. We concentrated our analysis on three positions lining the catalytic site, Val136, near one of the acid of the heme, Leu385 near the other and pointing toward the outside of the cavity, and Ile381, close to the center of the heme and oriented toward the iron. Several mechanisms may interfere with CYP51 activity, such as the association with other proteins, which are not directly accessible to computational means.

To limit the number of dynamic simulations to run, we selected the alterations for which an effect on the structure of the enzyme was expected, but not clearly visible from a mere visual inspection. Asp134, while close to the heme binding region, is pointing outside the heme binding site and was therefore suspected of having a structural role in the positioning of the upper part of the catalytic cavity, namely Val 136 which is the object of another mutation. Phe218 is placed in the inner part of a 90° bend between two helices and has a role in controlling the tension of this spring, which is directly connected with the loop-helix-loop assembly between Gly 232 and Leu 245, lying directly at the entry of the catalytic site and most probably responsible helping the passage of the substrate. Its replacement with a leucine should therefore modify the load driving the movements of the entrance gate. Ala410 is at the end of a two strands beta sheet,



Article 1 : *Deciphering mechanisms underlying Zymoseptoria tritici resistance towards demethylation inhibitors in northern France*

at the outer extremity when compared with the catalytic site. However, the inner strand is in direct contact with the heme and bears two alterations, at positions 381 and 385. We felt that changing this alanine to a threonine would modify the same area as mutations in position 381 or 385.

As expected, the loop-helix-loop from Gly232 to Leu245 is one of the regions of higher mobility for the wild type protein, confirming our hypothesis. The other regions are less interesting, being mostly parts of rather ill defined loops between other structural elements. Changing Phe218 to a leucine has the effect of severely modifying the dynamics of two major domains, Gly232-Leu245 and Lys273- Pro297. The second is at the end of the helix directly bearing the first, indicating a major modification of the dynamic of the gate of the catalytic site. The higher mobility of the gate is most probably a key factor in explaining the effect of this mutation, but there is also another intriguing fact. The second region also contains Asn284, which can be itself mutated. The less stable baseline indicates well that the lesser steric constraints in the spring closing the gate of the catalytic site has a general relaxing effect on the whole protein. In keeping with this observation, the A410T mutation, that does not interfere with this sensitive part of the protein, destabilizes less the ordered regions of the protein, heralded by their keeping more or less the same fluctuation as for the wild type enzyme. However, it does little to rescue a profile closer to the wild type. On the contrary, the fluctuations are less stable, with no real trends on the first half of the mutant, where the mobility is generally increased versus the wild type, but with also a much larger spread between the simulation runs. Most interestingly, the point of balance between the nearly fully disorganized mobility region of the mutant and its more stable part is the Pro246 - Ser272 helix, which holds the loop-helix-loop assembly forming the gate of the catalytic site, suggesting a compensation for a loss of stabilization induced by the mutation. It is rather interesting to remark this effect apparently transmits via the second two-strand beta sheet on the side of Ala410 toward the outside of the protein, then wrapping around the enzyme up to the entry of the catalytic site, but without touching the more stable heme-binding region. The only region keeping a constantly high mobility is just before Asn513 and includes this residue which is also the subject of mutations. This loop forms the second of the three pieces of the gate of the catalytic site, but the tip of the gate stays rather stable. We can conclude that this mutation influences the dynamic of the ligand accessibility, but not on the function of the protein, as the heme and its immediate surrounding in the catalytic site is untouched. The unexpected instability of the D134G led us to investigate the nearby side chains. There are a couple of ionic bridges (Lys 133 - Asp 138 and Lys 143 - Glu 300) but also the free Lys299 and His 303



Article 1 : Deciphering mechanisms underlying *Zymoseptoria tritici* resistance towards demethylation inhibitors in northern France

Regarding docking simulations, the most evident effect of alterations on fungicide binding is obtained for I381V, for which all the tested DMIs molecules are less tightly kept in a single conformation. This result in a larger RMS from one solution to the other and confirms the impact of this particular alteration, we derived from its position in the binding site. L385M was more surprising, as we thought it would not interfere with docking and would influence the accessibility of the pocket. It proved to open a wider space at the end of the catalytic site, therefore modifying the binding capacity of the fungicides. The two alterations at position 136 have different effects. The first is reducing the bulk, therefore creates a less restrained fit for tébuconazole, prochloraz and metconazole that they repay by a wider dispersion around their putative fungicide-binding mode. By contrast, it helps epoxyconazole to fit into the pocket. The second, is partly rescuing the bulk of the amino acid with a cystein removes this effect, except for metconazole.

Interestingly, we found that identical haplotypes with same patterns for CYP alterations, *cyp51* overexpression and MDR character (*i.e* haplotype 5) showed a strong variability in their resistance levels towards the five tested fungicides, suggesting the occurrence of additional and unknown mechanisms of resistance to DMIs in *Z. tritici*. Mohd-Assad *et al.* (2016) demonstrated in *Rhynchosporium commune*, by genome-wide association study (GWAS), three new genes involved in DMIs resistance: the vacuolar cation channel YVC1, a transcription activator and a saccharopine dehydrogenase. Likewise, another GWAS study in *Fusarium graminearum* reported 74 quantitative trait nucleotides significantly associated to propiconazole sensitivity, located in genes not associated to DMIs sensitivity (Talas *et al.*, 2016). For *Penicillium digitatum*, the presence of an ortholog gene encoding a sterol regulatory binding protein (SREBP) has been identified in the genome. Named *sreA*, it has been shown to be a necessary transcription factor for resistance to prochloraz *via* regulation of *cyp51* expression, as well as for virulence of *P. digitatum* (Liu *et al.*, 2015). This factor has also been identified in pathogenic fungus, *Aspergillus fumigatus* (Willger *et al.*, 2008). Another study in *P. digitatum* identifies other SREBPs: *PdsreA* and *PdsreB*, also involved in DMIs resistance (Ruan *et al.*, 2017). This example is a main guideline to follow for H5 haplotypes. Other pathways can also be considered as transcription factors such as *Crz1* in *P. digitatum*, *HapE* or *AfYap1* in *A. fumigatus* (Garcia-Rubio *et al.*, 2017). Mycoviruses are poorly studied for STB and may also have an impact on resistance to DMIs, as in the case of *P. digitatum* (Niu *et al.*, 2018). The authors prove that the decrease in prochloraz resistance is due to co-infection with two mycoviruses (polymycovirus 1 and Narna-like virus 1) for two strains studied. The presence of mycovirus can also modify the behavior of pathogenic fungus as fitness component (Pearson *et al.*, 2009)



Regarding the classification of CYP51 haplotypes in *Z. tritici*, Huf *et al.* (2018) proposed a nomenclature based on the number of alterations in CYP51 protein. Such nomenclature could be better to describe and to monitor the distribution and frequency of CYP51 haplotypes in *Z. tritici* populations from different regions and different time-points. In addition, new genotypes can enrich the nomenclature. However, it does not include data on the impact of alterations on fungal resistance levels ( $IC_{50}$  values) to DMIs fungicides. The complex nature of the link that correlates mutations and genotypes becomes more complex from year to year. Indeed, up to 8 CYP51 alterations have been found for some strains (H23). For resistance monitoring, the most appropriate classification would be to consider only  $IC_{50}$  for various fungicides tested and to visualize the impact factor to determine resistance impacts. The case of DMIs fungicides confirm that phytosanitary management is important. Combining several modes of action such as the use of SDHI or multi-site remains the best strategy to limit the damage caused by STB.

## Acknowledgement

This study was supported by Bayer CropScience in the framework of a CIFRE-PhD project.





## References

- Brunner, P.C., Stefanato, F.L., McDonald, B.A., 2008. Evolution of the *CYP51* gene in *Mycosphaerella graminicola*: evidence for intragenic recombination and selective replacement. *Molecular plant pathology* 9, 305–316.
- Buitrago, C., Frey, R., Wullschleger, J., Sierotzki, H., 2014. An update on the genetic changes in the *CYP51* gene of *Mycosphaerella graminicola* and their relationship to DMI fungicide sensitivity. *Modern fungicides and antifungal compounds VII* 103–110.
- Chassot, C., Hugelshofer, U., Sierotzki, H., Gisi, U., 2008. Sensitivity of *CYP51* genotypes to DMI fungicides in *Mycosphaerella graminicola*. *Modern fungicides and antifungal compounds V: 15th International Reinhardtsbrunn Symposium, Friedrichroda, Germany, May 6-10, 2007* 129–136.
- Cheval, P., Siah, A., Bomble, M., Popper, A.D., Reignault, P., Halama, P., 2017. Evolution of Qol resistance of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in Northern France. *Crop Protection* 92, 131–133. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.10.017>
- Clark, W.S., 2006. *Septoria tritici* and azole performance. *Aspects of Applied Biology, Fungicide resistance: are we winning the battle but losing the war?* 78, 127–132.
- Clement, M., Snell, Q., Walker, P., Posada, D., Crandall, K., 2002. *Proceedings: International Parallel and Distributed Processing Symposium: April 15-19, 2002, Ft. Lauderdale, Florida, USA, International parallel and distributed processing symposium. IEEE Computer Society, Los Alamitos, California.*
- Cools, H.J., Bayon, C., Atkins, S., Lucas, J.A., Fraaije, B.A., 2012. Overexpression of the sterol 14  $\alpha$ -demethylase gene (*MgCYP51*) in *Mycosphaerella graminicola* isolates confers a novel azole fungicide sensitivity phenotype. *Pest. Manag. Sci.* 68, 1034–1040. <https://doi.org/10.1002/ps.3263>
- Cools, H.J., Fraaije, B.A., 2013. Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implications for future control. *Pest management science* 69, 150–155.
- Cools, H.J., Hawkins, N.J., Fraaije, B.A., 2013. Constraints on the evolution of azole resistance in plant pathogenic fungi. *Plant Pathol* 62, 36–42. <https://doi.org/10.1111/ppa.12128>
- Dooley, H., Shaw, M.W., Mehenni-Ciz, J., Spink, J., Kildea, S., 2016. Detection of *Zymoseptoria tritici* SDHI-insensitive field isolates carrying the SdhC-H152R and SdhD-R47W substitutions. *Pest Manag. Sci.* 72, 2203–2207. <https://doi.org/10.1002/ps.4269>



Article 1 : Deciphering mechanisms underlying *Zymoseptoria tritici* resistance towards demethylation inhibitors in northern France

Fones, H., Gurr, S., 2015. The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genet Biol* 79, 3–7. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.004>

Fraaije, B.A., Cools, H.J., Fountaine, J., Lovell, D.J., Motteram, J., West, J.S., Lucas, J.A., 2005. Role of Ascospores in Further Spread of Qol-Resistant Cytochrome b Alleles (G143A) in Field Populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* 95, 933–941. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0933>

Fraaije, B.A., Cools, H.J., Kim, S.-H., Motteram, J., Clark, W.S., Lucas, J.A., 2007. A novel substitution I381V in the sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) of *Mycosphaerella graminicola* is differentially selected by azole fungicides. *Mol. Plant Pathol.* 8, 245–254. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00388.x>

Garcia-Rubio, R., Cuenca-Estrella, M., Mellado, E., 2017. Triazole Resistance in *Aspergillus* Species: An Emerging Problem. *Drugs* 77, 599–613. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0714-4>

Gisi, U., Sierotzki, H., Cook, A., McCaffery, A., 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Manag. Sci.* 58, 859–867. <https://doi.org/10.1002/ps.565>

Heick, T.M., Justesen, A.F., Jørgensen, L.N., 2017. Anti-resistance strategies for fungicides against wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* with focus on DMI fungicides. *Crop Protection* 99, 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.05.009>

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*. <https://doi.org/10.1111/ppa.12891>

Jørgensen, L., Matzen, N., Hansen, J., Semaskiene, R., Korbas, M., Danielewicz, J., Maumene, C., Rodemann, B., Weigand, S., Hess, M., Blake, J., Clark, B., Kildea, S., Batailles, C., Rita, B., Havis, N., Treikale, O., Głazek, M., 2018. Four azoles' profile in the control of *Septoria*, yellow rust and brown rust in wheat across Europe. *Crop Protection* 105, 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.10.018>

Kildea, S., Marten-Heick, T., Grant, J., Mehenni-Ciz, J., Dooley, H., 2019. A combination of target-site alterations, overexpression and enhanced efflux activity contribute to reduced azole sensitivity present in the Irish *Zymoseptoria tritici* population. *Eur J Plant Pathol.* <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01676-4>



Article 1 : Deciphering mechanisms underlying *Zymoseptoria tritici* resistance towards demethylation inhibitors in northern France

Kirikyali N, Diez P, Luo J, Hawkins N, Fraaije BA, 2017. Azole and SDHI sensitivity status of *Zymoseptoria tritici* field populations sampled in France, Germany and the UK during 2015. *Modern Fungicides and Antifungal Compounds* 3, 153–158.

Leroux, P., Albertini, C., Gautier, A., Gredt, M., Walker, A.-S., 2007. Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14  $\alpha$ -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest. Manag. Sci.* 63, 688–698.  
<https://doi.org/10.1002/ps.1390>

Leroux, P., Walker, A.-S., 2011. Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14  $\alpha$ -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest management science* 67, 44–59.

Liu, J., Yuan, Y., Wu, Z., Li, N., Chen, Y., Qin, T., Geng, H., Xiong, L., Liu, D., 2015. A novel sterol regulatory element-binding protein gene (*sreA*) identified in *Penicillium digitatum* is required for prochloraz resistance, full virulence and *erg11* (*cyp51*) regulation. *PLoS ONE* 10, e0117115.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117115>

Mohd-Assaad, N., McDonald, B.A., Croll, D., 2016. Multilocus resistance evolution to azole fungicides in fungal plant pathogen populations. *Molecular Ecology* 25, 6124–6142.  
<https://doi.org/10.1111/mec.13916>

Mullins, J.G., Parker, J.E., Cools, H.J., Togawa, R.C., Lucas, J.A., Fraaije, B.A., Kelly, D.E., Kelly, S.L., 2011. Molecular modelling of the emergence of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS One* 6, e20973.

Niu, Y., Yuan, Y., Mao, J., Yang, Z., Cao, Q., Zhang, T., Wang, S., Liu, D., 2018. Characterization of two novel mycoviruses from *Penicillium digitatum* and the related fungicide resistance analysis. *Sci Rep* 8, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23807-3>

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, e00393-17. <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, 2805–2823.



Article 1 : Deciphering mechanisms underlying *Zymoseptoria tritici* resistance towards demethylation inhibitors in northern France

Pearson, M.N., Beever, R.E., Boine, B., Arthur, K., 2009. Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 10, 115–128. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00503.x>

Price, C.L., Parker, J.E., Warrilow, A.G., Kelly, D.E., Kelly, S.L., 2015. Azole fungicides—understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. *Pest management science* 71, 1054–1058.

Ruan, R., Wang, M., Liu, X., Sun, X., Chung, K.-R., Li, H., 2017. Functional analysis of two sterol regulatory element binding proteins in *Penicillium digitatum*. *PLOS ONE* 12, e0176485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176485>

Siah, A., Bomble, M., Tisserant, B., Cadalen, T., Holvoet, M., Hilbert, J.-L., Halama, P., Reignault, P.L., 2018. Genetic structure of *Zymoseptoria tritici* in northern France at region, field, plant and leaf layer scales. *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-17-0322-R>

Siah, A., Deweer, C., Morand, E., Reignault, P., Halama, P., 2010. Azoxystrobin resistance of French *Mycosphaerella graminicola* strains assessed by four in vitro bioassays and by screening of G143A substitution. *Crop Protection* 29, 737–743.

Stammler, G., Carstensen, M., Koch, A., Semar, M., Strobel, D., Schlehuber, S., 2008. Frequency of different CYP51-haplotypes of *Mycosphaerella graminicola* and their impact on epoxiconazole-sensitivity and field efficacy. *Crop Protection* 27, 1448–1456.

Stammler, G., Semar, M., 2011. Sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* (anamorph: *Septoria tritici*) to DMI fungicides across Europe and impact on field performance. *EPPO Bulletin* 41, 149–155.

Stergiopoulos, I., Zwiers, L.-H., De Waard, M.A., 2003. The ABC Transporter MgAtr4 Is a Virulence Factor of *Mycosphaerella graminicola* that Affects Colonization of Substomatal Cavities in Wheat Leaves. *MPMI* 16, 689–698. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.8.689>

Talas, F., Kalih, R., Miedaner, T., McDonald, B.A., 2016. Genome-Wide Association Study Identifies Novel Candidate Genes for Aggressiveness, Deoxynivalenol Production, and Azole Sensitivity in Natural Field Populations of *Fusarium graminearum*. *MPMI* 29, 417 - 430. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-15-0218-R>

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*, *Septoria tritici* blotch disease of wheat: Tools and techniques to study the pathogen *Zymoseptoria tritici* 79, 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.010>



Article 1 : Deciphering mechanisms underlying *Zymoseptoria tritici* resistance towards demethylation inhibitors in northern France

Wieczorek, T.M., Berg, G., Semaškienė, R., Mehl, A., Sierotzki, H., Stammler, G., Justesen, A.F., Jørgensen, L.N., 2015. Impact of DMI and SDHI fungicides on disease control and CYP51 mutations in populations of *Zymoseptoria tritici* from Northern Europe. *Eur J Plant Pathol* 143, 861–871. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0737-1>

Willger, S.D., Puttikamonkul, S., Kim, K.-H., Burritt, J.B., Grahl, N., Metzler, L.J., Barbusch, R., Bard, M., Lawrence, C.B., Cramer, R.A., 2008. A sterol-regulatory element binding protein is required for cell polarity, hypoxia adaptation, azole drug resistance, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* 4, e1000200. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000200>

Yamashita, M., Fraaije, B., 2018. Non-target site SDHI resistance is present as standing genetic variation in field populations of *Zymoseptoria tritici*. *Pest Manag. Sci.* 74, 672–681. <https://doi.org/10.1002/ps.4761>

Zhan, J., Mundt, C.C., McDonald, B.A., 2007. Sexual reproduction facilitates the adaptation of parasites to antagonistic host environments: Evidence from empirical study in the wheat-*Mycosphaerella graminicola* system. *Int. J. Parasitol.* 37, 861–870. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.03.003>



**Supplementary datas**

**Supplementary data 1.** Alterations in CYP51 of 100 strains of *Z. tritici*. Additional mechanisms were determined: strains with black dot for MDR phenotype and white dot for *cyp51* overexpression.

<i>Z. tritici</i> strains <sup>a</sup>	Position of the polymorphism of amino acids																
	6	50	134	176	136	188	218	284	379	381	385	410	447	459 <sup>b</sup>	460 <sup>b</sup>	461	513
IPO323	E	L	D	D	V	S	F	N	A	I	L	A	T	Y	D	Y	N
1 <sup>□</sup>	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
2 <sup>□</sup>	E	S	D	D	V	N	F	N	A	V	L	A	T	---	---	Y	K
3	E	S	D	D	V	N	F	H	G	V	L	A	T	---	---	Y	K
4 <sup>□</sup>	E	S	D	D	V	N	F	N	A	V	L	A	T	---	---	Y	K
5	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
6 <sup>□</sup>	E	S	D	D	V	N	F	N	A	V	L	A	T	---	---	Y	K
7	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
8	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
9 <sup>□</sup>	E	S	D	D	C	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
10	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
11	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
12 <sup>•</sup>	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
13	E	S	D	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	K
14	E	S	D	D	A	N	F	N	G	V	L	A	T	---	---	Y	K
15	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
16	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
17	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
18 <sup>□</sup>	E	S	D	D	V	N	F	N	A	V	L	A	T	---	---	Y	K
19	E	S	D	D	V	N	F	N	G	V	L	A	T	---	---	Y	K
20	E	S	D	D	A	N	F	N	G	V	L	A	T	---	---	Y	N
21	E	S	D	D	C	N	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
22	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
23	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
24	E	S	D	D	V	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	K
25 <sup>□</sup>	E	S	D	D	V	N	F	N	A	V	L	A	T	---	---	Y	K
26	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
27	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
28	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
29	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
30	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
31	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
32	E	S	D	D	A	N	F	N	A	I	L	A	T	---	---	Y	K
33	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
34	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
35	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
36	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
37	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
38	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
39	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
40	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
41	E	S	D	D	A	N	F	N	A	V	L	A	T	---	---	Y	N
42	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
43 <sup>□</sup>	E	S	D	D	V	N	F	N	A	V	L	A	T	---	---	Y	K
44 <sup>□</sup>	E	S	D	D	V	N	F	N	A	V	L	A	T	---	---	Y	K
45	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
46	E	S	D	D	V	N	L	N	G	V	L	A	T	---	---	Y	K



**Supplementary data 1.** Alterations in CYP51 of 100 strains of *Z. tritici*. Additional mechanisms were determined: strains with black dot for MDR phenotype and white dot for *cyp51* overexpression (continuation).

<i>Z. tritici</i> strains <sup>a</sup>	Position of the polymorphism of amino acids																
	6	50	134	176	136	188	218	284	379	381	385	410	447	459 <sup>b</sup>	460 <sup>b</sup>	461	513
47 <sup>□</sup>	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
48	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
49	E	S	D	D	V	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	D	N
50	E	S	D	D	V	N	F	N	G	V	L	T	T	---	---	Y	K
51 <sup>□</sup>	E	S	D	Y	V	N	F	N	A	V	L	A	T	---	---	Y	K
52	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
53	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
54	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	K
55	E	S	D	D	V	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
56	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
57	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
58 <sup>□</sup>	E	S	D	D	V	N	F	N	A	V	L	A	T	---	---	Y	K
59	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
60	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
61	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
62	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
63	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
64	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
65 <sup>□</sup>	E	S	D	D	V	N	F	N	A	V	L	A	T	---	---	Y	K
66 <sup>•</sup>	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
67 <sup>•</sup>	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
68	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
69	E	S	D	D	C	N	F	N	G	V	L	A	T	---	---	Y	N
70	E	S	D	D	V	N	F	N	G	V	L	T	I	---	---	Y	K
71	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
72	E	S	D	D	V	N	F	N	G	V	M	A	T	---	---	Y	K
73	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
74	E	S	D	D	C	N	F	N	A	I	L	A	T	---	---	Y	K
75	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
76	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
77	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
78	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
79 <sup>•</sup>	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
80 <sup>□</sup>	E	S	D	D	V	N	F	N	A	V	L	A	T	---	---	Y	K
81 <sup>•</sup>	E	S	D	D	C	N	F	N	G	V	L	A	T	---	---	Y	N
82	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
83 <sup>□</sup>	E	S	D	D	V	N	F	N	A	V	L	A	T	---	---	Y	K
84	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
85	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
86 <sup>•</sup>	E	S	D	D	C	N	F	N	A	I	L	A	T	---	---	Y	K
87	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
88	E	S	D	D	V	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
89	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
90	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
91	E	S	D	D	A	N	F	N	G	V	L	A	T	---	---	Y	N
92 <sup>•</sup>	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N



**Supplementary data 1.** Alterations in CYP51 of 100 strains of *Z. tritici*. Additional mechanisms were determined: strains with black dot for MDR phenotype and white dot for *cyp51* overexpression (continuation and end).

<i>Z. tritici</i> strains <sup>a</sup>	Position of the polymorphism of amino acids																
	6	50	134	176	136	188	218	284	379	381	385	410	447	459 <sup>b</sup>	460 <sup>b</sup>	461	513
93	D	S	D	D	C	N	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
94	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
95	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
96	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
97	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
98	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
99	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N
100	E	S	G	D	A	S	F	N	A	V	L	A	T	Y	D	H	N

<sup>a</sup> Legend : ° represent overexpression *cyp51* strains ; ° represent MDR strains.

<sup>b</sup> Double deletion Y459-D460





**Supplementary data 2.** Concentration minimum of 100 field isolats of *Z. tritici*. Resistance factor according IPO323 reference strains was evaluated and values was in parenthesis

<i>Z. tritici</i> strains	Tebuconazole	Metconazole	Epoxiconazole	Prothioconazole	Prochloraz
IPO323	0,07	0,040	0,030	0,001	0,024
1 <sup>□</sup>	5,42 (78)	0,25 (6)	1,05 (35)	0,12 (123)	0,19 (8)
2 <sup>□</sup>	9,42 (135)	0,61 (15)	1,45 (48)	0,11 (113)	0,12 (5)
3	12,75 (182)	0,77 (19)	0,57 (19)	0,01 (10)	0,01 (0)
4 <sup>□</sup>	39,03 (558)	3,35 (84)	10,63 (354)	0,18 (181)	1,07 (45)
5	0,44 (6)	0,29 (7)	1,42 (47)	0,10 (97)	0,22 (9)
6 <sup>□</sup>	42,76 (611)	1,98 (50)	6,67 (222)	0,13 (134)	0,59 (25)
7	0,40 (6)	0,17 (4)	2,08 (69)	0,12 (124)	0,24 (10)
8	0,13 (2)	0,09 (2)	0,54 (18)	0,07 (71)	0,09 (4)
9 <sup>□</sup>	12,37 (177)	1,13 (28)	2,75 (92)	0,16 (163)	0,47 (20)
10	0,23 (3)	0,14 (4)	0,69 (23)	0,22 (222)	0,12 (5)
11	0,30 (4)	0,19 (5)	1,32 (44)	0,25 (244)	0,17 (7)
12*	5,91 (84)	1,30 (33)	3,82 (127)	0,28 (277)	3,66 (153)
13	0,44 (6)	0,19 (5)	1,15 (38)	0,09 (90)	0,43 (18)
14	0,72 (10)	0,61 (15)	3,65 (122)	0,08 (77)	0,10 (4)
15	0,84 (12)	0,33 (8)	3,14 (105)	0,32 (321)	0,51 (21)
16	0,26 (4)	0,14 (4)	1,12 (37)	0,10 (102)	0,12 (5)
17	0,17 (2)	0,13 (3)	0,62 (21)	0,08 (82)	0,09 (4)
18 <sup>□</sup>	15,54 (222)	0,56 (14)	1,69 (56)	0,05 (54)	0,39 (16)
19	6,37 (91)	0,85 (21)	1,42 (47)	0,02 (25)	0,00 (0)
20	1,07 (15)	0,70 (18)	9,33 (311)	0,33 (325)	0,16 (7)
21	5,16 (74)	0,49 (12)	2,95 (98)	0,07 (65)	0,14 (6)
22	0,91 (13)	1,07 (27)	7,70 (257)	0,29 (287)	0,75 (31)
23	0,33 (5)	0,11 (3)	0,99 (33)	0,07 (70)	0,12 (5)
24	5,36 (77)	0,69 (17)	1,71 (57)	0,00 (5)	0,54 (23)
25 <sup>□</sup>	75,00 (ND)	0,97 (24)	1,49 (50)	0,08 (81)	0,35 (15)
26	0,53 (8)	0,24 (6)	1,47 (49)	0,13 (129)	0,23 (9)
27	0,27 (4)	0,19 (5)	1,95 (65)	0,09 (90)	0,17 (7)
28	0,37 (5)	0,16 (4)	3,01 (100)	0,10 (96)	0,22 (9)
29	61,78 (883)	1,51 (38)	2,07 (69)	0,20 (200)	15,30 (639)
30	0,54 (8)	0,13 (3)	1,39 (46)	0,10 (104)	0,17 (7)
31	0,49 (7)	0,20 (5)	1,22 (41)	0,09 (89)	0,16 (7)
32	0,81 (12)	0,93 (23)	3,31 (110)	0,15 (146)	4,57 (191)
33	0,53 (8)	0,31 (8)	1,34 (45)	0,08 (84)	0,30 (13)
34	0,48 (7)	0,25 (6)	1,18 (39)	0,14 (137)	0,17 (7)
35	0,41 (6)	0,17 (4)	0,99 (33)	0,13 (132)	0,23 (10)
36	0,59 (8)	0,21 (5)	1,62 (54)	0,10 (102)	0,27 (11)
37	0,40 (6)	0,14 (3)	1,43 (48)	0,07 (68)	0,19 (8)
38	0,26 (4)	0,10 (2)	0,57 (19)	0,10 (95)	0,12 (5)
39	0,38 (5)	0,25 (6)	1,63 (54)	0,12 (117)	0,12 (5)
40	1,79 (26)	0,52 (13)	1,91 (64)	0,19 (187)	0,50 (21)
41	1,23 (18)	0,64 (16)	17,75 (592)	0,32 (322)	0,67 (28)
42	1,79 (26)	0,67 (17)	3,98 (133)	0,23 (225)	0,68 (28)
43 <sup>□</sup>	21,07 (301)	1,35 (34)	3,63 (121)	0,05 (54)	0,79 (33)
44 <sup>□</sup>	12,02 (172)	0,72 (18)	1,62 (54)	0,05 (47)	0,20 (8)
45	0,36 (5)	0,18 (5)	1,35 (45)	0,08 (84)	0,17 (7)
46	19,04 (272)	1,61 (40)	3,87 (129)	0,27 (272)	0,31 (13)
47 <sup>□</sup>	41,69 (596)	1,58 (39)	1,53 (51)	0,11 (107)	0,50 (21)



**Supplementary data 2.** Concentration minimum of 100 field isolats of *Z. tritici*. Resistance factor according IPO323 reference strains was evaluated and values was in parenthesis (continuation)

<i>Z. tritici</i> strains	Tebuconazole	Metconazole	Epoxiconazole	Prothioconazole	Prochloraz
48	0,21 (3)	0,46 (12)	1,29 (43)	0,04 (43)	0,31 (13)
49	3,24 (46)	0,26 (6)	0,34 (11)	0,01 (5)	0,13 (5)
50	24,40 (349)	1,81 (45)	1,03 (34)	0,03 (33)	0,02 (1)
51 <sup>□</sup>	18,85 (269)	1,10 (28)	1,48 (49)	0,08 (76)	0,25 (11)
52	0,33 (5)	0,10 (3)	0,34 (11)	0,00 (4)	0,08 (3)
53	4,52 (65)	0,34 (8)	0,86 (29)	0,10 (102)	0,08 (3)
54	1,72 (25)	0,53 (13)	2,24 (75)	0,15 (151)	0,62 (26)
55	3,44 (49)	0,27 (7)	0,40 (13)	0,12 (123)	0,16 (7)
56	0,51 (7)	0,10 (2)	0,51 (17)	0,15 (151)	0,17 (7)
57	0,74 (11)	0,45 (11)	1,61 (54)	0,08 (76)	0,33 (14)
58 <sup>□</sup>	7,73 (110)	0,61 (15)	1,89 (63)	0,03 (32)	0,34 (14)
59	0,30 (4)	0,14 (3)	0,98 (33)	0,06 (58)	0,10 (4)
60	0,39 (6)	0,16 (4)	1,10 (37)	0,07 (72)	0,10 (4)
61	0,64 (9)	0,28 (7)	1,82 (61)	0,07 (68)	0,22 (9)
62	0,65 (9)	0,21 (5)	0,12 (4)	0,11 (105)	0,34 (14)
63	1,03 (15)	0,62 (15)	3,53 (118)	0,17 (165)	0,78 (32)
64	0,32 (5)	0,07 (2)	0,24 (8)	0,14 (135)	0,07 (3)
65 <sup>□</sup>	18,86 (269)	1,29 (32)	3,01 (100)	0,09 (89)	0,56 (23)
66*	4,86 (69)	1,27 (32)	7,47 (249)	75,00 (74753)	3,13 (131)
67*	5,26 (75)	0,04 (1)	6,72 (224)	0,28 (274)	1,94 (81)
68	0,88 (13)	0,11 (3)	0,74 (25)	0,15 (151)	0,24 (10)
69	6,78 (97)	5,40 (135)	23,93 (798)	0,25 (253)	0,10 (4)
70	3,52 (50)	0,88 (22)	4,36 (145)	0,12 (115)	0,50 (21)
71	0,44 (6)	0,19 (5)	1,39 (46)	0,20 (204)	0,17 (7)
72	5,75 (82)	0,43 (11)	10,76 (359)	0,42 (420)	0,32 (13)
73	0,48 (7)	0,24 (6)	1,59 (53)	0,28 (279)	0,19 (8)
74	0,70 (10)	0,15 (4)	0,53 (18)	0,00 (0)	0,08 (3)
75	0,58 (8)	0,31 (8)	3,46 (115)	75,00 (74753)	0,33 (14)
76	0,66 (9)	0,35 (9)	2,57 (86)	0,08 (75)	0,36 (15)
77	0,52 (7)	0,23 (6)	1,61 (54)	0,08 (75)	0,35 (15)
78	0,96 (14)	0,38 (10)	2,53 (84)	0,16 (160)	0,37 (15)
79*	3,53 (50)	1,05 (26)	8,03 (268)	0,30 (299)	1,28 (53)
80 <sup>□</sup>	2,33 (33)	0,27 (7)	0,86 (29)	0,04 (43)	0,20 (8)
81*	75,00 (1071)	6,02 (151)	15,05 (502)	0,57 (565)	1,48 (62)
82	0,48 (7)	0,39 (10)	1,06 (35)	0,09 (87)	0,38 (16)
83 <sup>□</sup>	18,71 (267)	1,87 (47)	2,98 (99)	0,08 (80)	0,48 (20)
84	0,29 (4)	0,14 (4)	1,03 (34)	0,12 (118)	0,20 (8)
85	2,58 (37)	0,52 (13)	5,24 (175)	0,26 (258)	0,81 (34)
86*	15,51 (222)	3,17 (79)	10,56 (352)	0,04 (37)	6,38 (266)
87	0,47 (7)	0,13 (3)	1,39 (46)	0,04 (40)	0,24 (10)
88	2,31 (33)	0,18 (5)	0,39 (13)	0,00 (1)	0,11 (5)
89	0,44 (6)	0,19 (5)	1,47 (49)	0,20 (201)	0,30 (12)
90	2,07 (30)	0,63 (16)	3,79 (126)	0,11 (105)	1,08 (45)
91	1,76 (25)	1,12 (28)	64,31 (2144)	0,83 (832)	0,26 (11)
92*	4,82 (69)	1,54 (39)	7,61 (254)	0,33 (329)	2,86 (119)
93	6,03 (86)	1,63 (41)	8,40 (280)	0,10 (101)	0,14 (6)
94	2,09 (30)	0,23 (6)	1,30 (43)	0,28 (280)	0,13 (6)
95	1,30 (19)	0,56 (14)	12,45 (415)	0,28 (278)	0,77 (32)



**Supplementary data 2.** Concentration minimum of 100 field isolats of *Z. tritici*. Resistance factor according IPO323 reference strains was evaluated and values was in parenthesis (continuation and end)

<i>Z. tritici</i> strains	Tebuconazole	Metconazole	Epoxiconazole	Prothioconazole	Prochloraz
96	9,01 (129)	0,21 (5)	3,42 (114)	0,11 (111)	0,32 (13)
97	0,35 (5)	0,17 (4)	0,92 (31)	0,13 (131)	0,14 (6)
98	1,37 (20)	0,19 (5)	1,68 (56)	0,22 (224)	0,22 (9)
99	0,55 (8)	0,40 (10)	0,91 (30)	0,06 (65)	0,32 (13)
100	1,69 (24)	0,65 (16)	19,46 (649)	1,57 (1567)	0,72 (30)

<sup>a</sup> Legend : ° represent overexpression *cyp51* strains ; \* represent MDR strains.

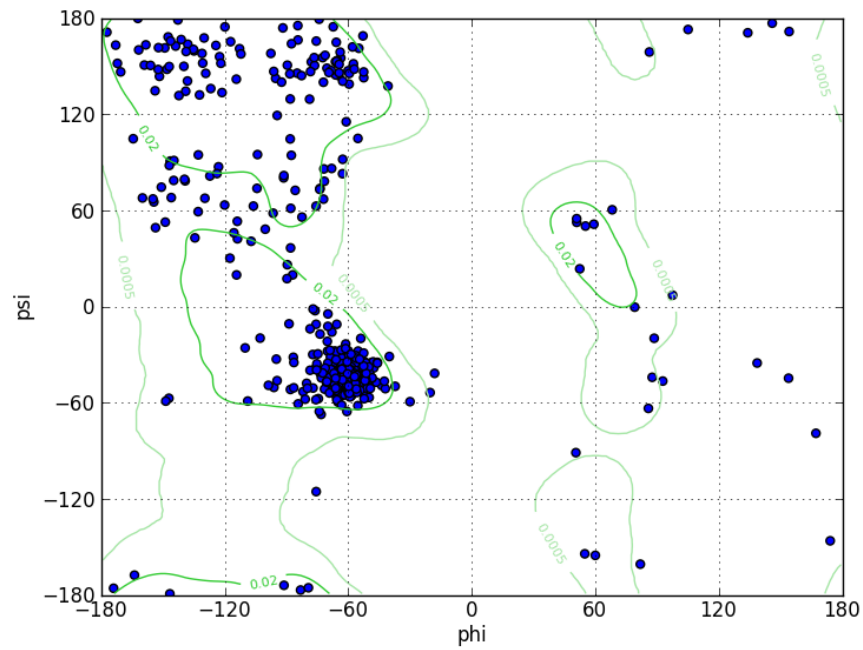
**Supplementary data 3.** SDHI tolerance evaluation according IC<sub>50</sub> (mg.L<sup>-1</sup>) for *cyp51* overexpression strains (a) and MDR strains (b). Resistance factor indicated in parenthesis was calculated by the ratios IC<sub>50</sub> field isolate/IC<sub>50</sub> IPO323.

**a**

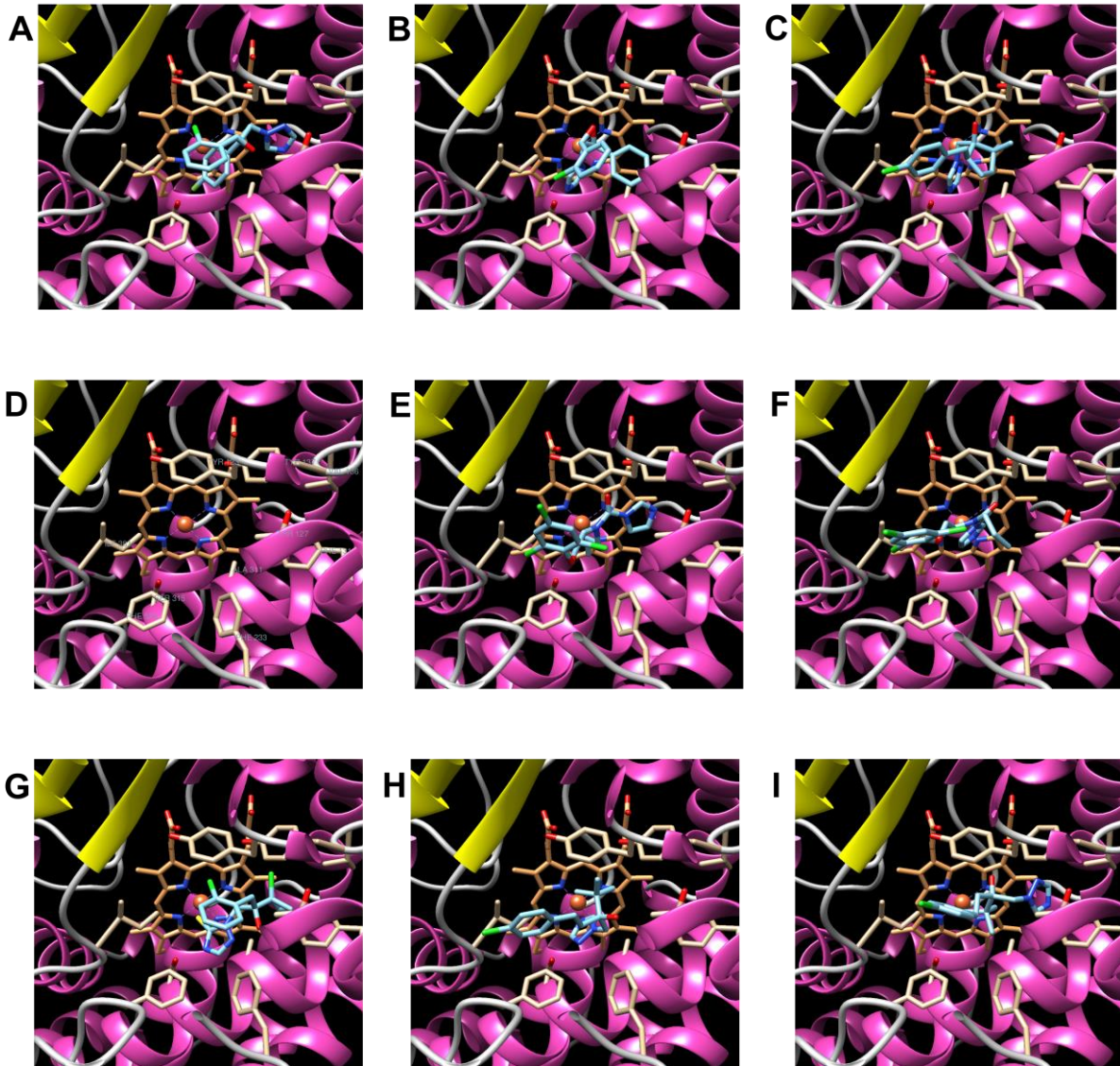
<i>Z. tritici</i> strains	Boscalid	Fluxapyroxad	Tolnaftate
1 <sup>°</sup>	0,83 (2)	0,65 (4)	0,16 (1)
2 <sup>°</sup>	0,88 (2)	0,46 (3)	0,50 (3)
4 <sup>°</sup>	2,06 (5)	0,70 (4)	0,38 (2)
6 <sup>°</sup>	0,93 (2)	1,43 (8)	0,45 (3)
9 <sup>°</sup>	1,58 (4)	0,55 (3)	0,25 (1)
18 <sup>°</sup>	0,64 (1)	0,48 (3)	0,19 (1)
25 <sup>°</sup>	0,85 (2)	0,21 (1)	0,32 (2)
43 <sup>°</sup>	0,64 (1)	0,56 (3)	0,38 (2)
44 <sup>°</sup>	0,90 (2)	0,30 (2)	0,27 (2)
47 <sup>°</sup>	1,72 (4)	1,05 (6)	1,22 (7)
51 <sup>°</sup>	0,91 (2)	0,27 (2)	0,30 (2)
58 <sup>°</sup>	2,02 (4)	1,09 (6)	0,25 (2)
65 <sup>°</sup>	0,71 (2)	0,22 (1)	0,29 (2)
80 <sup>°</sup>	0,73 (2)	0,42 (2)	0,42 (8)
83 <sup>°</sup>	1,28 (3)	0,70 (4)	0,18 (1)

**b**

<i>Z. tritici</i> strains	Boscalid	Fluxapyroxad	Tolnaftate
12 <sup>*</sup>	3,78 (8)	1,49 (8)	0,41 (3)
66 <sup>*</sup>	2,99 (7)	1,60 (9)	0,01 (0)
67 <sup>*</sup>	0,02 (0)	5,44 (31)	1,78 (11)
79 <sup>*</sup>	2,00 (4)	0,95 (5)	>75 (ND)
81 <sup>*</sup>	5,64 (12)	1,80 (10)	4,13 (25)
86 <sup>*</sup>	6,29 (14)	1,63 (9)	1,24 (8)
92 <sup>*</sup>	3,20 (7)	1,19 (7)	>75 (ND)



**Supplementary data 4.** Ramachandran plot of CYP51 enzyme. Only 14 residues were outside the generously allowed profil, of which only 3 were not prolines or glycines (Val 136, Ser 352 and Glu 454).



**Supplementary data 5.** Docking of CYP51 *in silico* modelisation for epoxiconazole (a, b), metconazole (c, d), prochloraz (e, f) prothioconazole (g) and tebuconazole (h, i).



## ARTICLE 2 : TEMPERATURE VARIABILITY DID NOT AFFECT THE MULTIDRUG RESISTANCE MECHANISM TOWARDS DEMETHYLATION-INHIBITORS IN *ZYMOSEPTORIA TRITICI*

*Zymoseptoria tritici*, causant la septoriose du blé, est actuellement la maladie du blé la plus dévastatrice au monde. La lutte contre cet agent pathogène repose principalement sur l'utilisation de fongicides chimiques, tels que les inhibiteurs de déméthylation (IDM). Cependant, une diminution de l'efficacité de ces fongicides a été observée au champ, en raison de l'apparition et de la généralisation de génotypes très résistants de ce champignon. Lors des programmes de gestion de *Z. tritici*, les fongicides sont généralement appliqués lorsque les températures sont basses (mars-avril) ou parfois élevées (mai-juin). Cependant, l'effet de la température sur l'expression des mécanismes de résistance au DMI chez *Z. tritici* n'a jamais été étudié, bien qu'un tel facteur physique puisse influencer de façon significative la physiologie et la biochimie du champignon au niveau cellulaire. Par conséquent, nous avons utilisé un ensemble de 50 isolats monospores de *Z. tritici* collectés dans le nord de la France, de génotypes distincts après analyses à l'aide de marqueurs microsatellites, ainsi que l'isolat de référence IPO323, pour examiner l'effet de la température sur les mécanismes de résistance aux IDM. Tous les isolats évalués contiennent des altérations sur la protéine CYP51, la cible des IDM, tandis que 14 d'entre eux surexpriment le gène *cyp51* et six sont multirésistants (MDR).

Tous les isolats ont été cultivés sur un milieu PDA supplémenté ou non avec de l'époxiconazole ou du tébuconazole à 1 ou 5 mg.L<sup>-1</sup> et incubés à différentes températures (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 et 35 °C). Aucune croissance fongique n'a été observée aux températures extrêmes testées (0 et 35 °C) après deux semaines d'incubation. Les taux de croissance optimaux ont été enregistrés à 25 °C, suivis par les conditions à des températures de 20, 15, 30, 10 et 5 °C, respectivement. À 5 et 10 °C, la croissance fongique a été fortement affectée dans les conditions où l'époxiconazole était administré à 1 mg.L<sup>-1</sup>, comparativement au tébuconazole à 1 mg.L<sup>-1</sup>, sauf dans le cas des isolats MDR, ce qui donne à penser que les basses températures peuvent affecter les mécanismes de résistance à l'époxiconazole en raison des altérations du CYP51 et de la surexpression de *cyp51*. Il est intéressant de noter que les isolats MDR, et dans une moindre mesure ceux qui surexpriment le gène *cyp51*, ont affiché des taux de croissance plus élevés en présence de fongicides que les isolats ne portant que des altérations du CYP51.

Un tel comportement a été observé à toutes les températures testées, même à 5 °C et à 30 °C, ce qui indique que le mécanisme d'efflux de fongicides responsable du caractère MDR n'est pas affecté par des températures basses ou élevées. Ainsi, aucun coût d'adaptation thermique n'a pu être détecté pour les souches MDR de *Z. tritici*. Il est donc probable que l'évolution de ces souches problématiques sur le terrain ne pourrait pas être affectée par le



Article 2 : *Temperature variability did not affect the multidrug resistance mechanism towards demethylation-inhibitors in Zymoseptoria tritici*

changement climatique ou les variations saisonnières de température pendant les applications de fongicides.

**Mots-clés** : *Zymoseptoria tritici*, phénotype MDR, fongicides IDM, *fitness*, adaptation thermique.



## **Temperature variability did not affect the multidrug resistance mechanism towards demethylation-inhibitors in *Zymoseptoria tritici***

Myriam Bomble<sup>1</sup>, Claire Ugazio<sup>1</sup>, Clarisse Payet<sup>2</sup>, Constance Tuffet<sup>2</sup>, Patrice Halama<sup>1</sup> and Ali Siah<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut Charles Viollette (ICV-EA 7394), ISA, Univ. Lille, INRA, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d'Opale, F-59000 Lille, France

<sup>2</sup> Bayer CropScience, 16 rue Jean-Marie Leclair, CS 90106, 69266 Lyon Cedex, France

Corresponding author: Ali Siah ([ali.siah@yncrea.fr](mailto:ali.siah@yncrea.fr)) +33 3 28 38 48 48





## Abstract

*Zymoseptoria tritici*, causing Septoria tritici blotch of wheat, is currently the most devastating disease of wheat worldwide. The management of this pathogen relies mainly on the use of chemical fungicides, such as demethylation inhibitors (DMIs). However, a decrease in the efficacy of these fungicides was observed in the field, due to an apparition and widespread of highly resistant genotypes of this fungus. During the management programs of *Z. tritici*, fungicides are generally applied when the temperatures are low (March-April) or sometimes high (May-June). However, the effect of temperature on the expression of DMIs resistance mechanisms in *Z. tritici* have never been studied, although such a physical factor can significantly influence fungal physiology and biochemistry at the cellular level. Hence, we used a set of 50 single-spore *Z. tritici* isolates collected from northern France, and preliminarily verified as different genotypes using microsatellite markers, as well as the reference isolate IPO323, to examine the effect of temperature on DMIs resistance mechanisms in this fungus. All assessed isolates contain alterations on the CYP51 protein, the target of DMIs, while 14 of them overexpress the *cyp51* gene and six are multidrug resistant (MDR). All isolates were grown on PDA medium supplemented or not with epoxiconazole or tebuconazole at 1 or 5 mg.L<sup>-1</sup> and incubated at different temperatures (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, and 35 °C). No fungal growth was observed at the tested extreme temperatures (0 and 35 °C) after two weeks incubation. The optimal growth rates were recorded at 25 °C, followed by the conditions at temperatures 20, 15, 30, 10, 5 °C, respectively. At 5 and 10 °C, fungal growth was strongly affected in conditions with epoxiconazole at 1 mg.L<sup>-1</sup> when compared to tebuconazole at 1 mg.L<sup>-1</sup>, except for MDR isolates, suggesting that low temperatures can affect the mechanisms of resistance to epoxiconazole based on CYP51 alterations and *cyp51* overexpression. Interestingly, MDR isolates, and at lesser extent those overexpressing the *cyp51* gene, displayed higher growth rates in the presence of fungicides when compared to isolates carrying only CYP51 alterations. Such a behavior was observed at all tested temperatures, even at 5 °C and 30 °C, indicating that the mechanism of fungicide efflux responsible for the MDR character is not impacted by low or high temperatures. Thus, no fitness cost due to thermal adaptation could be detected for MDR strains in *Z. tritici*. It is hence likely that the evolution of these problematic strains in the field could not be affected by the climate change or seasonal temperature variations during fungicide applications.

**Keywords** : *Zymoseptoria tritici*, MDR phenotype, DMIs fungicides, fitness, thermal adaptation.



## Introduction

*Zymoseptoria tritici* is the pathogen responsible of Septoria tritici Blotch (STB), one the most devastating foliar diseases of wheat in Europe (Fones and Gurr, 2015). This disease can cause a yield loss of up to 40% (Eyal Z., 1999) especially when agro-environmental conditions are suitable for disease development. The pathogen is an ascomycete from the *Mycosphaerellaceae* family, having a mixed reproductive system: sexual and asexual (Steinberg, 2015). Sexual reproduction generates ascospores spread by the air and distributes the disease over hundred kilometers, while asexual reproduction generates pycnidiospores dispersed more locally with by rain splashing, and that contaminating upper foliar layers and neighboring plants (Steinberg, 2015). These two mechanisms of spreading make the pathogen management very difficult. To control the disease, chemical control is currently the most effective method, based on the use of fungicides such as sterols biosynthesis inhibitors (SBIs), one of the most widely used families against *Z. tritici*, including 14-alpha demethylase inhibitors (DMIs). DMIs have an important rate in the fungicide market (30% of the plant protection products, FRAC), epoxiconazole and tebuconazole which are the most used azoles in conventional agriculture. These molecules inhibit the activity of the 14-alpha demethylase, an enzyme involved in ergosterol biosynthesis, an essential compound of fungal cell membrane (Yang *et al.*, 2013). Over the years, resistant strains have been developed, with the emergence of alterations on the CYP51 protein (the target of DMIs fungicides), thus reducing the efficacy of DMIs. Three independent mechanisms are involved in this resistance. The first concerns alterations of the target CYP51 protein by substitution and/or deletion of amino acids, which reduce DMIs affinity on the catalytic site of the enzyme (Leroux and Walker, 2011; Cools and Fraaije, 2013). This process is evolving, and current populations contain strains with several alterations. Huf *et al.* (2018) recorded a total of 25 alterations on the target enzyme in the European population. The second mechanism is *cyp51* gene overexpression due to the insertion of a 120 bp sequence in the promotor region of this gene (Cools *et al.*, 2012). The number of CYP51 cytosolic increases and causes a reduction of azole sensitivity, especially for epoxiconazole (Cools *et al.*, 2012). Because of its progressive evolving process, DMIs resistance has become increasingly robust, leading to the emergence of a new resistance phenotype called multidrug resistance (MDR) (Omrane *et al.*, 2015). This phenotype causes the overexpression of the membrane transporter MgMSF, an efflux transporter involved in cellular detoxification (Omrane *et al.*, 2015). This process affects the effectiveness of DMIs as well as other classes of fungicides (Omrane *et al.*, 2015; Omrane *et al.*, 2017). *Z. tritici* can express simultaneously one, two or the three out of these resistance mechanisms, causing in the fungal strains a high degree of fungicide tolerance (Kirikyali *et al.*, 2017).



Article 2 : Temperature variability did not affect the multidrug resistance mechanism towards demethylation-inhibitors in *Zymoseptoria tritici*

In France, the rate of MDR strains evolved rapidly these later years. For instance, their rate increased from 7.9 % in 2015 to 16 % in 2018 (Arvalis-Institut du Végétal, 2018). These strains present a high risk for the farmers because they can also express a resistance, fortunately low, to the new generation of succinate dehydrogenase inhibitors (SDHIs) introduced in 2010. No study explains the increase in the rate of MDR strains, but the hypothesis of this increase is based on the adaptive capacity of these strains, linked to the *Z. tritici* fitness. Fitness is defined as the ability of a living organism to survive and to reproduce in the environment in which it is located. An organism which is the most adapted will contribute genetically to the next generations (Pringle and Taylor, 2002; Orr, 2009). Pathogens can acquire new genetic and/or phenotypic traits giving them a selective advantage, which allows them to adapt more easily to the means of control deployed such as fungicides.

Temperature is considered in the fitness concept. It is an important abiotic factor, which affects the growth, the reproduction, the development and the surviving of organisms (Zhan and McDonald, 2011). Organisms must adapt to temperature ranges to adapt to climate change or even to colonize new biotopes (Nuismer and Gandon, 2008). The two strategies of fungal pathogens to adapt to different evolving thermal environments are based on phenotypic plasticity and genetic differentiation (Yamori *et al.*, 2010; Lendemman *et al.*, 2016). Phenotypic plasticity is defined as an individual response that allows the same genotype to produce different phenotypes in different environments. Genetic differentiation is a population-based response where individuals with different alleles are selected according to the local environment. Over generations, the selection pressure by different temperatures can lead to changes in the genetic basis of temperature adaptation. For example, the European populations of *Puccinia striiformis f. sp. tritici*, are firstly adapted to cold thermal ranges. After the 2000s, two new races, able to develop in warm climates, have emerged, creating a spread of the pathogen to previously unfavorable areas (Mboup *et al.*, 2012). Similar adaptation patterns were observed for *Rhynchosporium commune*, which adapted to higher temperatures (22°C) than its original Scandinavian climate (Stefansson *et al.*, 2013). *Z. tritici* is present in wheat fields all over the world and growth, reproduces, survive at wide temperature range. This pathogen expresses high plasticity in response to the stress induced by this factor (Zhan and McDonald, 2011; Jorgensen *et al.*, 2015; O'Driscoll *et al.*, 2014). A study conducted on a total of 138 strains of *Z. tritici* from three continents scanning various thermal environments found evidence of thermal adaptation (Zhan and Mc Donald, 2011). The authors concluded that thermal adaptation was mainly due to genetic differentiation rather than phenotypic plasticity.

The north of France is in a maritime zone, where the humidity and other environmental conditions are suitable for the development of *Z. tritici*. The pressure of fungicides in this area is



Article 2 : Temperature variability did not affect the multidrug resistance mechanism towards demethylation-inhibitors in *Zymoseptoria tritici*

very high, leading to the selection of strains that are highly resistant to DMIs, such as MDR strains. The average temperature in Northern France is ranged between 6 and 9 °C (Météo-France). The optimal temperature for *Z. tritici* growth is estimated to 18 °C (Guo and Verreet, 2007). The first fungicide applications on wheat to control *Z. tritici* are performed when the wheat stage reaches one or two nodes corresponding to a period between March and April, when the average temperature for these months is around 7°C (Arvalis-Institut du Végétal, 2018 ; Météo-France, 2019). Moreover, last fungicide applications on wheat against *Z. tritici* can also occur during May or June, when the temperature can be warmer. Nevertheless, the impact of such low or high temperatures on the efficacy of fungicides and the expression of fungicide resistance in *Z. tritici* have never been studied. In addition, no study was performed to assess the effect of temperature on the expression of fungicide resistance in MDR strains of *Z. tritici*. The objective of the present study was thus to investigate the effect of temperature on the growth and the expression of fungicide resistance in *Z. tritici*, especially in the MDR strains. The assays were performed *in vitro* using 51 fungal strains differing in their resistance patterns towards two DMIs, including epoxiconazole and tebuconazole.



## Materials and methods

### Fungal strains and their DMIs resistance pattern determination

A sampling of wheat leaves infected with STB was performed in 2016 from two experimental trials located in Hauts-de-France, in Northern France. A total of 50 single-spore isolates were obtained from the infected leaves, using the isolation protocol described in Siah *et al.* (2010). The reference strains IPO323, isolated in the Netherlands was included in the study (Kema and Silfhout, 1997). Briefly, leaves were incubated in a humid chamber at 20°C during 20°C for 48h. Cirrus was collected with a sterile needle and dissolved in a sterile water for spread on Potatoes Dextrose Agar medium (PDA, Sigma) at 39 g.L<sup>-1</sup>. After 6 days incubation, the 50 strains were analyzed for their DMIs resistance by 4-part sequencing of the *cyp51* gene, according to Leroux *et al.* (2007). Thereafter, half-maximal inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) were determined for two DMIs, including epoxiconazole (EPZ) and tebuconazole (TBZ) (Pestanal-Sigma), using microplate bioassays as described by Siah *et al.* (2010). Additional mechanisms involved in DMIs resistance were also characterized in the strains, such as the overexpression of either *cyp51* or MgMSF1 efflux transporter causing MDR phenotype, characterized by the insert detection methods reported by Cools *et al.* (2012) and Yamashita and Fraaije (2018), respectively. All strains are genetically different after being tested with a panel of 8 microsatellites (Siah *et al.*, 2018).

### Inoculum production and temperature assays

Strains were cultivated in Petri dishes on PDA medium for six days at 20°C with white light cycle (16h/day). After incubation, spores were harvested by washing the cultures with 10 mL of sterile distilled water. Spore suspensions were adjusted at 5x10<sup>5</sup> spores. mL<sup>-1</sup>, according to Siah *et al.* (2010). Fungicides (epoxiconazole and tebuconazole, Pestanal-Sigma) were weighed and dissolved in 500 µL of dimethylsulfoxide (DMSO, AppliChem). Fungicide solutions were added to PDA medium between 30 and 40°C after medium autoclaving at different concentrations: 1 mg.L<sup>-1</sup> and 5mg.L<sup>-1</sup>. All different media were poured into 12-well microplates (Greiner bio-one, GBO). The control conditions are PDA medium without fungicide, with or without the fungus. Each well contains 2 mL of medium and each strain is tested in four repetitions for each condition. For inoculation, a volume of 5 µL of the adjusted spore suspension is spotted in the center of each well. After spot drying, plates were incubated at 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C and 30°C in obscurity. Fungal growth was measured at 14 days of incubation, by calculating the surface of the colonies according to the formula  $S = r^2 * \pi$ , where  $d$  is the average



*Article 2 : Temperature variability did not affect the multidrug resistance mechanism towards demethylation-inhibitors in *Zymoseptoria tritici**

of the perpendicular colony diameters. For some temperature (5,10°C and 30°C), a picture was taken and digitally analyzed via Image J to determine the surface of the non-homogenous colonies.

### **Statistical analysis**

The descriptive statistics (average and standard deviation (SD) were calculated using Xlstat software. Half-maximal inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) were determined for two DMIs (epoxiconazole, tebuconazole) using the XLSTAT software<sup>®</sup> (Addinsoft).



## Results

### DMI-resistance patterns of the assessed *Z. tritici* strains

A total of 51 *Z. tritici* strains, including 50 strains isolated from northern France, and one sensitive reference strain (IPO323) isolated from the Netherlands, were assessed for their resistance patterns towards DMIs fungicides. All strains showed CYP51 alterations on their *cyp51* gene, while 14 of them expressed *cyp51* gene overexpression and six of them exhibited the MDR character (**Table 1**). The strains showed overall different phenotypic resistance patterns against the tested DMIs (tebuconazole, epoxiconazole). The IC<sub>50</sub> values vary depending on the tested fungicide and the tested strain (**Table 1**).

### *Z. tritici* *in vitro* growth varies depending on the temperature and fungicide concentration

A total of 51 *Z. tritici* strains, including 50 strains isolated from northern France, and one reference sensitive strain (IPO323) isolated from the Netherlands, were assessed for their *in vitro* growth at different temperatures (0, 5, 10, 15, 20, 25, and 30 °C) and five conditions (control without fungicide, epoxiconazole at 1 or 5 mg.L<sup>-1</sup>, and tebuconazole at 1 or 5 mg.L<sup>-1</sup>). As expected, the higher growth rates were obtained in the conditions without fungicide (control) at all tested temperatures (**Figure 1**). Likewise, higher growth levels were found, at all temperatures tested, within the conditions with fungicide at 1 mg.L<sup>-1</sup> than in those with fungicide at 5 mg.L<sup>-1</sup>. Regarding the temperatures, the maximum growth rates were recorded at 25 °C, with an average of 1.23 cm<sup>2</sup> colony surface (SD=0.42) in the control without fungicide, followed then by the conditions at temperatures 20, 15, 30, 10, 5 °C, respectively (**Figure 1**). Interestingly, the strains showed overall lower growth rate at 5 °C than at 30 °C. No fungal growth was observed at the tested extreme temperatures (0 and 35 °C) after two weeks incubation (*data not shown*). Curiously, the growth of *Z. tritici* varies depending on the low or high temperatures. Indeed, higher temperatures seem to rapidly inhibit the fungal growth (no growth at 35 °C, only 10 °C more than the optimal growth temperature 25 °C) when compared to lower temperatures, which seem to slowly inhibit the fungal growth (complete inhibition at 0 °C, corresponding to 25 °C less than the optimal growth temperature 25 °C) (**Figure 1**).



**Table 1.** List of *Z. tritici* strains used in this study and their DMIs resistance patterns at both genetic (CYP51 alternations, *cyp51* gene overexpression and MDR character) and phenotypic (half-maximal inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) against tebuconazole (TBZ) and epoxiconazole (EPZ)) levels.

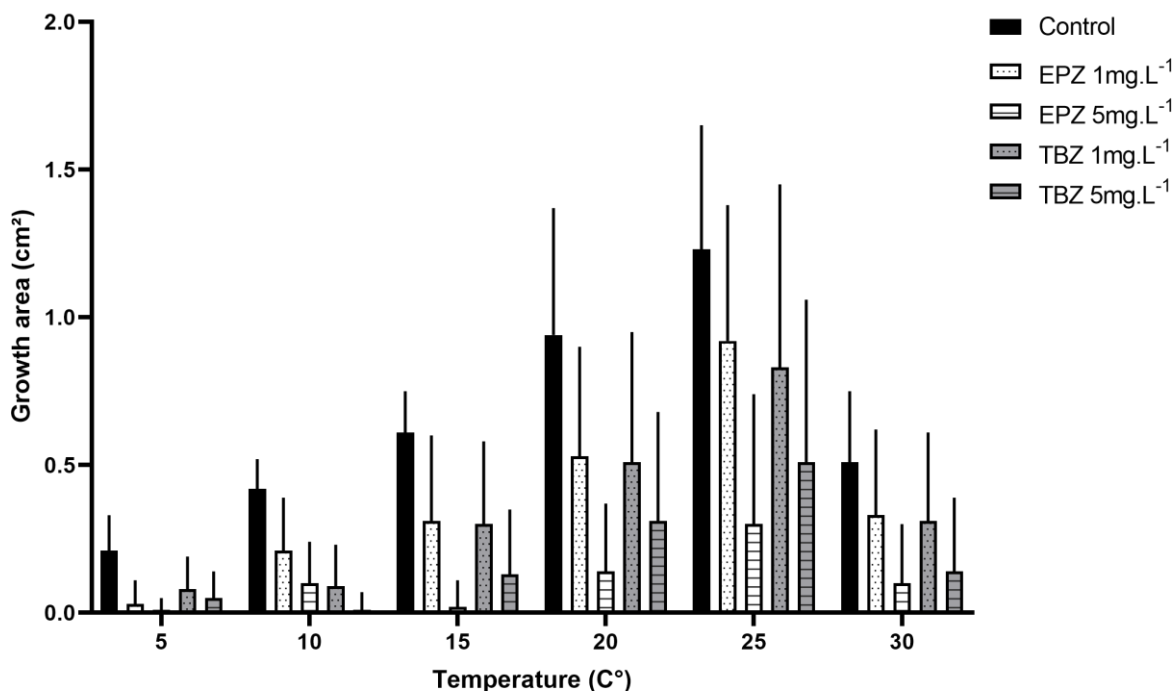
Strain	CYP51 alterations	Additional mechanisms	IC <sub>50</sub> (TBZ)	IC <sub>50</sub> (EPZ)
IPO323	Wild type	-	0.07	0.03
1	L50S D134G V136A I381V Y461H	<i>cyp51</i> surexpression	5.43	1.05
5	L50S S188N I381V ΔY459-D460 N513K	<i>cyp51</i> surexpression	9.42	1.45
7	L50S S188N N284H A379G I381V ΔY459-D460 N513K	-	12.75	0.57
8	L50S S188N I381V ΔY459-D460 N513K	<i>cyp51</i> surexpression	39.03	10.63
9	L50S D134G V136A I381V Y461H	-	0.44	1.42
10	L50S S188N I381V ΔY459-D460 N513K	<i>cyp51</i> surexpression	42.76	6.66
30	L50S V136A S188N A379G I381V ΔY459-G460 N513K	-	0.72	3.65
33	L50S D134G V136A I381V Y461H	-	0.17	0.62
35	L50S S188N I381V ΔY459-D460 N513K	<i>cyp51</i> surexpression	15.54	1.69
36	L50S S188N A379G I381V ΔY459-D460 N513K	-	6.37	1.42
44	L50S V136C S188N I381V Y461H	-	5.16	2.95
46	L50S D134G V136A I381V Y461H	-	0.91	7.7
51	L50S I381V Y461H N513K	-	5.36	1.71
53	L50S S188N I381V ΔY459-D460 N513K	<i>cyp51</i> surexpression	75.00	1.5
66	L50S V136A S188N ΔY459-D460 N513K	-	0.81	3.31
99	L50S S188N I381V ΔY459-D460 N513K	<i>cyp51</i> surexpression	21.07	3.63
103	L50S S188N I381V ΔY459-D460 N513K	<i>cyp51</i> surexpression	12.02	1.62
108	L50S S188N F218L A379G I381V ΔY459-D460 N513K	-	19.04	3.87
109	L50S D134G V136A I381V Y461H	<i>cyp51</i> surexpression	41.69	1.59
113	L50S D134G V136A I381V Y461H	-	0.21	1.29
115	L50S S188N A379G I381V A410T ΔY459-D460 N513K	-	3.24	0.34
119	L50S D176Y S188N I381V ΔY459-D460 N513K	<i>cyp51</i> surexpression	18.85	1.48
120	L50S D134G V136A I381V Y461H	-	0.33	0.34
126	L50S D134G V136A I381V Y461H	-	0.51	0.51
131	L50S S188N F218L I381V ΔY459-D460 N513K	<i>cyp51</i> surexpression	7.73	1.89
134	L50S D134G V136A I381V Y461H	-	0.3	0.98
140	L50S D134G V136A I381V Y461H	-	0.64	1.82
142	L50S D134G V136A I381V Y461H	-	0.65	0.12
149	L50S D134G V136A I381V Y461H	-	1.03	3.53
152	L50S S188N I381V ΔY459-D460 N513K	<i>cyp51</i> surexpression	18.86	3.01
156	L50S D134G V136A I381V Y461H	MDR	4.86	7.47





**Table 1 (end).** List of *Z. tritici* strains used in this study and their DMIs resistance patterns at both genetic (CYP51 alternations, *cyp51* gene overexpression and MDR character) and phenotypic (half-maximal inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) against tebuconazole (TBZ) and epoxiconazole (EPZ)) levels.

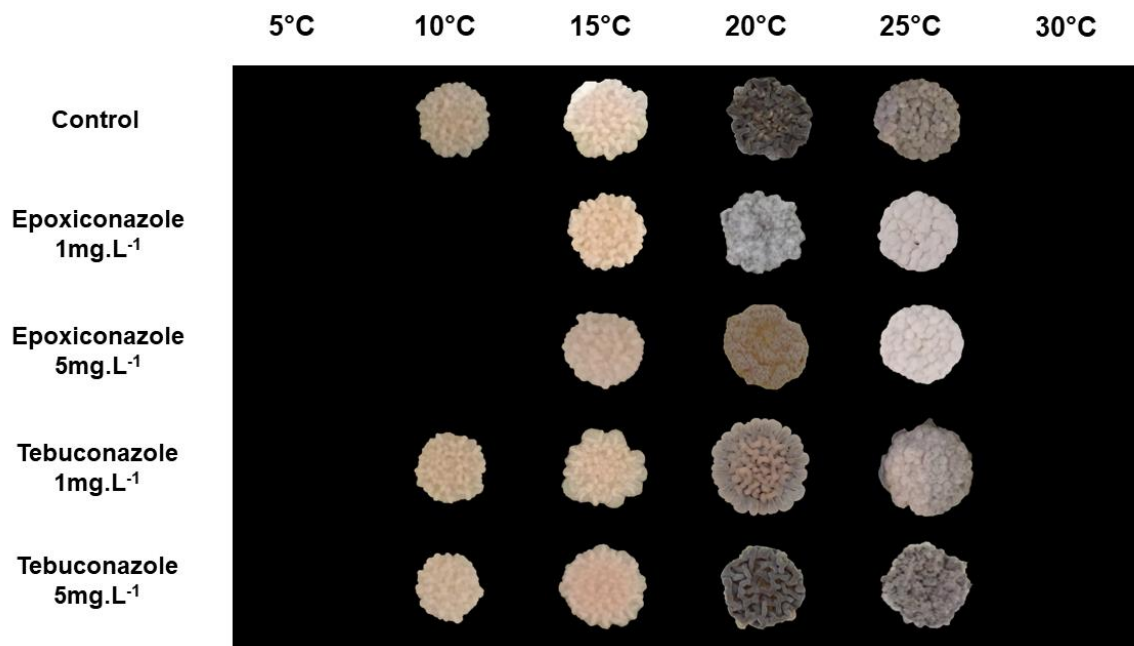
Strain	CYP51 alterations	Additional mechanisms	$IC_{50}$ (TBZ)	$IC_{50}$ (EPZ)
165	L50S D134G V136A I381V Y461H	MDR	5.26	6.72
170	L50S V136C S188N A379G $\Delta$ Y459-D460 N513K	-	6.78	23.93
171	L50S S188N A379G I381V A410T T447I $\Delta$ Y459-D460 N513K	-	3.52	4.36
178	L50S S188N A379G I381V L385M $\Delta$ Y459-D460 N513K	-	5.75	10.76
179	L50S D134G V136A I381V Y461H	-	0.48	1.59
180	L50S S188N A379G I381V L385M $\Delta$ Y459-D460 N513K	-	0.7	0.53
183	L50S D134G V136A I381V Y461H	-	0.52	1.61
185	L50S D134G V136A I381V Y461H	MDR	3.53	8.03
186	L50S S188N I381V $\Delta$ Y459-D460 N513K	<i>cyp51</i> surexpression	2.33	0.86
187	L50S V136C S188N A379G $\Delta$ Y459-D460 N513K	MDR	75.00	15.05
194	L50S S188N I381V $\Delta$ Y459-D460 N513K	<i>cyp51</i> surexpression	18.71	2.98
204	L50S V136C S188N $\Delta$ Y459-D460 N513K	MDR	15.51	10.56
207	L50S D134G V136A I381V Y461H	-	0.47	1.39
210	L50S S188N A379G I381V $\Delta$ Y459-D460 N513K	-	2.31	0.39
214	L50S D134G V136A I381V Y461H	-	2.07	3.79
215	L50S V136A S188N A379G I381V $\Delta$ Y459-D460	-	1.76	64.3
217	L50S D134G V136A I381V Y461H	MDR	4.82	7.61
225	L50S D134G V136A I381V Y461H	-	9.00	3.42
231	L50S D134G V136A I381V Y461H	-	0.55	0.91



**Figure 1.** *In vitro* growth average of 51 *Z. tritici* strains at different temperatures (5, 10, 15, 20, 25 and 30 °C) and at five fungicide conditions (control without fungicide, epoxiconazole at 1 or 5 mg.L<sup>-1</sup>, and tebuconazole at 1 or 5 mg.L<sup>-1</sup>).

Changes in temperature and fungicide concentration caused a strong variability for *in vitro* phenotypic behaviors of the strains, expressed by different colony colors and pigmentations (**Figure 2**). Different colony colors were observed (e.g. pink, white, grey and black), depending on the temperature and the corresponding fungicide molecule and concentration. The effect of temperature on the variability of the fungal colony colors seems to be higher than the effect caused by the presence of fungicides, as illustrated in the **Figure 2**. Indeed, lower temperatures (5 and 10 °C) makes the colonies pinkish, while the higher temperature (20 and 25 °C) makes the colonies blackish (**Figure 2**).

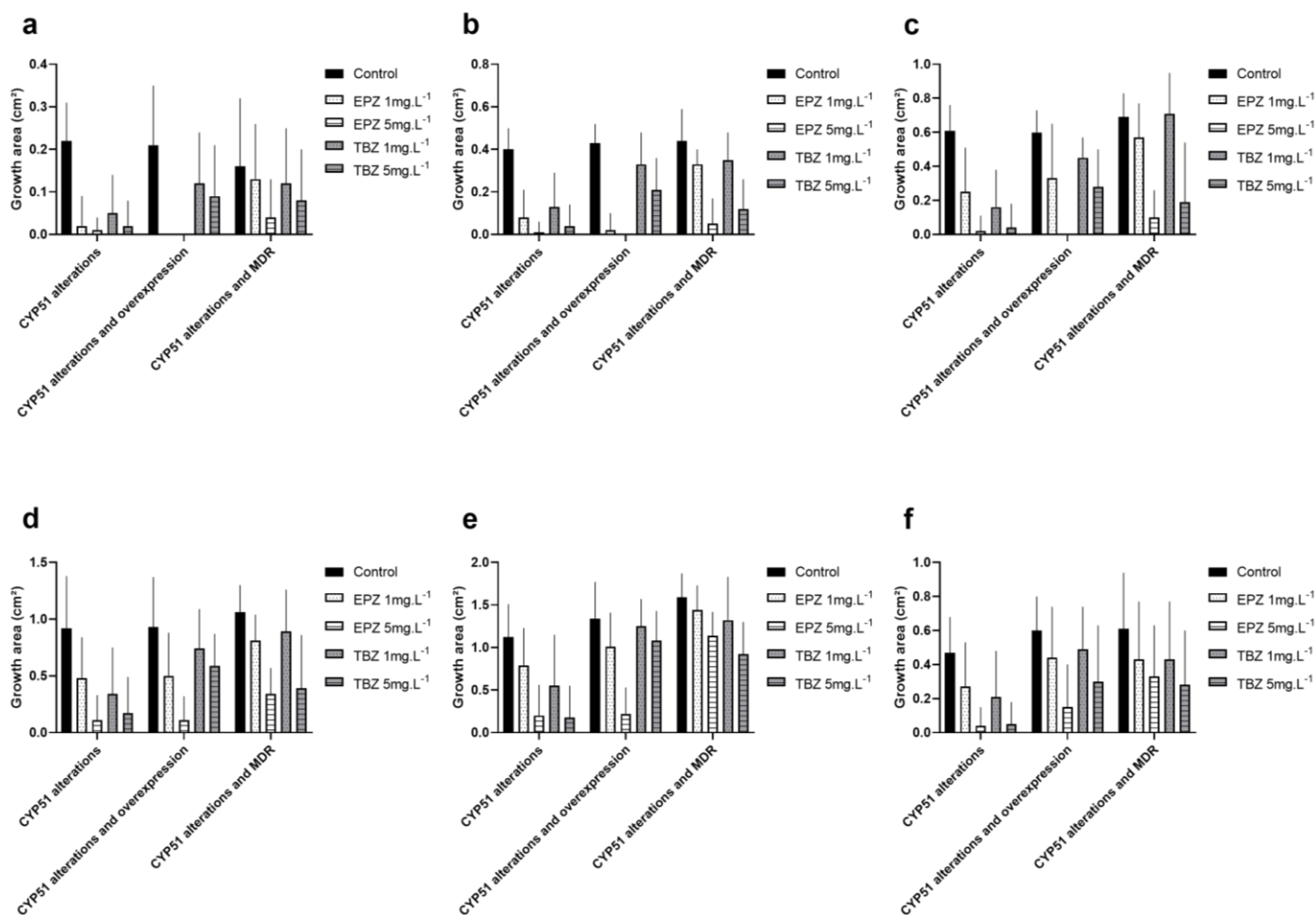
Likewise, a variability in the rate of fungal growth was also observed among the strains, depending on the temperature and the corresponding fungicide and concentration. For instance, the strain 109 showed a significant growth at 10 °C in the presence of tebuconazole at both used concentrations (1 and 5 mg.L<sup>-1</sup>), while no growth of this strain was scored at the same temperature in the presence of epoxiconazole at both concentrations (**Figure 2**). Other patterns of variations in fungal growth were also observed for other strains at the extreme temperatures, such as 5, 10 and 30 °C (*data not shown*).



**Figure 2.** Variability in the colony phenotype observed for the *Z. tritici* strain 109 after two weeks incubation in different temperatures and different fungicide concentrations.

### **MDR and *cyp51*-gene overexpressing strains are less impacted by temperature variations in the presence of DMI fungicides**

At all tested temperatures, the strains showed higher growth in the control compared to conditions where the medium is supplemented by fungicides (**Figures 3, Supplementary data 1**). As expected, the fungal growth was higher at the fungicide concentration 1 mg.L<sup>-1</sup> than at 5 mg.L<sup>-1</sup> (**Figure 3**). In the presence of fungicides, the MDR strains, and at lesser extent the strains overexpressing the *cyp51* gene, exhibited overall higher growth rates when compared to strains possessing only CYP51 alterations (**Figures 3, Supplementary data 1**). This higher growth of the MDR strains was observed at the optimal temperature (25 °C) as well as at the extreme temperatures (5 and 30 °C). However, a strong variability among the strains was observed, especially at the extreme temperatures (5 and 30 °C), as revealed by the high standard deviations obtained among the strains within these two temperatures (**Figure 3**). Interestingly, for epoxiconazole and tebuconazole at 1 mg.L<sup>-1</sup>, the growth for all strains was very close for these two conditions at all temperatures higher than 10 °C. However, at lower temperature (5 and 10 °C), the fungal growth was strongly affected in conditions with epoxiconazole at 1 mg.L<sup>-1</sup> when compared to conditions with tebuconazole at 1 mg.L<sup>-1</sup>, except for MDR strains. For instance, at 5 °C, no growth was noticed for the strains overexpressing the *cyp51* gene in epoxiconazole conditions at both tested concentrations, while noticeable growth was scored for MDR strains at these conditions (**Figure 3**). Such behaviors indicate that the response to temperature and fungicide concentrations varies among *Z. tritici* strains differing in their DMIs resistance patterns.



**Figure 3.** Rates of *in vitro* growth of *Z. tritici* strains with different DMIs resistance mechanisms at different temperatures (a : 5°C, b : 10°C, c : 15°C, d : 20°C, e : 25°C and f : 30°C) and at different concentrations of epoxiconazole (EPZ) and tebuconazole (TBZ). The rates were determined by averaging the colony surfaces obtained for all strains with the same DMIs resistance pattern. n = 31 for strains with CYP51 alterations only, n = 14 for strains with CYP51 alterations and overexpressing the *cyp51* gene, and n = 6 for strains with CYP51 alterations and the MDR phenotype.



## Discussion

We investigated here whether the temperature affects the expression of DMIs resistance mechanisms in *Z. tritici*, the main pathogen on wheat crops, using fungal strains obtained in 2016 from northern France, where the agro-climatic conditions are suitable for fungal development. Fungicide pressure is very high in this region, which leads to the development of fungal genotypes highly resistant to fungicides, such as MDR strains, as showed by our results and previous reports with one out of two strains showing high tolerance to IDM and 14% MDR strains in 2019 (Note commune 2019, INRA, Anses, ARVALIS – Institut du Végétal). Previous studies on fungicide resistance were performed by incubating the fungus at optimal growth temperatures. However, wheat crops are generally treated in the field at low temperatures (March-April) or sometimes at high temperatures (May-June). Temperature is an abiotic factor involved in natural selection. Each individual can grow and reproduce according to a range of temperatures, allowing it to tolerate seasonal or daily fluctuations.

Karaoglanidis and Thanassouloupoulos (2002) examined the phenotypic stability of flutriafol resistance within strains of *Cercospora beticola*. After successive transfers of the strains *in vitro* or *in vivo* in the absence of flutriafol, the sensitivity remained unchanged. Conversely, when fungal strains have been exposed to cold conditions, either as mycelial isolates or conidia, an increase in sensitivity has been observed. This increase was more pronounced for strains with moderate and high levels of resistance to DMIs. In our study on *Z. tritici*, low temperatures such as 5 and 10°C appear to affect the development of strains with CYP51 alterations only, but do not appear to affect the growth of MDR strains at the concentration of 1 mg.L<sup>-1</sup> of epoxiconazole and tebuconazole. At 5°C, a slight effect was observed on *cyp51*-overexpressing strains, by a division of the growth by a factor of two for the concentration of 1 mg.L<sup>-1</sup> tebuconazole. The same development as for MDR strains was observed at 5 mg.L<sup>-1</sup> tebuconazole. The IC<sub>50</sub> average of the MDR strains is 18.16 mg.L<sup>-1</sup> for tebuconazole and 8.89 mg.L<sup>-1</sup> for epoxiconazole. Overall, the same pattern is observed for temperatures of 10°C. Low temperatures (5°C) affect the development of *Z. tritici* but the presence of fungicide allows the development of MDR strains. The development of MDR strains of *Z. tritici* at low temperatures indicates that cold temperatures do not affect the mechanisms of membrane efflux process involved in resistance.

At temperatures of 15 and 20 °C, MDR strains have the largest average of measured surface area. The growth of CYP51-altered strains overexpressing *cyp51* gene have the same growth in the control and epoxiconazole 1 and 5 mg.L<sup>-1</sup>. Nevertheless, for tebuconazole, strains with additional mechanisms have the same pattern of growth than MDR strains.



Article 2 : Temperature variability did not affect the multidrug resistance mechanism towards demethylation-inhibitors in *Zymoseptoria tritici*

Strains with CYP51 alterations only have an average surface area half as small as the average surfaces of MDR strains and strains overexpressing *cyp51* gene for both concentrations of tebuconazole. Interestingly, the optimal temperature of the population tested was measured at 25 °C for all the three categories of strains. The maximum average surface area was reported for MDR strains with 1.59 cm<sup>2</sup> in the control, i.e. +41 % more growth than in strains without additional resistance mechanisms. Interestingly, all strains, including MDR, were able to grow at 30°C, despite their level of growth drastically decreased when compared to 25 °C and no growth was scored at 35 °C. Such findings indicate that high temperatures, but at maximum of around 30 °C, do not affect the expression of the MDR character in *Z. tritici*.

No fitness cost for strains with additional resistance mechanisms was noticed. Their growth is similar to strains showing only CYP51 alterations at low and medium tested temperatures. However, at high temperatures (25 and 30°C), the average surfaces of MDR strains are +30 % higher at 30°C in the control and +41% at 25°C in the control when compared to only CYP51-altered strains. Strains overexpressing the *cyp51* gene also have a greater average surface area of +30% at 30°C in the control and +20% at 25°C in the control compared to the same strains. Such findings suggest that warm conditions can not stop the development of MDR strains of *Z. tritici*. Hence, we can speculate that climate change will not affect the widespread of MDR strains of *Z. tritici*.

*Z. tritici* can set up different mechanisms to adapt to thermal changes. For instance, using quantitative trait loci (QTL) strategy, Lendenmann *et al.* (2016) showed a strong correlation between thermal adaptation of *Z. tritici* and the growth rate, melanization and the morphology of fungal hyphae. Interestingly, we found that the colony color was impacted by the variability in the temperature as well as fungicides and their concentrations. The colony color in *Z. tritici* is mainly conditioned by the melanization. Melanin is composed by dark brown or black pigments formed by oxidative polymerization of phenolic compounds and can be produced by a wide range of plant and human pathogens. Melanin can increase resistance to antimicrobial compounds by reducing the sensitivity of mixed cells and increase virulence by interfering with many mechanisms (*MgSlf2*, *MVE1* and *ZtVelB*) (Yang *et al.*, 2013, Choi and Goodwin, 2011, Tiley *et al.*, 2019). Mehrabi *et al.*, (2009) found that the disruption of *MgSlf2* in IPO323 *Z. tritici* strains resulted in a loss of melanization on PDA medium, a loss of virulence and increased sensitivity to several fungicides including cyproconazole. In *Z. tritici*, the pleiotropic gene *PKS1* involved in the synthesis of a melanin (dihydroxynaphthalene) is thought to have a function on strain growth (Lendenman *et al.*, 2015).



Article 2 : *Temperature variability did not affect the multidrug resistance mechanism towards demethylation-inhibitors in Zymoseptoria tritici*

The presence of the 3D7 PKS1 allele increases melanization leading to slower growth (and therefore less aggressiveness) in the presence and absence of propiconazole (DMIs family), while decreasing susceptibility to this fungicide (Anderson *et al.*, 2003; Lendenman *et al.*, 2015).

This model follows the general paradigm that fungal isolates with more melanization are less sensitive to fungicides with slower growth (Nosanchuk and Casadevall, 2006; Taborda *et al.*, 2008). Lendenman *et al.* (2015) showed that the presence of four accessory chromosomes is associated with small but significant increases in several virulence traits. Lendenman *et al.* (2015) postulate that the PKS1 mutation may explain the emergence of azole resistance and suggests a new disease control strategy for *Z. tritici* with mixtures containing both azoles and DHN melanin inhibitors (e.g. tricyclazole and pyroquilon). It would be interesting to test this mixture *in vitro* to see if a growth reduction is visible.

Our results report that highly DMIs-resistant strains of *Z. tritici*, including MDR strains, can express their resistance mechanisms even at low and high temperatures, highlighting the strong ability of fungal adaptation to thermal conditions and fungicide pressure. The MDR phenotype alerts scientists because of their resistance to multiple fungicide families and does not seem to have a fitness cost in terms of *in vitro* growth. However, it would be interesting to measure this fitness cost *in planta* at different temperatures and DMIs concentrations, to verify if the growth of MDR strains is not affected during interactions with wheat cultivars.

## Acknowledgement

This study was supported by Bayer CropScience in the framework of a CIFRE-PhD project.



## References

- Cools, H.J., Bayon, C., Atkins, S., Lucas, J.A., Fraaije, B.A., 2012. Overexpression of the sterol 14 $\alpha$ -demethylase gene (MgCYP51) in *Mycosphaerella graminicola* isolates confers a novel azole fungicide sensitivity phenotype. *Pest. Manag. Sci.* 68, 1034–1040. <https://doi.org/10.1002/ps.3263>
- Cools, H.J., Fraaije, B.A., 2013. Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implications for future control. *Pest management science* 69, 150–155.
- Dooley, H., Shaw, M.W., Spink, J., Kildea, S., 2016. Effect of azole fungicide mixtures, alternations and dose on azole sensitivity in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Plant Pathology* 65, 124–136.
- Dosio, A., Mentaschi, L., Fischer, E.M., Wyser, K., 2018. Extreme heat waves under 1.5°C and 2 °C global warming. *Environ. Res. Lett.* 13, 054006. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aab827>
- Eyal, Z., 1999. The Septoria Tritici and Stagonospora Nodorum Blotch Diseases of Wheat. *European Journal of Plant Pathology* 105, 629–641. <https://doi.org/10.1023/A:1008716812259>
- 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>
- Guo, J.-R., Verreet, J.-A., 2008. Formation and germination of *Septoria tritici* secondary conidia as affected by environmental factors. *Journal of Phytopathology* 156, 635–637.
- 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*. <https://doi.org/10.1111/ppa.12891>
- INRA, Anses, ARAVALIS – Institut du Végétal, Note commune Résistances aux fongicides / Céréales à pailles / janvier 2019 [https://www.r4p-inra.fr/wp-content/uploads/2019/01/NC2019\\_cereales.pdf](https://www.r4p-inra.fr/wp-content/uploads/2019/01/NC2019_cereales.pdf)
- Jørgensena, L.N., Bergb, G., Semaskinec, R., Justesena, A.F., Wicczoreka, T.M., 2015. Impact of azoles and SDHI fungicides on disease control and CYP51 mutations in the population of *Zymoseptoria tritici* in winter wheat. *Resistance* 2015.





Article 2 : Temperature variability did not affect the multidrug resistance mechanism towards demethylation-inhibitors in *Zymoseptoria tritici*

Karaoglanidis, G.S., Thanassoulopoulos, C.C., Ioannidis, P.M., 2001. Fitness of *Cercospora Beticola* Field Isolates – Resistant And – Sensitive to Demethylation Inhibitor Fungicides. *European Journal of Plant Pathology* 107, 337–347. <https://doi.org/10.1023/A:1011219514343>

Kirikyali N, Diez P, Luo J, Hawkins N, Fraaije BA, 2017. Azole and SDHI Sensitivity Status of *Zymoseptoria tritici* Field Populations Sampled in France, Germany and the UK during 2015. *Modern Fungicides and Antifungal Compounds* 3, 153–158.

Lendenmann, M.H., Croll, D., McDonald, B.A., 2015. QTL mapping of fungicide sensitivity reveals novel genes and pleiotropy with melanization in the pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genetics and Biology* 80, 53–67.

Lendenmann, M.H., Croll, D., Palma-Guerrero, J., Stewart, E.L., McDonald, B.A., 2016. QTL mapping of temperature sensitivity reveals candidate genes for thermal adaptation and growth morphology in the plant pathogenic fungus *Zymoseptoria tritici*. *Heredity*.

Leroux, P., Walker, A.-S., 2011. Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 $\alpha$ -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest management science* 67, 44–59.

Mboup, M., Bahri, B., Leconte, M., De Vallavieille-Pope, C., Kaltz, O., Enjalbert, J., 2012. Genetic structure and local adaptation of European wheat yellow rust populations: the role of temperature-specific adaptation. *Evol Appl* 5, 341–352. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2011.00228.x>

Nuismer, S.L., Gandon, S., 2008. Moving beyond common-garden and transplant designs: insight into the causes of local adaptation in species interactions. *Am. Nat.* 171, 658–668. <https://doi.org/10.1086/587077>

O’Driscoll, A., Kildea, S., Doohan, F., Spink, J., Mullins, E., 2014. The wheat–Septoria conflict: a new front opening up? *Trends in plant science* 19, 602–610.

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, e00393-17. <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, 2805–2823.



Article 2 : Temperature variability did not affect the multidrug resistance mechanism towards demethylation-inhibitors in *Zymoseptoria tritici*

Orr, H.A., 2009. Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nat Rev Genet* 10, 531–539. <https://doi.org/10.1038/nrg2603>

Pringle, A., Taylor, J.W., 2002. The fitness of filamentous fungi. *Trends in Microbiology* 10, 474–481. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)02447-2](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02447-2)

Siah, A., Deweer, C., Morand, E., Reignault, P., Halama, P., 2010. Azoxystrobin resistance of French *Mycosphaerella graminicola* strains assessed by four in vitro bioassays and by screening of G143A substitution. *Crop Protection* 29, 737–743.

Siah, A., Bomble, M., Tisserant, B., Cadalen, T., Holvoet, M., Hilbert, J.-L., Halama, P., Reignault, P.L., 2018. Genetic structure of *Zymoseptoria tritici* in northern France at region, field, plant and leaf layer scales. *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-17-0322-R>

Stefansson, T.S., McDonald, B.A., Willi, Y., 2013. Local adaptation and evolutionary potential along a temperature gradient in the fungal pathogen *Rhynchosporium commune*. *Evol Appl* 6, 524–534. <https://doi.org/10.1111/eva.12039>

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

Van den Bosch, F., Paveley, N., van den Berg, F., Hobbelen, P., Oliver, R., 2014. Mixtures as a fungicide resistance management tactic. *Phytopathology* 104, 1264–1273. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-14-0121-RVW>

Yamashita, M., Fraaije, B., 2018. Non-target site SDHI resistance is present as standing genetic variation in field populations of *Zymoseptoria tritici*. *Pest Manag. Sci.* 74, 672–681. <https://doi.org/10.1002/ps.4761>

Yamori, W., Noguchi, K., Hikosaka, K., Terashima, I., 2010. Phenotypic Plasticity in Photosynthetic Temperature Acclimation among Crop Species with Different Cold Tolerances. *Plant Physiol* 152, 388–399. <https://doi.org/10.1104/pp.109.145862>

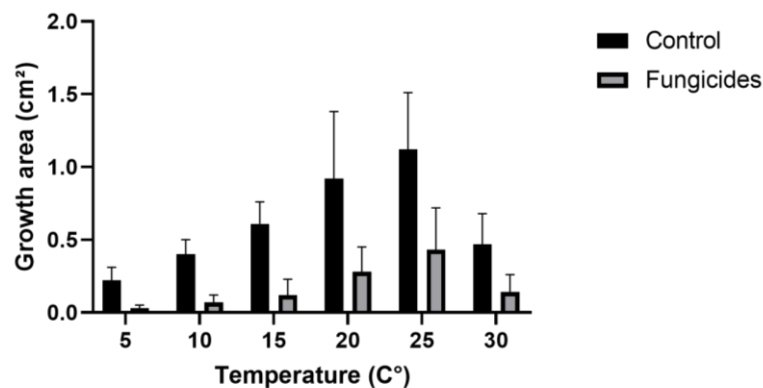
Yang, L., Gao, F., Shang, L., Zhan, J., McDonald, B.A., 2013. Association between Virulence and Triazole Tolerance in the Phytopathogenic Fungus *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS ONE* 8, e59568. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059568>

Zhan, J., McDONALD, B.A., 2011. Thermal adaptation in the fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Molecular ecology* 20, 1689–1701.

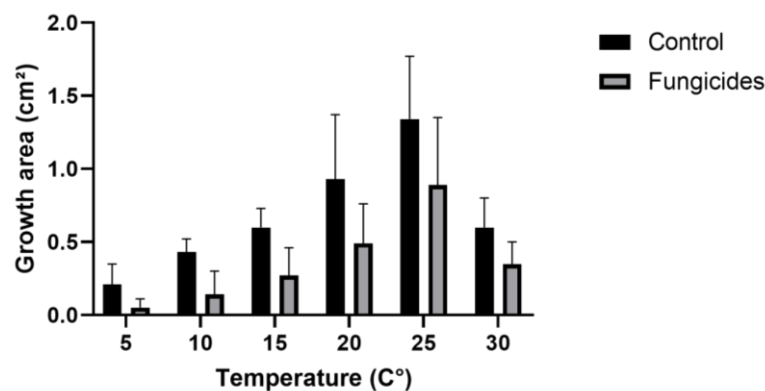


## Supplementary data

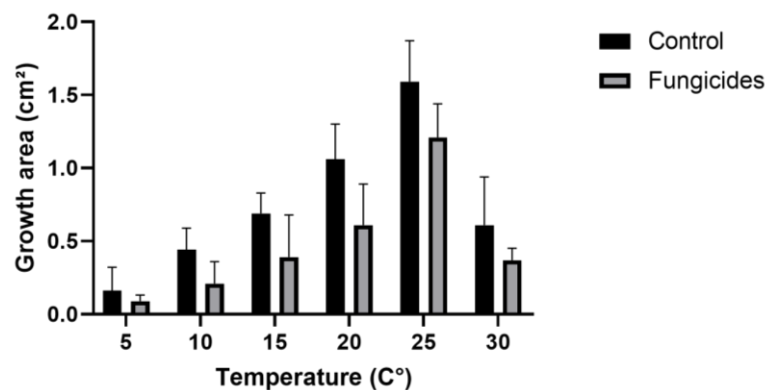
a



b



c



**Supplementary data 1.** Rates of *in vitro* growth of *Z. tritici* strains with different DMIs resistance mechanisms (a, strains with CYP51 alterations only,  $n = 31$ ; b, strains with CYP51 alterations and overexpressing the *cyp51* gene,  $n = 14$ ; c, strains with CYP51 alterations and the MDR phenotype,  $n = 6$ ) at different temperatures and in presence or absence of fungicides (epoxiconazole or tebuconazole at 1 or 5 mg.L<sup>-1</sup>). The rates were determined by averaging the colony surfaces obtained for all strains having the same DMIs resistance pattern.



**Supplementary data 2.** Growth surface average of DMIs-resistant strains of *Z. tritici*. The area average (cm<sup>2</sup>) was measured on 5 different media: control, epoxiconazole (1 and 5mg.L<sup>-1</sup>) and tebuconazole (1 and 5mg.L<sup>-1</sup>). Three categories are listed: CYP51 alterations only, CYP51 alterations with *cyp51* overexpression and CYP51 alteration with MDR phenotype.

Temperature (C°)	<i>Z. tritici</i> strains	Control		Epoxiconazole 1mg.L <sup>-1</sup>		Epoxiconazole 5mg.L <sup>-1</sup>		Tebuconazole 1mg.L <sup>-1</sup>		Tebuconazole 5mg.L <sup>-1</sup>	
		Area average (cm <sup>2</sup> )	Standart deviation	Area average (cm <sup>2</sup> )	Standart deviation	Area average (cm <sup>2</sup> )	Standart deviation	Area average (cm <sup>2</sup> )	Standart deviation	Area average (cm <sup>2</sup> )	Standart deviation
5°C	CYP51 alterations	0.22	0.09	0.02	0.07	0.01	0.03	0.05	0.09	0.02	0.06
	CYP51 alterations and overexpression	0.21	0.14	0	0	0	0	0.12	0.12	0.09	0.12
	CYP51 alterations and MDR	0.16	0.16	0.13	0.13	0.04	0.09	0.12	0.13	0.08	0.12
10°C	CYP51 alterations	0.4	0.1	0.08	0.13	0.01	0.05	0.13	0.16	0.04	0.1
	CYP51 alterations and overexpression	0.43	0.09	0.02	0.08	0	0	0.33	0.15	0.21	0.15
	CYP51 alterations and MDR	0.44	0.15	0.33	0.07	0.05	0.12	0.35	0.13	0.12	0.14
15°C	CYP51 alterations	0.61	0.15	0.25	0.26	0.02	0.09	0.16	0.22	0.04	0.14
	CYP51 alterations and overexpression	0.6	0.13	0.33	0.32	0	0	0.45	0.12	0.28	0.22
	CYP51 alterations and MDR	0.69	0.14	0.57	0.2	0.1	0.16	0.71	0.24	0.19	0.35
20°C	CYP51 alterations	0.92	0.46	0.48	0.36	0.11	0.22	0.34	0.41	0.17	0.32
	CYP51 alterations and overexpression	0.93	0.44	0.5	0.38	0.11	0.21	0.74	0.35	0.59	0.28
	CYP51 alterations and MDR	1.06	0.24	0.81	0.23	0.34	0.23	0.89	0.37	0.39	0.47
25°C	CYP51 alterations	1.12	0.39	0.79	0.44	0.2	0.36	0.55	0.6	0.18	0.37
	CYP51 alterations and overexpression	1.34	0.43	1.01	0.4	0.22	0.31	1.25	0.32	1.08	0.35
	CYP51 alterations and MDR	1.59	0.28	1.44	0.29	1.14	0.28	1.32	0.51	0.92	0.38
30°C	CYP51 alterations	0.47	0.21	0.27	0.26	0.04	0.11	0.21	0.27	0.05	0.13
	CYP51 alterations and overexpression	0.6	0.2	0.44	0.3	0.15	0.25	0.49	0.25	0.3	0.33
	CYP51 alterations and MDR	0.61	0.33	0.43	0.34	0.33	0.3	0.43	0.34	0.28	0.32



### ARTICLE 3 : FITNESS OF ZYMOSEPTORIA TRITICI ISOLATES WITH DIFFERENT RESISTANCE MECHANISMS TOWARDS DEMETHYLATION INHIBITORS

*Zymoseptoria tritici*, agent responsable de la septoriose, est le pathogène le plus fréquent dans les cultures de blé du monde entier. Cependant, la lutte contre ce pathogène est aujourd'hui difficile en raison de l'apparition et de la propagation de souches très résistantes aux fongicides, ce qui entraîne une diminution de l'efficacité au champ de plusieurs fongicides, dont les inhibiteurs de la déméthylation (IDM), les fongicides les plus utilisés pour lutter contre *Z. tritici*. Les souches multirésistantes (MDR) sont actuellement les génotypes fongiques les plus problématiques au champ et leur récente progression en fréquence alerte les agriculteurs ainsi que les scientifiques. Cependant, aucune étude n'a encore été réalisée pour évaluer le degré d'aptitude de ces souches en relation avec leur pathogénicité, l'effet du cultivar et leur compétitivité. Nous avons donc comparé ici plusieurs caractères d'aptitude pour un ensemble de 50 isolats se distinguant par leur niveau de résistance aux IDM, ainsi que l'isolat de référence IPO323, sur deux cultivars de blé (Alixan, sensible, et Rubisko, modérément résistant). Tous les isolats sont porteurs d'altérations de la protéine CYP51, la cible des IDM, tandis que 13 d'entre eux surexpriment le gène *cyp51*, et six sont multirésistants (MDR). Dans l'ensemble, la gravité de la maladie ainsi que les niveaux de densité de pycnides étaient plus élevées sur Alixan que sur Rubisko, avec une corrélation positive trouvée pour ces composants de pathogénicité sur les deux cultivars. Une variabilité marquée de ces composantes a été observée au sein des deux cultivars et entre eux, mais aucune différence significative n'a été constatée entre les isolats ayant des antécédents différents de résistance aux IDM (isolats présentant des altérations du CYP51 seulement, isolats présentant des altérations du CYP51 et une surexpression du gène *cyp51*, et isolats présentant des altérations du CYP51 et un caractère MDR). De même, aucune relation n'a été mise en évidence entre ces différents types d'isolats et la taille des pycnidiospores *in planta* ainsi que les *mating-types*. La co-inoculation d'isolats MDR et non-MDR, suivie d'une ré-isolation fongique et de l'identification des isolats, a montré que les isolats MDR ne sont pas compétitifs *in planta* par rapport aux souches non-MDR, puisque les isolats non-MDR dominent les isolats MDR dans cinq combinaisons sur six sur chaque cultivar, avec une absence d'effet du cultivar sur cette compétition. Cette étude suggère un manque de coût de *fitness* lié à la pathogénicité et aux caractères d'interaction variétale chez les souches de *Z. tritici* très résistantes aux IDM, mais montre un faible degré de compétitivité des souches MDR qui devrait, en outre, être confirmé par une importante collection de champignons et des analyses approfondies.

**Mots-clés** : résistance IDM, *fitness*, *Zymoseptoria tritici*, septoriose, phénotype MDR



## **Fitness of *Zymoseptoria tritici* isolates with different resistance mechanisms towards demethylation inhibitors**

M. Bomble<sup>1,2</sup>, C. Tuffet<sup>2</sup>, C. Payet<sup>2</sup>, P. Halama<sup>1</sup>, Jean Louis Hilbert<sup>1</sup>, A. Siah<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut Charles Viollette (ICV-EA 7394), ISA, Univ. Lille, INRA, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d'Opale, F-59000 Lille, France

<sup>2</sup> Bayer CropScience, 16 rue Jean-Marie Leclair, CS 90106, 69266 Lyon Cedex, France

Corresponding author: Ali Siah ([ali.siah@yncrea.fr](mailto:ali.siah@yncrea.fr)) +33 3 28 38 48 48



## Abstract

*Zymoseptoria tritici*, responsible for Septoria tritici blotch, is the most frequently occurring pathogen on wheat crops worldwide. However, the control of this pathogen is nowadays difficult because of the emergence and widespread of highly fungicide-resistant strains, causing a decrease in the field efficacy of several fungicides, including demethylation inhibitors (DMIs), the mostly used fungicides to control *Z. tritici*. Multidrug resistant (MDR) strains are currently the most problematic fungal genotypes in the field and their recent progression in frequency alerts farmers as well as scientists. However, no study was performed yet to assess the fitness degree of these strains in relationship with their pathogenicity, cultivar effect and competitiveness. We thus compared here several fitness traits for a set of 50 isolates differing in their resistance background towards DMIs, as well as the reference isolate IPO323, on two wheat cultivars (Alixan, susceptible, and Rubisko, moderately resistant). All isolates carry alterations in the CYP51 protein, the target of DMIs, while 13 among them overexpress the *cyp51* gene, and six are multidrug resistant (MDR). Overall, disease severity as well as pycnidium density levels were higher on Alixan than on Rubisko, with a positive correlation found for these pathogenicity components on both cultivars. A marked variability of these components was observed within and among the two cultivars, but no significant difference was found between isolates having different DMIs resistance backgrounds (isolates with CYP51 alterations only, isolates with CYP51 alterations and *cyp51* gene overexpression, and isolates with CYP51 alterations and MDR character). Likewise, no relationship was highlighted between these different types of isolates and the *in planta* pycnidiospore size as well as mating types. Co-inoculation of MDR vs non-MDR isolates followed by fungal re-isolation and isolate identification showed that MDR isolates are not competitive *in planta* when compared to non-MDR strains, since the non-MDR isolates dominated the MDR isolates in five combinations on six on each cultivar, with an absence of cultivar effect on this competition. This study suggests a lack of fitness cost linked to pathogenicity and varietal interaction traits in highly DMIs-resistant strains of *Z. tritici*, but shows a low competitiveness degree of MDR strains that should furthermore be confirmed using a large fungal collection and deepen analyses.

**Keywords:** DMIs resistance, fitness, *Zymoseptoria tritici*, septoria tritici blotch, MDR phenotype



## Introduction

*Septoria tritici* blotch (STB) is a foliar disease caused by the ascomycete fungus *Zymoseptoria tritici*. Currently, this disease is the most destructive on wheat crops around the world (O'Driscoll *et al.*, 2014). This pathogen is considered to be an important fungal pathogen worldwide (Dean *et al.*, 2012). Under favorable conditions, yield losses caused by STB can reach 50 % (Eyal, 1999). In order to keep the disease under control and to guarantee a better yield, the management of STB relies mainly on the use of chemical pesticides (O'Driscoll *et al.*, 2014). In Europe, four classes of fungicides are available, including multi-site inhibitors, sterol 14 $\alpha$ -demethylation inhibitors (DMIs), Quinone outside inhibitors (Qols), and succinate dehydrogenase inhibitors (SDHIs). Because of the rapid decrease in the activity of Qol against STB, they were quickly abandoned in favor of DMIs. Epoxiconazole, tebuconazole and prothioconazole are DMI molecules the most represented on the market. However, during the recent years, a decline in their effectiveness has been observed, with the emergence of *Z. tritici* strains exhibiting reduced sensitivity to DMIs. The resistance could be caused by several mechanisms, such as the occurrence of alterations in the CYP51 protein (the target of DMIs), overexpression of the *cyp51* gene, and overexpression of a gene encoding an efflux transporter, *MgMSF1*, giving a multidrug resistance (MDR) phenotype (Cools *et al.*, 2012; Cools and Fraaije, 2013; Omrane *et al.*, 2015; Kirikyali *et al.*, 2017). The number of CYP51 alterations increases year after year and forms combinations of alterations that become more complex, and leads to strains more resistant. Some strains have up to eight alterations on the CYP51 protein (Huf *et al.*, 2018; Article 1). In Northern Europe, CYP51 alterations are very present and sensitive strains are rare. Indeed, no sensitive strain was detected in a population sampled in 2015 from Northern France (Article 1). Frequent fungicide treatments could also increase the number of highly resistant strains, including MDR phenotype, for which frequencies increased drastically from 2 % to 17 % between 2010 and 2015 (Arvalis-Institut du végétal). The emergence of pathogenic or fungicide-resistant strains often results from punctual mutations that occur randomly in fungal populations (Yan *et al.*, 2013). During selection, these mutations increase in frequency and then spreads rapidly among *Z. tritici* populations via ascospores. *Z. tritici* is characterized by a high genetic diversity coupled with frequent sexual recombination, high gene flow, rapid adaptation and, thus an important role in the emergence of new genotypes (Siah *et al.*, 2018).





Since *Z. tritici* has the ability to perform several cycles throughout the year, the pressure of the environment will lead to recurrent cycles of mutation-selection-recombination, which increases the frequency of phenotypes with the high fitness degree. Cowger and Mundt (2002) have shown that selection by fungicides and disease-tolerant cultivars are major contributors to the evolution of aggressiveness in *Z. tritici*. The two components of aggressiveness that are mainly measured in *Z. tritici* are the percentage of diseased leaf area covered with lesions and the percentage pycnidia present on this lesions. Indeed, between 10-14 days after infection, chlorotic areas begin to appear that later become necrotic lesions. Pycnidia containing asexual pycnidiospores develop mostly within these necrotic lesions in the substomatal cavities. Pycnidiospores are exuded in a gelatinous cirrus during periods of high humidity and are spread throughout the plant canopy by rain splash. Numerous asexual infection cycles occurring during a growing season are the main cause of STB epidemics in the field. Thus, Cowger and Mundt (2002) conclude that more resistant wheat cultivars select the most aggressive isolates, which is more pronounced when fungicides are used (Cowger and Mundt 2002). Yang *et al.* (2013) reported that the aggressiveness of *Z. tritici* strains is positively correlated with fungicide resistance, by using cyproconazole as an active substance. Although these later studies showed an association between pathogenicity traits and fungicide resistance in *Z. tritici*, it is not clear whether this correlation could be observed for other DMIs fungicides or strains from different geographical areas (local adaptation to fungicide pressure). It has been hypothesized that strains are first selected for their high virulence on a given cultivar and then by a second factor such as fungicide resistance (Gandon and Michalakis, 2000 ; Pariaud *et al.*, 2009). Other factors that may influence the pathogenicity of *Z. tritici* include spore size (Lannou, 2012). Indeed, this parameter can influence two key stages of the infectious cycle : dispersal and germination. Simulations have shown that all spores with a diameter of less than 40  $\mu\text{m}$  (generally the case for fungi) have a similar dispersion (Kuparinen *et al.*, 2007). Large spores may contain more nutrient reserves and therefore may have a better germination rate (Sadeghi *et al.*, 2011 ; Larios *et al.*, 2014). It has already been shown in *Z. tritici* that ascospore infection is about three to four days longer than pycnidiospore infection (Morais *et al.*, 2015). Both the environment and competition between pathogens influence the expression of these traits. For many biotrophic fungi, lesion size and spore production per lesion are highly dependent on density because pathogenic individuals compete for host resources and potentially colonizable tissues (Pariaud *et al.*, 2009). This density dependence has major consequences for experimental measurements such as in the rust agent where a high density decreases the rate of spore production per lesion.



Knowledge of the evolutionary biology of plant pathogens is necessary for sustainable management of diseases in agricultural systems. Currently, no studies show the link between fungicide resistance and fitness, particularly from a molecular point of view (effect of CYP51 alterations, *cyp51* overexpression and MDR character on fungal fitness). In relationship with the increasing frequency of MDR strains in the field, this present study aims at understanding if these strains possess a better fitness degree when compared to strains having just CYP51 alterations or having CYP51 alterations and overexpressing the CYP51 protein. To avoid bias, the strains we used were isolated from the same plot and in the same year and therefore evolved under the same environmental conditions. A total of 50 field isolates and one reference strain (IPO323) were assessed by artificial inoculation on two French wheat cultivars : Alixan (susceptible) and Rubisko (moderately susceptible). The fitness of the isolates was determined by measuring several traits of pathogenicity, including disease severity, pycnidia density and spore size. Moreover, in order to examine the competitive power of MDR strains compared to non-MDR strains, six combinations of two strains each were studied on the two cultivars.



## Materials and methods

### Fungal collection, mating-type determination and DMIs sensitivity assays

A total of 50 single-spore isolates were collected in June 2016 from Hauts-de-France, according to the method described by Siah *et al.* (2010). The strains were isolated from the cultivar Bergamo and Terroir. The reference strains IPO323 was included in the study (Kema and Silfhout, 1997). The sampled leaves with STB symptoms were incubated at 20°C for 48 hours in a humid chamber. Emerging from pycnidia, the cirrus was collected using a sterile needle and suspended in 1 mL of sterile distilled water. The spore suspension was then spread on potatoes dextrose agar medium (PDA). After 6 days incubation at 20°C, the DNA was extracted using the phenol-chloroform extraction method used by Siah *et al.* (2010). The tested strains are all genetically different according to the eight microsatellites used in the study of Siah *et al.*, (2018). All strains were characterized for mating-types using a multiplex PCR assay, allowing the amplification of partial sequences from the two mating-type idiomorphs (Waalwijk *et al.* 2002). PCR reactions were performed according to Siah *et al.* (2010). The final PCR products were separated by electrophoresis gel with 1.5% agarose added GelRed® for UV revelation. After a run of 45 min at 100V, the gel was revealed under UV and pictures were captured with a digital camera (Clara Vision, France). The frequency of mating-types was scored manually. For DMIs resistance evaluation, the half-maximal inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) were determined for five DMIs: epoxiconazole (EPZ), tebuconazole (TBZ), metconazole (MTZ), prothioconazole (PTZ) and prochloraz (PZ) using the microplate-based method used by Siah *et al.* (2010). Additional mechanisms of resistance (*cyp51* gene overexpression and MDR character) were determined by insert detection by PCR according to Leroux *et al.* (2008) for *cyp51* overexpression and Yamashita and Fraaije (2017) for MDR. All experiments were carried out using IPO323 (Kema and Silfhout, 1997) as reference sensitive isolate.

### Plant growth and inoculation

Two wheat cultivars, Alixan (Limagrain, Saint-Beauzire, France) and Rubisko (Florimond Desprez, Cappelle-en-Pévèle, France) were used to measure the *Z. tritici* strain aggressiveness. Alixan was considered as a STB susceptible cultivar, while Rubisko was described as a STB moderately resistant cultivar (Arvalis-Institut du végétal). Grains were pre-germinated in Petri dishes (12x12cm) on moist filter paper, according to Siah *et al.* (2010). Germinated grains were disposed into three litter pots filled with universal loam (Gamm Vert, France). Three pots of 12 plants each (36 plants) were used for each strain or combination. All pots were placed in semi-controlled greenhouse at 18°C ± 2 °C with a day-night cycle of 16/8 h.



After three weeks (three leaf stage), each pot was inoculated using a manual hand sprayer with 30 mL spore suspension ( $10^6$  spores.mL<sup>-1</sup>) supplemented with 0.05 % of Tween 20. Inoculum was produced on PDA medium according to Siah *et al.* (2010) at 20°C for 6 days. Spores were harvested by washing the PDA plates with sterile distilled water, and the concentration was adjusted to  $10^6$  spores.mL<sup>-1</sup> using a Malassez cell under microscope (Nikon eclipse 80i). After inoculation, the plants were covered during 72 hours with clear polyethylene bags in order to ensure water-saturated atmosphere compatible with *Z. tritici* development.

### Aggressiveness trait assessments

The disease severity was scored at 21 days post inoculation (dpi) by determining the percentage of the third leaf area covered by lesions (chlorosis or necrosis). The pycnidium density was scored using a scale from 1 to 5, corresponding to 0-20 %, 21-40 %, 41-60 %, 61-80 % and 81-100 % of the scored leaf lesion areas covered by pycnidia. To measure pycnidiospore size, three third leaves were cut, rinsed with 2 mL sterile distilled water and the spore suspension was observed under microscope at 10x (Nikon eclipse 80i). Pictures were captured with a digital camera (DXM1200C) and size was determined by the imaging software NIS-elements BR.

For strain combination modalities, the sporulation capacity of each strain was evaluated by determining the mating-type (MAT1-1 and MAT1-2) of each strain using a multiplex PCR assay, according to Siah *et al.* (2010). At 21 dpi, five third leaves were collected from each strain combination modality and placed in a humid chamber for cirrhous emission. For each leaf, 10 isolates (samples) were isolated randomly and homogeneously on the entire leaf. A total of 50 isolates were obtained and analyzed for each of the six tested combinations, on each cultivar. The isolates were identified by amplifying mating-type idiomorphs by PCR, according to Siah *et al.* (2010). The revelation of PCR products was realized on electrophoresis gel (1.5% agarose) containing Gelred® for UV revelation, after a run at 100V during 45 min. Gel images were captured with a digital camera (Clara vision, France) and the mating-type of each isolate was scored manually.

### Data analyses

The disease severity, pycnidium density and spore size on the two cultivars were analyzed with the ANOVA test at a significance level of  $P = 0.05$  using the XLSTAT® software (Addinsoft, France). The relationship among these aggressiveness components was evaluated using the Pearson correlation analysis at  $P = 0.05$ , using the XLSTAT® software. A *t-test* with  $P$  value equal to 0.05, using the XLSTAT® software, was also performed to estimate the association of the mating-types of the isolates with their aggressiveness components or with their fungicide



*Article 3 : Fitness of Zymoseptoria tritici isolates with different resistance mechanisms towards demethylation inhibitors*

resistance level ( $IC_{50}$ ) towards the five tested DMI, including tebuconazole, metconazole, prothioconazole prochloraz and epoxiconazole. The predominance of each strain within the tested combinations was evaluated by determining the frequencies of the two mating types, since mating types were used as markers for strain identification. The frequency of the two mating types within each combination was assessed using the  $\chi^2$  test at  $P = 0.05$  using the XLSTAT® software.



## Results

### Variability of fungal aggressiveness traits on both wheat cultivars

A total of 51 strains of *Z. tritici* were assessed for several aggressiveness components in semi-controlled (greenhouse) conditions on two wheat cultivars (Alixan and Rubisko). All characteristics (mating-type, IC<sub>50</sub>s of tebuconazole (TBZ) metconazole (MTZ), prothioconazole (PTZ), prochloraz (PZ) and epoxiconazole (EPZ) and additional DMIs resistance mechanisms) are listed in **table 1** for the 51 isolats.

All tested strains induced disease symptoms on the inoculated plants (**figure 1**). On Alixan cultivar, the symptoms obtained at 21 dpi showed an average of 41% (SD = 9.53). The maximum observed infection rate was 57 % (SD = 9.7) caused by strain 204 expressing the MDR phenotype, while the minimum was 15.8 % (SD = 7.2) obtained with the strain 66. The average of pycnidium density estimated on a scale from 1 to 5 is 3.88 (SD=0.93). The strains which expressed the highest pycnidium density were 142, 194 (*cyp51* surexpression), 170 and 178, with a density of 5 on all replicates. The strain with the lower pycnidium density was 171, with an average of 1.74 (SD=0.86). For the 50 strains, the average of the observed pycnidiospore size was 36.9  $\mu\text{m}$  (SD = 3.2), with maximum of 44.24  $\mu\text{m}$  (SD=9) for the strain 10 and a minimum of 26.43  $\mu\text{m}$  (SD=8.6) for strain 1.

Disease severity analyses using ANOVA on the cultivar Rubisko (**figure 2**) showed that all strains were able to develop the disease on this cultivar at 21 dpi (mean: 34.4%; SD= 10.71). However, some strains were not able to sporulate, such as 183 and 225, which only express CYP51 alterations. Spore sizes of strains 5, 142, 183 and 225 could not be determined because spores were present in very small numbers to be measured correctly. The strain causing the highest levels of disease severity was the strain 30 with 53.08 % (SD=17.84), while the strain 225 was the one causing the lowest level of disease severity, with 6.03 % (SD=5.73). The average for pycnidium density within the infected leaves was 2.31 (SD=1.3), with the strain 46 expressing the highest pycnidium density (mean = 4.8; SD = 0.47) and two strains (225 and 183) which were unable to form pycnidia. Regarding the pycnidiospore size, the average among the 50 isolates was 33.54  $\mu\text{m}$  (SD = 10.98), with a maximum of 44.4  $\mu\text{m}$  (SD = 10.3) for the strain 115 and a minimum of 25.46  $\mu\text{m}$  (SD = 7.49) for the strain 103. The average of pycnidiospore size for the strains 5, 142, 183, 225 could not be determined due to the very low number of spores and the presence of microspores.



**Table 1.** Origins and phenotypes of resistance to the 14- $\alpha$ -demethylase inhibitor of *Z. tritici* strains from the field. The minimum inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) were expressed in  $mg.L^{-1}$  for five DMIs (tebuconazole (TBZ), metconazole (MTZ), epoxiconazole (EPZ), prothioconazole (PTZ) and prochloraz (PZ)).

Strains	Localisation	Mating-type	$IC_{50}$ (TBZ)	$IC_{50}$ (MTZ)	$IC_{50}$ (EPZ)	$IC_{50}$ (PTZ)	$IC_{50}$ (PZ)	Additional mechanisms
IPO323 <sup>a</sup>	Netherlands	1	0,07	0,04	0,03	0,001	0,02	-
1	Lorgies	1	5,43	0,25	1,05	0,00	0,19	<i>cyp51</i> surexpression
5	Lorgies	1	9,42	0,61	1,45	0,12	0,12	<i>cyp51</i> surexpression
7	Lorgies	1	12,75	0,77	0,57	0,01	0,01	-
8	Lorgies	1	39,03	3,35	10,63	0,18	1,07	<i>cyp51</i> surexpression
9	Lorgies	2	0,44	0,29	1,42	0,10	0,22	-
10	Lorgies	2	42,76	1,98	6,67	0,13	0,59	<i>cyp51</i> surexpression
14	Lorgies	2	0,13	0,09	0,54	0,07	0,09	-
17	Lorgies	2	12,37	1,13	2,75	0,16	0,47	-
30	Lorgies	1	0,72	0,61	3,65	0,08	0,10	-
33	Lorgies	1	0,17	0,13	0,62	0,08	0,09	-
35	Lorgies	1	15,54	0,56	1,69	0,05	0,39	<i>cyp51</i> surexpression
36	Lorgies	2	6,37	0,85	1,42	0,02	0,00	-
44	Lorgies	2	5,16	0,49	2,95	0,07	0,14	-
46	Lorgies	1	0,91	1,07	7,70	0,29	0,75	-
51	Lorgies	2	5,36	0,69	1,71	0,00	0,54	-
53	Lorgies	2	75,00	0,97	1,49	0,08	0,35	<i>cyp51</i> surexpression
66	Lorgies	2	0,81	0,93	3,31	0,15	4,57	-
103	Lorgies	2	12,02	0,72	1,62	0,05	0,20	<i>cyp51</i> surexpression
108	Lorgies	2	19,04	1,61	3,87	0,27	0,31	-
109	Lorgies	1	41,69	1,58	1,53	0,11	0,50	<i>cyp51</i> surexpression
113	Lorgies	1	0,21	0,46	1,29	0,04	0,31	-
115	Lorgies	2	3,24	0,26	0,34	0,01	0,13	-
118	Lorgies	2	24,40	1,81	1,03	0,03	0,02	-
119	Lorgies	2	18,85	1,10	1,48	0,08	0,25	<i>cyp51</i> surexpression
120	Lorgies	2	0,33	0,10	0,34	0,00	0,08	-
123	Tilloy-lès-Mofflaines	1	1,72	0,53	2,24	0,15	0,62	-
126	Tilloy-lès-Mofflaines	2	0,51	0,10	0,51	0,15	0,17	-
131	Tilloy-lès-Mofflaines	1	7,73	0,61	1,89	0,03	0,34	<i>cyp51</i> surexpression
140	Tilloy-lès-Mofflaines	1	0,64	0,28	1,82	0,07	0,22	-
142	Tilloy-lès-Mofflaines	1	0,65	0,21	0,12	0,11	0,34	-
149	Tilloy-lès-Mofflaines	2	1,03	0,62	3,53	0,17	0,78	-

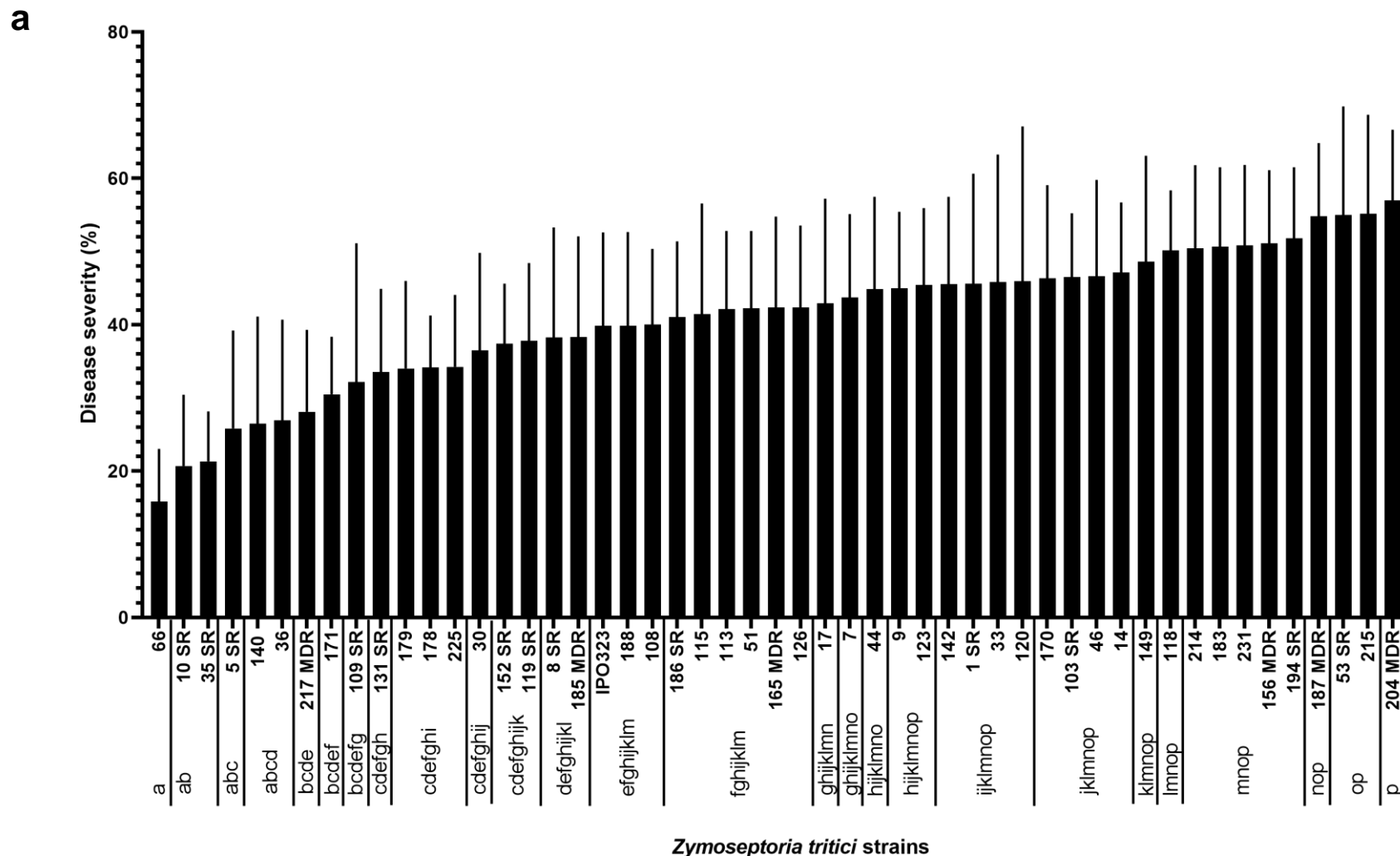


**Table 1.** Origins and phenotypes of resistance to the 14- $\alpha$ -demethylase inhibitor of *Z. tritici* strains from the field. The minimum inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) were expressed in  $mg.L^{-1}$  for five DMIs (tebuconazole (TBZ), metconazole (MTZ), epoxiconazole (EPZ), prothioconazole (PTZ) and prochloraz (PZ)).

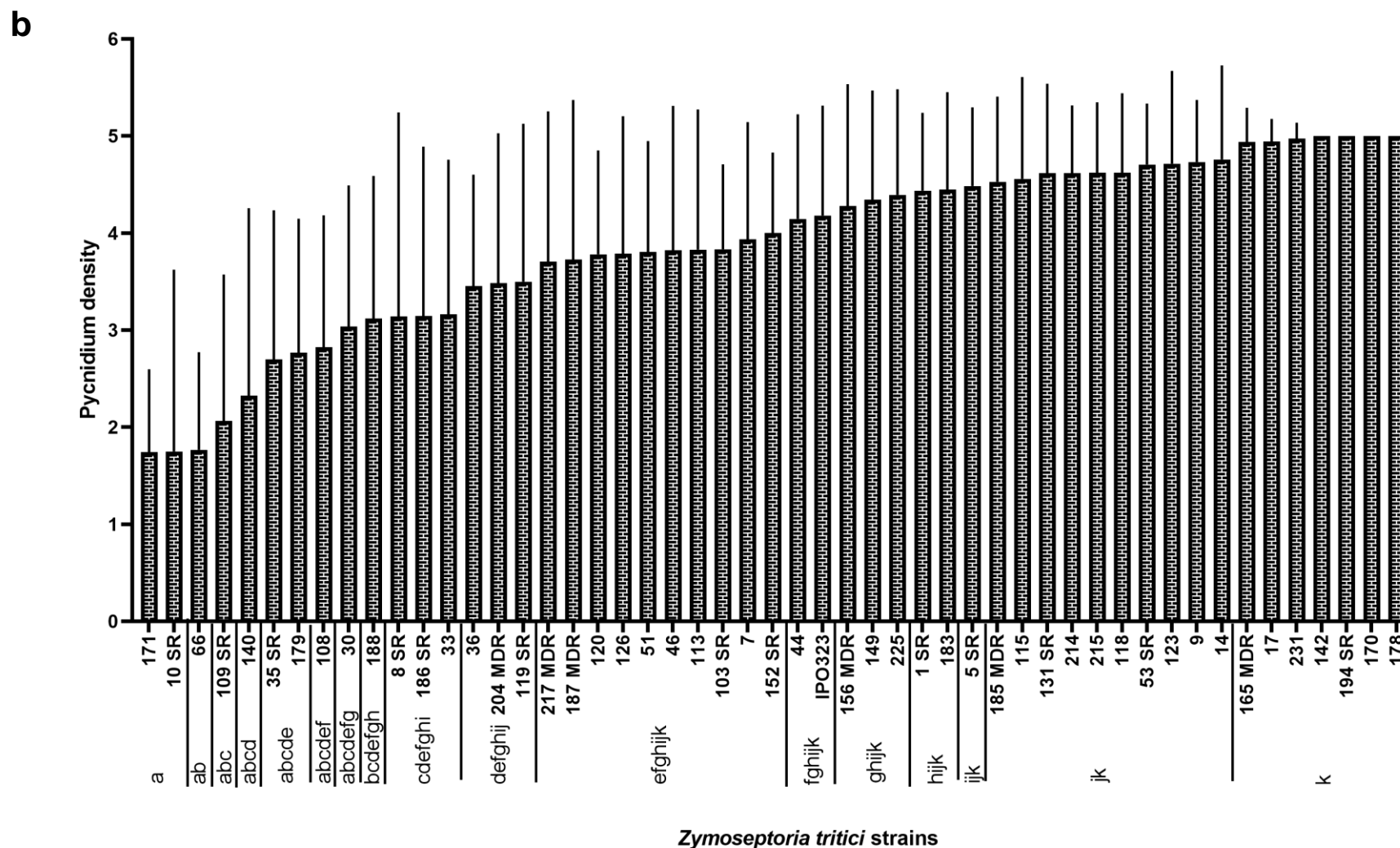
Strains	Localisation	Mating-type	$IC_{50}$ (TBZ)	$IC_{50}$ (MTZ)	$IC_{50}$ (EPZ)	$IC_{50}$ (PTZ)	$IC_{50}$ (PZ)	Additional mechanisms
152	Tilloy-lès-Mofflaines	1	18,86	1,29	3,01	0,09	0,56	<i>cyp51</i> surexpression
156	Tilloy-lès-Mofflaines	1	4,86	1,27	7,47	75,00	3,13	MDR
165	Tilloy-lès-Mofflaines	1	5,26	0,04	6,72	0,28	1,94	MDR
170	Tilloy-lès-Mofflaines	1	6,78	5,40	23,93	0,25	0,10	-
171	Tilloy-lès-Mofflaines	2	3,52	0,88	4,36	0,12	0,50	-
178	Tilloy-lès-Mofflaines	1	5,75	0,43	10,76	0,42	0,32	-
179	Tilloy-lès-Mofflaines	2	0,48	0,24	1,59	0,28	0,19	-
183	Tilloy-lès-Mofflaines	1	0,52	0,23	1,61	0,08	0,35	-
185	Tilloy-lès-Mofflaines	1	3,53	1,05	8,03	0,30	1,28	MDR
186	Tilloy-lès-Mofflaines	1	2,33	0,27	0,86	0,04	0,20	<i>cyp51</i> surexpression
187	Tilloy-lès-Mofflaines	1	75,00	6,02	15,05	0,57	1,48	MDR
188	Tilloy-lès-Mofflaines	2	0,48	0,39	1,06	0,09	0,38	-
194	Tilloy-lès-Mofflaines	1	18,71	1,87	2,98	0,08	0,48	<i>cyp51</i> surexpression
204	Tilloy-lès-Mofflaines	2	15,51	3,17	10,56	0,04	6,38	MDR
214	Tilloy-lès-Mofflaines	1	2,07	0,63	3,79	0,11	1,08	-
215	Tilloy-lès-Mofflaines	1	1,76	1,12	64,31	0,83	0,26	-
217	Tilloy-lès-Mofflaines	1	4,82	1,54	7,61	0,33	2,86	MDR
225	Tilloy-lès-Mofflaines	1	9,01	0,21	3,42	0,11	0,32	-
231	Tilloy-lès-Mofflaines	1	0,55	0,40	0,91	0,06	0,32	-

<sup>a</sup> this strain was isolated by Kema and Silfhout (1997) and it's sensible DMI reference in this study.





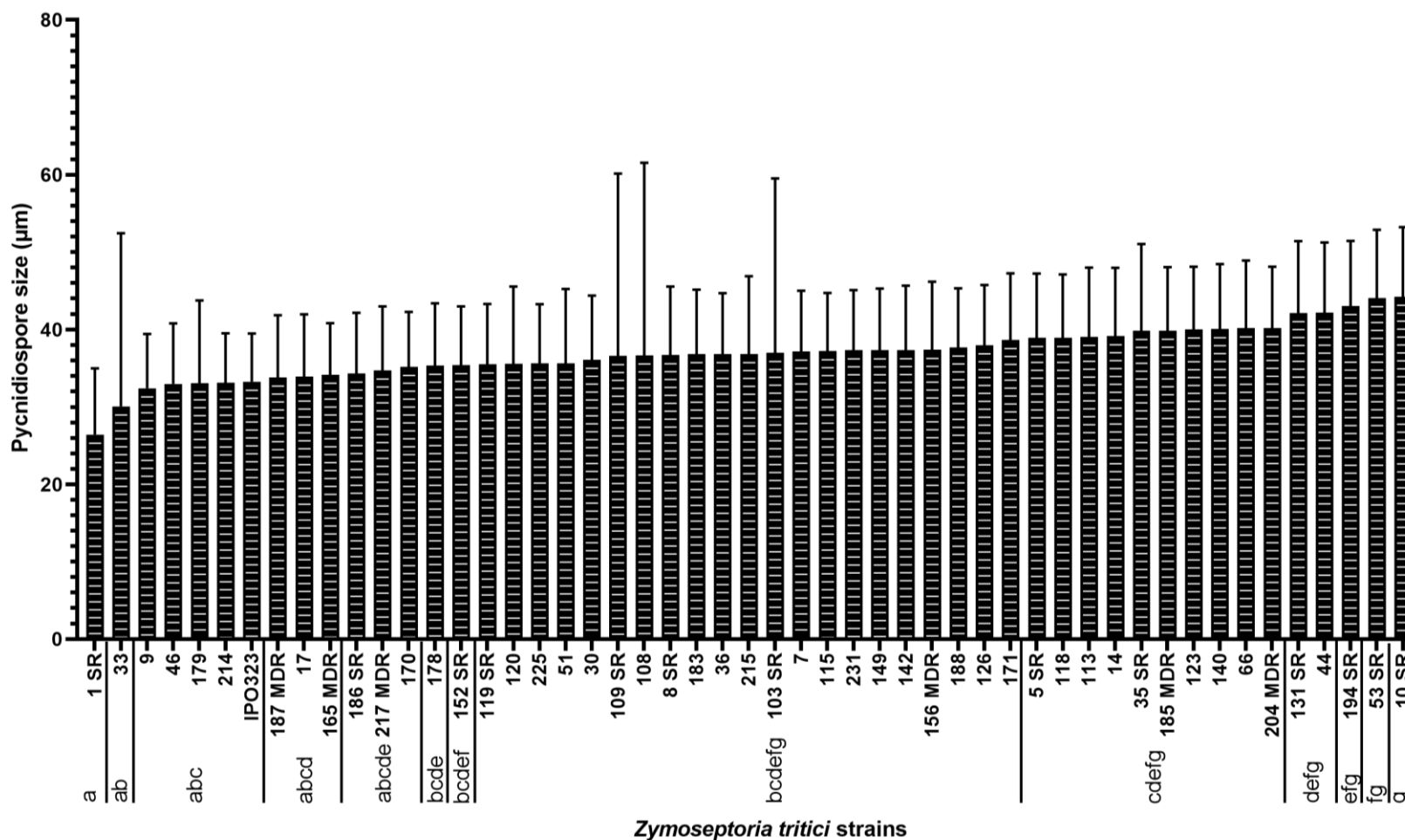
**Figure 1a.** ANOVA of the 51 strains tested according to the percentage of disease severity (a), pycnidium density (b) and pycnidiospore size (c) at 21 days post inoculation for the cultivar Alixan. *cyp51* overexpression strains was indicated with SR and MDR phenotype was indicated with MDR. The statistical groups are significantly different at the threshold of  $P < 0.05$ . (Tukey HSD).



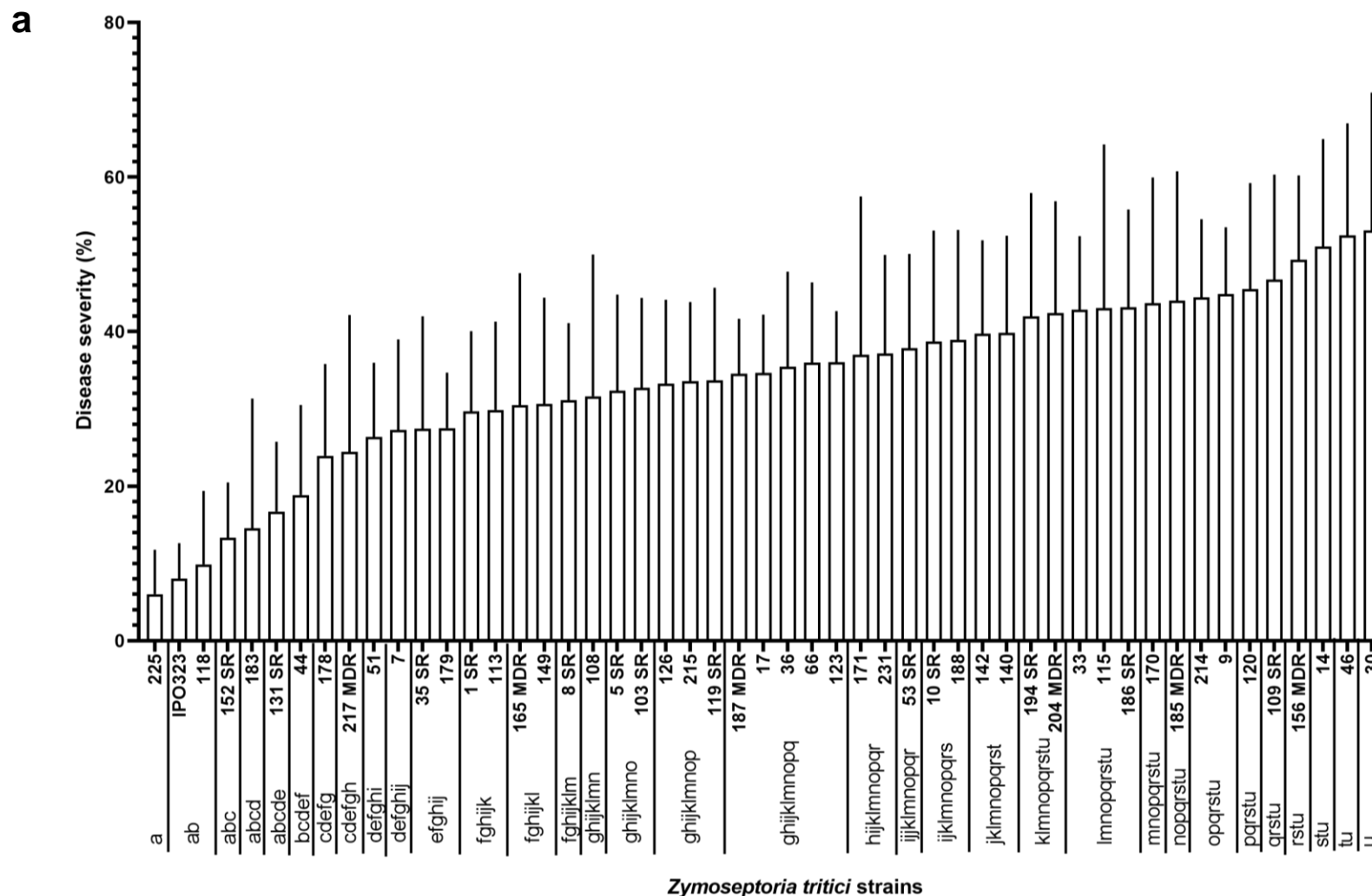
**Figure 1b.** ANOVA of the 51 strains tested according to the percentage of disease severity (a), pycnidium density (b) and pycnidiospore size (c) at 21 days post inoculation for the cultivar Alixan. *Cyp51* overexpression strains was indicated with SR and MDR phenotype was indicated with MDR. The statistical groups are significantly different at the threshold of  $P < 0.05$ . (Tukey HSD).



C



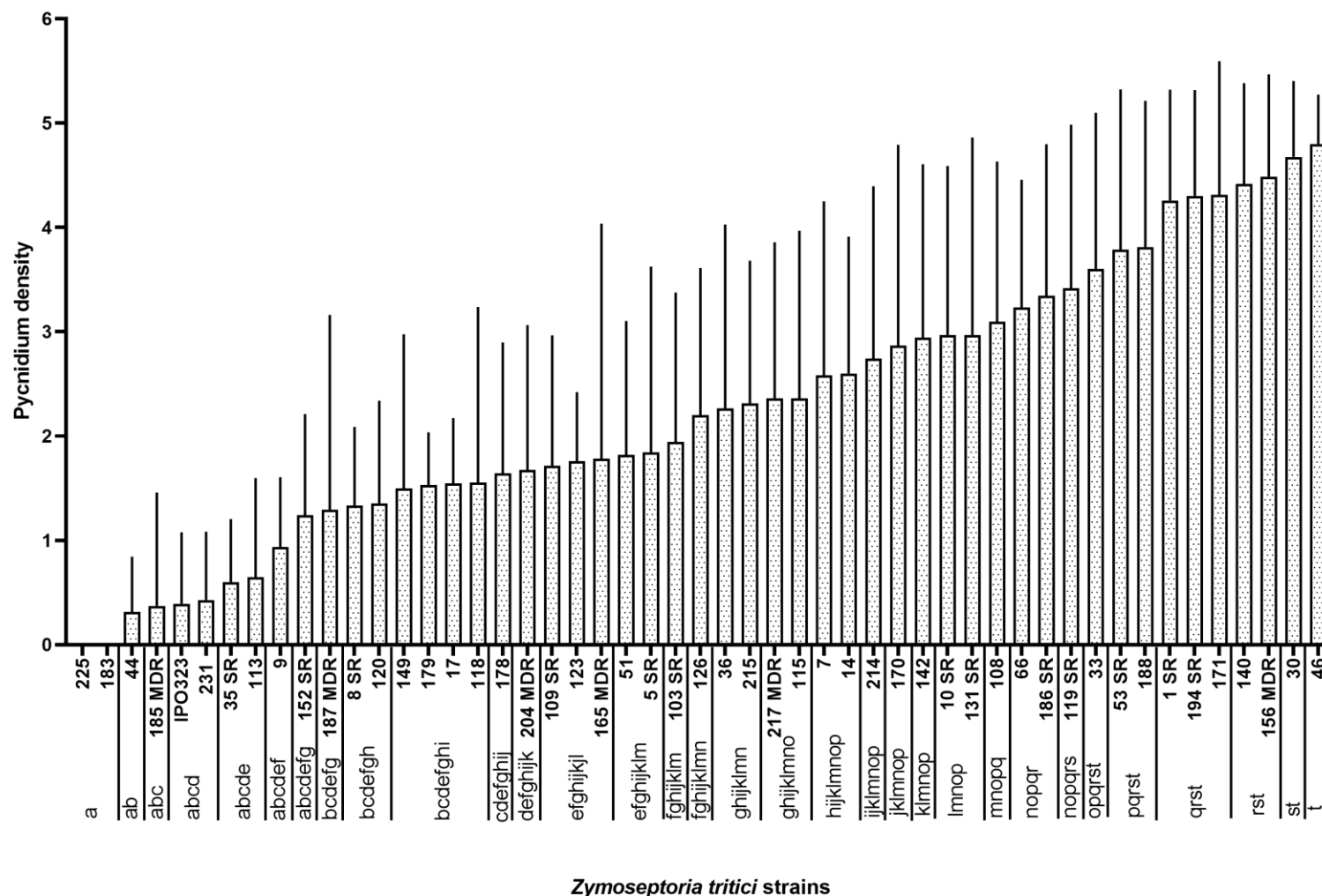
**Figure 1c.** ANOVA of the 51 strains tested according to the percentage of disease severity (a), pycnidium density (b) and pycnidiospore size (c) at 21 days post inoculation for the cultivar Alixan. The statistical groups are significantly different at the threshold of  $P < 0.05$ . (Tukey HSD).



**Figure 2a.** ANOVA of the 51 strains tested according to the percentage of disease severity (a), pycnidium density (b) and pycnidiospore size (c) at 21 days post inoculation for the cultivar Rubisko. *Cyp51* overexpression strains was indicated with SR and MDR phenotype was indicated with MDR. The statistical groups are significantly different at the threshold of  $P < 0.05$ . (Tukey HSD).



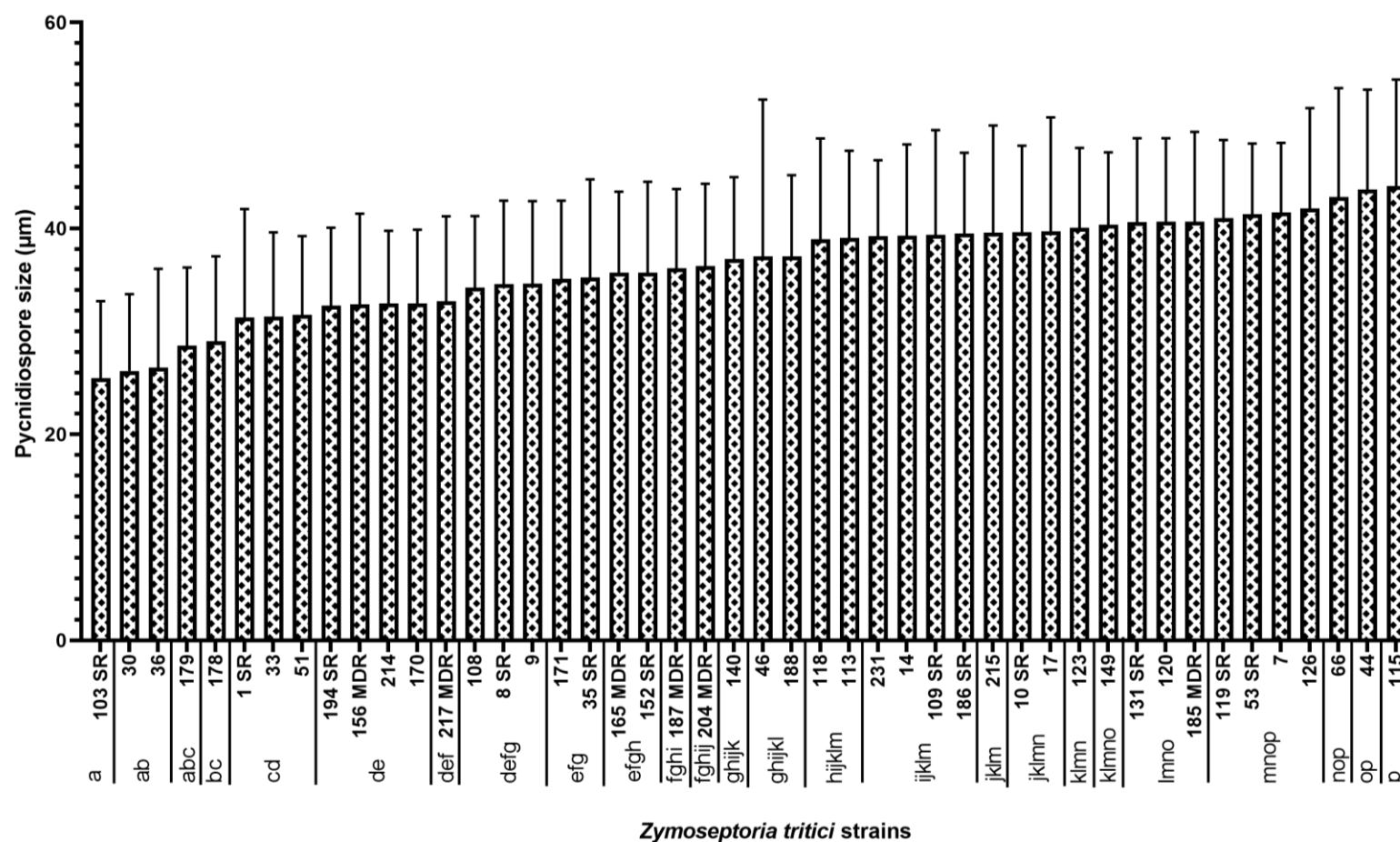
b



**Figure 2b.** ANOVA of the 51 strains tested according to the percentage of disease severity (a), pycnidium density (b) and pycnidiospore size (c) at 21 days post inoculation for the cultivar Rubisko. *Cyp51* overexpression strains was indicated with SR and MDR phenotype was indicated with MDR. The statistical groups are significantly different at the threshold of  $P < 0.05$ . (Tukey HSD).



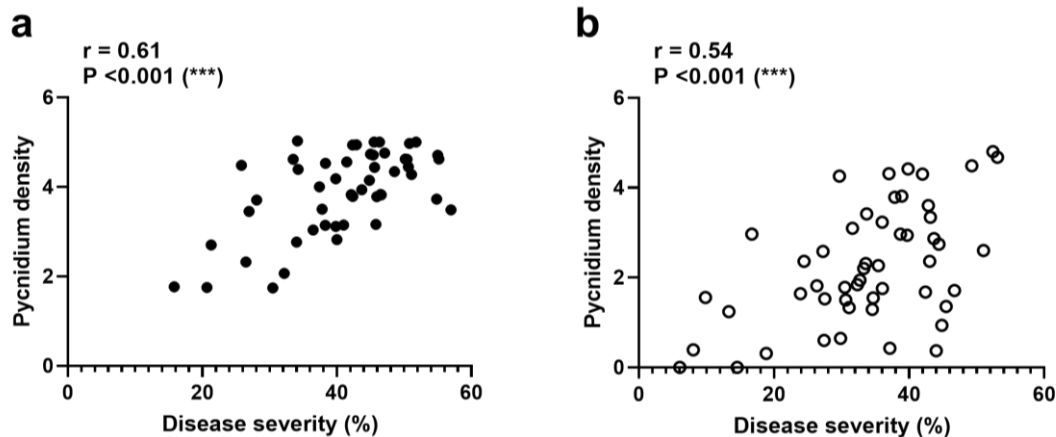
C



**Figure 2c.** ANOVA of the 51 strains tested according to the percentage of disease severity (a), pycnidium density (b) and pycnidiospore size (c) at 21 days post inoculation for the cultivar Rubisko. *Cyp51* overexpression strains was indicated with SR and MDR phenotype was indicated with MDR. The statistical groups are significantly different at the threshold of  $P < 0.05$ . (Tukey HSD).



Pearson correlation test used to examine the correlation between disease severity and pycnidium density at 21 dpi revealed significant correlation among these two parameters within the two tested cultivars, with correlation coefficients of  $r=0.61$  ( $p<0.001$ ) and  $r=0.54$  ( $p<0.001$ ) for the cultivars Alixan and Rubisko, respectively (**figure 3**). However, disease severity and pycnidiospore size, as well as pycnidium density and pycnidiospore size, are not correlated in both cultivars (**table 2**).



**Figure 3.** Correlation between the percentage of disease severity and the pycnidium density obtained at 21 days post inoculation for the cultivar Alixan (a) and Rubisko (b) with Pearson correlation ( $\alpha=0.05$ ).

**Table 2.** Pearson correlation matrix between disease severity, pycnidium density and pycnidiospores size ( $\mu\text{m}$ ) at 21 dpi for Alixan cultivar (a) and Rubisko cultivar (b). The values in bold are different from 0 at an  $\alpha=0.05$  significance level.

a Pearson correlation matrix for Alixan cultivar			
Variables	Disease severity (%)	Pycnidium density	Pycnidiospore size ( $\mu\text{m}$ )
Disease severity (%)	1	<b>0,61</b>	-0,07
Pycnidia density		1	-0,01
Spore size ( $\mu\text{m}$ )			1

b Pearson correlation matrix for Rubisko cultivar			
Variables	Disease severity (%)	Pycnidium density	Pycnidiospore size ( $\mu\text{m}$ )
Disease severity (%)	1	0,54	-0,06 <sup>a</sup>
Pycnidia density		1	-0,20 <sup>a</sup>
Spore size ( $\mu\text{m}$ )			1

<sup>a</sup> This analysis was were performed without the strains 5, 142, 183, 225

**No relationship between DMIs resistance and aggressiveness traits**



Among the 50 tested strains, six among them are MDR (156, 165, 185, 187 and 217) and 13 overexpresses the *cyp51* gene (1, 5, 8, 10, 35, 53, 103, 109, 119, 131, 152, 186 and 194). ANOVA analyses revealed no significant differences among the three tested groups of strains (MDR strains with CYP51 alterations, strains with *cyp51* gene overexpression and CYP51 alterations, and strains with CYP51 alterations only), either for disease severity level, pycnidium density and pycnidiospore size (**table 3**). Likewise, no correlation was found between the IC<sub>50</sub> values of the five tested DMIs and the disease severity rate on Alixan at  $P = 0.05$  (**figure 4**). However, two correlations were found between the disease severity rate in Rubisko cultivar and the IC<sub>50</sub> values of epoxiconazole ( $r=0.38$ ;  $p=0.006$ ) and tebuconazole ( $r=0.31$ ;  $p = 0.029$ ).

**Table 3.** ANOVA on *Z. tritici* DMIs fungicides group, the CYP51 alteration alone groupe (n=31), the *cyp51* surexpression group (n=13) and the MDR group (n=6) at 21 day post inoculation, on two wheat cultivar (Alixan and Rubisko). The statistical groups are significantly different at the threshold of  $P<0.05$ . (Tukey HSD).

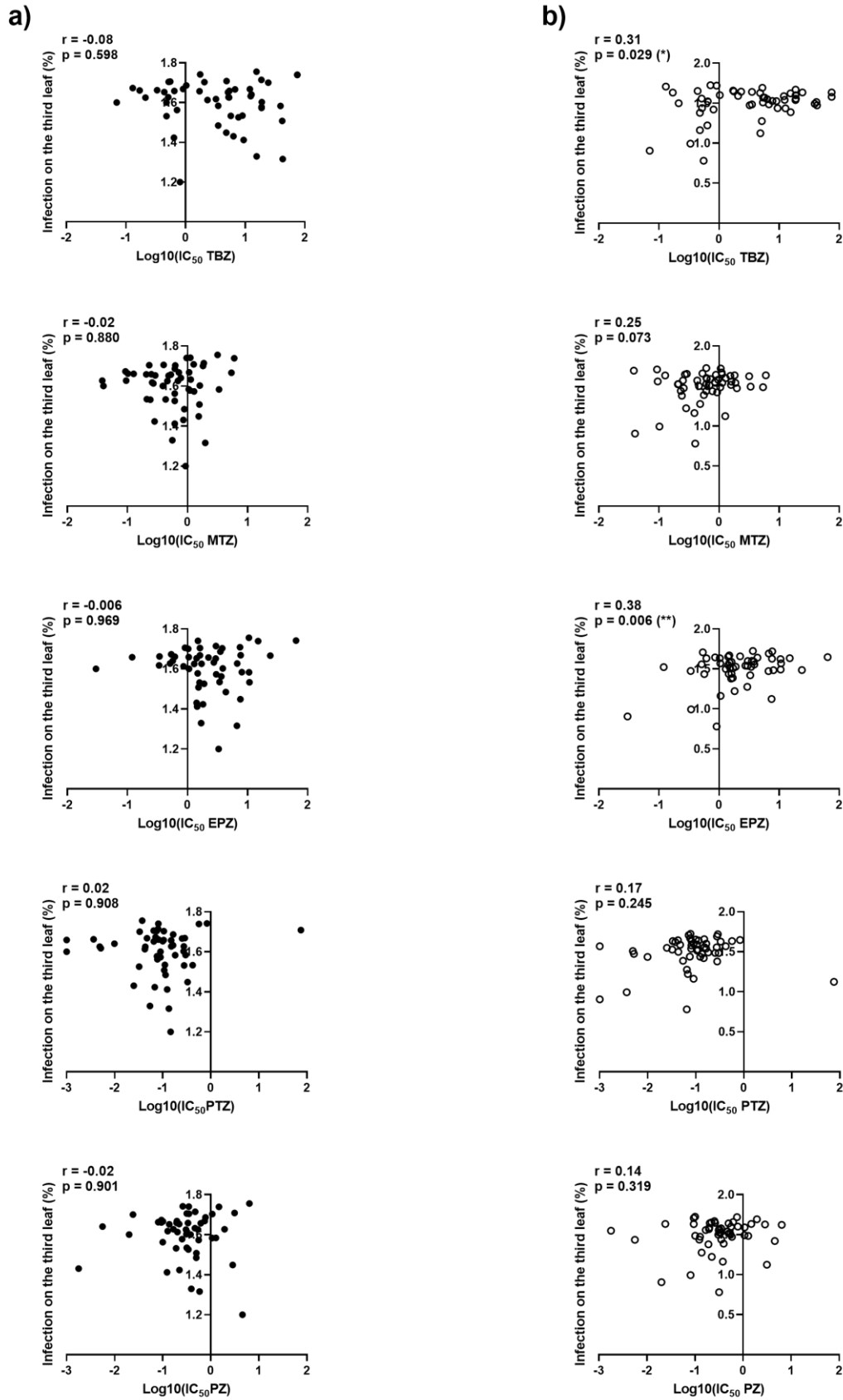
Cultivar	<i>Z.tritici</i> DMI fungicide mechanisms	Disease severity (%)	SD	Group	Pycnidium density	SD	Group	Pycnidiospore size	SD	Group
Alixan	CYP51 alteration	41,67	8,48	A	3,94	0,95	A	36,66	2,63	A
	CYP51 surexpression <sup>a</sup>	37,46	10,78	A	3,65	1,04	A	37,45	4,53	A
	MDR <sup>a</sup>	45,28	11,09	A	4,11	0,56	A	36,68	2,87	A
Rubisko	CYP51 alteration	34,48	11,51	A	2,25	1,34	A	33,10	12,05	A
	CYP51 surexpression <sup>a</sup>	32,73	9,68	A	2,59	1,22	A	33,57	11,10	A
	MDR <sup>a</sup>	37,53	9,31	A	1,99	1,39	A	35,74	2,91	A

<sup>a</sup> this strains contains CYP51 alterations

### No correlation between mating types and aggressiveness traits

The ratio of mating-types is slightly imbalanced with 29 MAT1-1 strains and 21 MAT1-2 strains. Statistical analyses using the *t-test* at  $P = 0.05$  showed no significant difference between the two groups (**supplementary data**). Likewise, no significant association between the mating types and disease severity, pycnidium density and pycnidiospore size on both Alixan and Rubisko cultivars (**table 4**).





**Figure 4.** Correlation between the infection and the five DMIs (tebuconazole (TBZ), metconazole (MTZ), epoxiconazole (EPZ), prothioconazole (PTZ) and prochloraz (PZ) for the cultivar Alixan (a) and Rubisko (b) with Pearson correlation (alpha=0.05).



**Table 4.** Paired *t*-test comparing the effect of the two idiomorph of mating-type (MAT1-1 and MAT1-2) on disease severity, pycnidia density and size spore on alixan and Rubisko cultivar.

Cultivar	Fitness component	Mating type	Mean	SD	<i>t</i> value	P value
Alixan	Disease severity	MAT1-1	41,23	9,09	0,19	0,85
		MAT1-2	40,70	10,34		
	Pycnidia density	MAT1-1	4,06	0,85	1,59	0,12
		MAT1-2	3,64	1,01		
	Spore size	MAT1-1	36,42	3,43	-1,16	0,25
		MAT1-2	37,48	2,80		
Rubisko	Disease severity	MAT1-1	34,13	11,86	-0,21	0,84
		MAT1-2	34,76	9,19		
	Pycnidia density	MAT1-1	2,32	1,48	0,07	0,95
		MAT1-2	2,30	1,04		
	Spore size	MAT1-1	30,79	13,08	-2,41	0,02
		MAT1-2	37,32	5,48		

#### Strain co-inoculation increases disease severity

For strain combinations, the isolates were selected according to the fungicide resistance for tested MDR competition level and mating-type for the final detection. Six combinations of *Z. tritici* strains were tested in greenhouse conditions in order to evaluate the competition effect of MDR strains (**table 5**).

**Table 5.** Strains combination for fitness *in planta* experience. All combinations contains MDR phenotype strains and other DMIs resistant strains (CYP51 alterations and over-expression) and opposite mating-type (MAT1-1 or MAT1-2).

Combination	Strains combination	Fungicide mechanisms	Mating-type
1	156	MDR and DMI alterations	MAT1-1
	14	DMI alterations	MAT1-2
2	204	MDR and DMI alterations	MAT1-2
	33	DMI alterations	MAT1-1
3	156	MDR and DMI alterations	MAT1-1
	115	DMI alterations	MAT1-2
4	165	MDR and DMI alterations	MAT1-1
	149	DMI alterations	MAT1-2
5	187	MDR and DMI alterations	MAT1-1
	51	DMI alterations	MAT1-2
6	187	MDR and DMI alterations	MAT1-1
	53	DMI alterations and overexpression	MAT1-2



Three aggressiveness components, including disease severity, pycnidia density and pycnidiospore size, were scored at 21 dpi on the two cultivars Alixan and Rubisko. For Alixan, all strain combinations showed an increase in disease severity level when compared to plants inoculated with the corresponding strains alone, with an increase of +9 % in average. For three combinations, the average of disease severity was 60% (64.19 % for 156MDR x 14; 60.3 % for 187MDR x 51 and 61.52 % for 187MDR x 53). For the other three combinations, disease severity was 56.3 % for 165MDR x 149, 51.83 % for 156MDR x 115 and 43.23 % for 204MDR x 33. An increase in pycnidium density was also observed in the strain combinations on Alixan, with a total of 5 for 156MDR x 14, 204MDR x 33, 156MDR x 115 and 165MDR x 149. Regarding the pycnidiospore size, no significant difference was observed between the strains alone or in combinations (**table 6**).

For Rubisko, all combinations exhibited also an increase in disease severity when compared to strains alone, with an increase average of +8%. The percentage of disease severity of the combinations were 50.83 % (187MDR x 51), 49.67 % (204MDR x 33), 45.33 % (187MDR x 53), 45% (165MDR x 149), 43.67 % (156MDR x 14) and 23.83 % (156MDR x 115). Surprisingly, the combinations expressed a lower pycnidia density when compared to strains tested alone (on average, a reduction of 1.05 on a scale of 5). No difference was found between the strains alone (36.49 µm) or in combination (36.41 µm) regarding the pycnidiospore size.

### **Low competitiveness potential of MDR strains**

From the combinations, 50 fungal isolates were collected in order to estimate the preponderance and the sporulation capacity of each strain within the infected leaves. The identification of the isolates was based on the identification the mating types (**figure 5**). On the cultivar Alixan, among the MDR strains, only the strain MDR204 seems to predominate, with 72 % frequency. The less predominating MDR strain on Alixan was the strain 156 with only 6 % frequency in the 156MDR x 14 combination and 14 % in the 156MDR x 115 combination. For the other cultivar, Rubisko, the same pattern can be observed. The most predominating strain was MDR204, with 68 % frequency. The MDR156 strain was also the less predominating strain on Rubisko, observed in both 156MDR x 115 and 156MDR x 14 combinations. MDR strains are also the less sporulating in the other combinations, with 16% for 165, and 12% and 30% in the 187MDR x 51 and 187MDR x 53, respectively.



**Table 6a.** Descriptive statistical of 6 combination strains on infection, pycnidia density and spore size tested on two wheat cultivar : Alixan (a) and Rubisko (b). ANOVA group was generated for each combinaison.

a

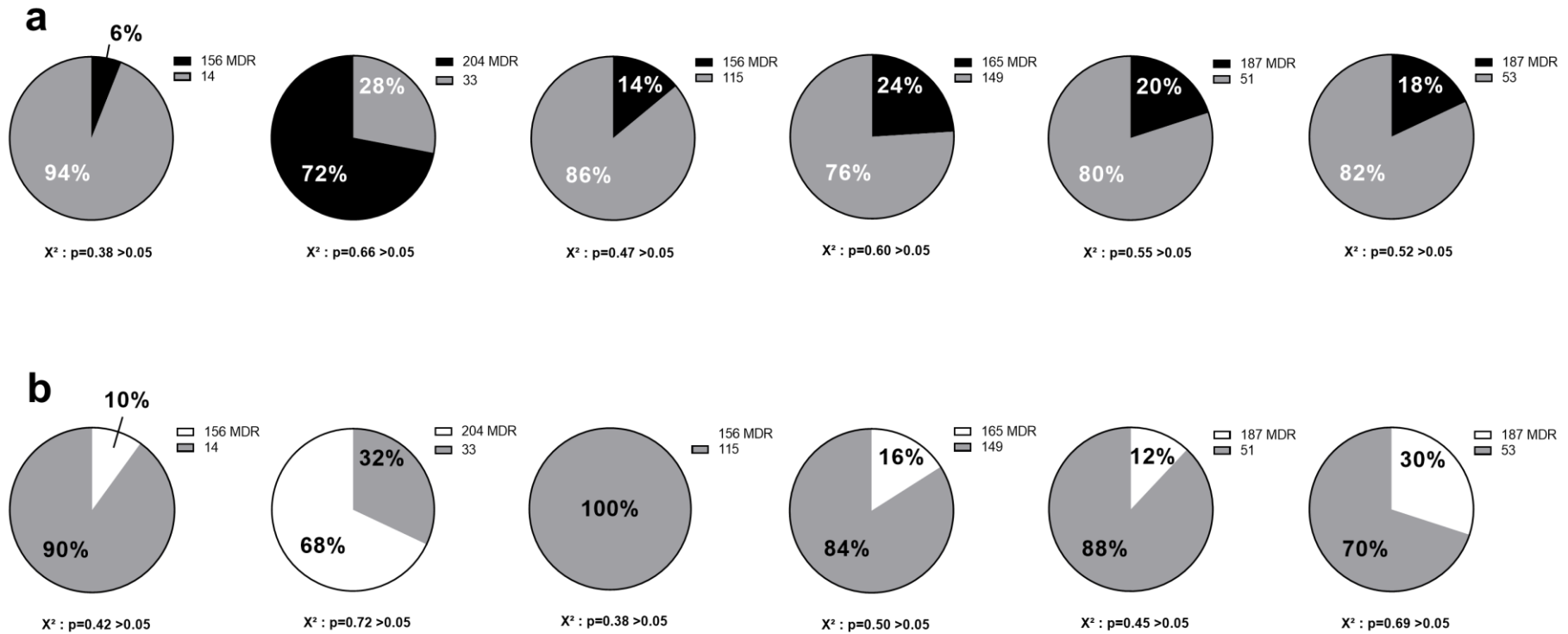
Strains	Disease severity	SD	Group	Pycnidia density	SD	Group	Pycnidiospore size	SD	Group
156 MDR	49,14	9,35	A	4,17	1,07	A	37,38	8,81	A
14	43,68	7,31	B	4,53	0,86	A	39,15	8,82	A
156MDR x 14	64,19	9,58	C	5,00	0,00	B	38,11	7,70	A
204 MDR	38,60	11,81	A	2,25	1,02	A	40,19	7,93	A
33	35,00	9,83	B	3,63	1,33	B	30,08	10,73	B
204MDR x 33	43,23	7,91	C	5,00	0,00	C	35,70	9,63	C
156 MDR	49,14	9,35	A	4,17	1,07	A	37,38	8,81	A
115	31,86	11,76	B	2,68	1,66	B	37,20	7,52	A
156 MDR x 115	51,83	7,82	A	5,00	0,00	C	44,55	8,71	B
165 MDR	42,79	12,20	A	4,94	0,34	A	34,17	6,65	A
149	23,07	11,08	B	1,84	1,24	B	37,33	7,97	B
165 MDR x 149	56,30	13,23	C	5,00	0,00	C	31,17	7,29	C
187 MDR	49,22	6,73	A	3,72	1,30	A	33,81	8,05	A
51	38,06	14,99	B	2,56	1,08	B	35,65	9,58	B
187 MDR x 51	60,30	10,15	C	4,64	0,74	C	38,03	7,81	C
187 MDR	49,22	6,73	A	3,72	1,30	A	33,81	8,05	A
53	50,30	19,44	A	4,82	0,46	B	44,07	8,83	B
187 MDR x 53	61,52	9,72	B	4,61	0,50	B	37,71	8,75	C



**Table 6b.** Descriptive statistical of 6 combination strains on disease severity, pycnidia density and spore size tested on two wheat cultivar : Alixan (a) and Rubisko (b). ANOVA group was generated for each combinaison.

**b**

Strains	Disease severity	SD	Group	Pycnidia density	SD	Group	Pycnidiospore size	SD	Group
156 MDR	35,29	9,85	A	1,91	1,20	A	32,62	8,83	A
14	41,36	7,53	B	2,39	0,86	A	39,31	8,86	B
156MDR x 14	43,67	8,19	B	1,27	0,74	B	36,21	8,85	C
204 MDR	36,36	8,86	A	2,30	0,88	A	36,36	7,99	A
33	40,74	8,54	A	3,38	1,37	B	31,45	8,17	B
204MDR x 33	49,67	10,33	B	1,13	0,57	C	31,65	8,36	B
156 MDR	35,29	9,85	A	1,91	1,20	A	32,62	8,83	A
115	39,26	14,15	A	2,41	1,10	A	44,14	10,32	B
156 MDR x 115	23,83	14,06	B	2,00	1,14	A	40,16	5,38	C
165 MDR	31,21	8,84	A	2,03	2,03	A	35,70	7,88	A
149	37,33	14,25	A	2,45	1,00	A	40,38	7,03	B
165 MDR x 149	45	12,53	B	2,67	0,92	A	35,56	8,75	A
187 MDR	28,83	9,71	A	1,87	0,82	A	36,15	7,67	A
51	27,5	8,42	A	1,84	1,05	A	31,62	7,65	B
187 MDR x 51	50,83	12,46	B	0,6	0,67	B	39,43	8,81	C
187 MDR	28,83	9,71	A	1,87	0,82	A	36,15	7,67	A
53	37,88	10,53	B	3,82	1,10	B	41,37	6,87	B
187 MDR x 53	45,33	11,67	C	0,67	0,80	C	35,46	9,74	A



**Figure 5.** Distribution of sporulating *Z. tritici* strains during co-inoculation at 21 dpi. The occurrence frequencies of each strain are represented for cultivar Alixan (a) and cultivar Rubisko (b). For each combination, a chi<sup>2</sup> test was performed to estimate a significant difference in the distributions of each idiomorph mating-type when the *p*-values are less than  $p > 0.05$ .



## Discussion

Despite STB control methods deployed in the field, based mainly on the use of fungicides, resistance is emerging and spreading rapidly due to frequent asexual and sexual reproductions, creating a significant gene flow in the pathogen populations (Siah *et al.*, 2018). Currently, strains with high levels of resistance to DMIs, one of the main families of fungicides used against STB, are gradually increasing and leading to the development of new problematic phenotypes, including MDR strains. Even with the use of resistant cultivars and regular fungicide treatments, yield losses of 5%–10% can be expected (Fones and Gurr, 2015). The 51 tested strains showed significant levels of aggressiveness on both cultivars (Alixan, susceptible, and Rubisko, moderately resistant). All these strains were isolated from the cultivars Bergamo and Terroir, both are ranked as moderately resistant to STB (Arvalis-Institut du Végétal). It is interesting to note that Rubisko, we used in our study, is also ranked as moderately resistant to STB, as Bergamo and Terroir. It is therefore not surprising to observe that the strains are able to infect these cultivars. In addition, Rubisko is a cultivar that was widely cultivated in France in 2015 and 2016, with 11.9 % and 12.8 % of the national sole, respectively (France AgriMer), suggesting that the strains are likely adapted to the Rubisko cultivar, as well as to Alixan, an oldest more susceptible cultivar. Overall, the strains showed a great variability in their aggressiveness level, depending on the cultivars. Disease severity levels were higher in Alixan with 41% (SD=9.53) than in Rubisko 34.4% (SD=10.71). However, some strains were more aggressive on Rubisko than on Alixan, such as MDR185, which showed disease severity levels of 44% on Rubisko and 38.33% on Alixan. Pycnidium density is significantly lower in Rubisko (2.31; SD=1.3) compared to Alixan (3.88; SD=0.93). We found a positive correlation between disease severity and pycnidium density in both cultivars, while pycnidiospore size was not correlated with these two parameters. It is likely that the size of pycnidiospores would be under the influence of other factors. The variability of disease severity among the isolates could be due to several factors, such as the presence or absence of certain accessory chromosomes. Accessory chromosomes have been shown to play an important role in virulence in other fungal pathogens (Ma *et al.*, 2010). Stewart *et al.* (2018) discovered a significant correlation between higher virulence phenotype carrying certain accessory chromosomes. The increase in virulence is around 2-3% but the authors hypothesize that the increase in virulence allows an increase in reproduction, which confers an advantage in fitness. This is a potential reason for their conservation under field condition. Indeed, Fouché *et al.* (2018) explains that the presence of an accessory chromosome or a specific combination that gives an advantage over the fitness of a strain may explain the maintenance of these chromosomes over the generations. It would be interesting to look at the karyotype of



Article 3 : Fitness of *Zymoseptoria tritici* isolates with different resistance mechanisms towards demethylation inhibitors

the tested strains to determine the presence or absence of accessory chromosomes in the strains, in order to examine the association between aggressiveness traits and accessory chromosomes.

The 50 tested strains are all genetically different according to the eight microsatellites used in the study of Siah *et al.*, (2018). An absence of correlation was observed between MDR and *cyp51* overexpression tested alone for all assessed aggressiveness parameters (disease severity, pycnidium density and pycnidiospore size) in the two cultivars (data not shown), thus indicating no trade-off on the measured fitness components. Indeed, there is a large variability in pathogenicity between strains overexpressing the *cyp51* gene, for example, the maximum and the minimum average size of 44.24  $\mu\text{m}$  (SD=9) for strain 10, and 26.43 $\mu\text{m}$  (SD=8.6) for individual 1. Our results highlighted correlations between disease severity and  $\text{IC}_{50\text{s}}$  for both epoxiconazole ( $r=0.38$ ;  $p=0.006$ ) and tebuconazole ( $r=0.31$ ;  $p=0.029$ ) in Rubisko, but not in Alixan. It is interesting to note that Rubisko is a cultivar widely used in France and that epoxiconazole and tebuconazole are major component of French fungicide programs. Thus, the correlations we found could be the result of a field selection pressures by Rubisko and by both epoxiconazole and tebuconazole. Likewise, Yang *et al.* (2013) found a positive correlation between fungicide resistance and pathogen aggressiveness for cyproconazole in *Z. tritici*.

Analysis of the association between the mating-types and  $\text{IC}_{50\text{s}}$  for the five tested DMIs showed no significant correlation between these two parameters. Likewise, the mating-types do not seem to influence the pathogenicity of the strains because no significant correlation was detected between the aggressiveness traits and the two mating types. These results are not in agreement with those of Zhan *et al.* (2007) who reported a slightly higher levels of pathogenicity (analysis of the percentage of leaves covered by lesions and pycnidia) of MAT1-1 strains compared to MAT1-2 strains.

Epidemic development is strongly affected by the ability of a pathogen to reproduce and cause subsequent infections (Parlevliet, 1979); hence, the reproduction rate of a pathogen is an important determinant of the total damage it can cause during an epidemic. To understand why MDR strains increase each year in the France field, we hypothesized that MDR strains may have a better sporulation capacity when competes with no MDR strains. When analyzing sporulation capacity, no MDR strains seem to dominate both on Alixan and Rubisko. The MDR strain 204 seems to be the most sporulating with 72% and 68% on Alixan and Rubisko respectively. This strain is also the only one of MAT1-2 in the six combinations tested. MDR strain 156 was tested in two combinations (156x14 and 156x115) and has the least sporulation on both cultivars. It was not even detected in combination 156X115 in the cultivar Rubisko. Other fitness tests can be performed on MDR strains but the ability to sporulate is the key to the





*Article 3 : Fitness of Zymoseptoria tritici isolates with different resistance mechanisms towards demethylation inhibitors*

development of epidemics. We hypothesize that the increasing presence of MDR strains is due to fungicide pressure and not with high fitness degree. Compared to non-MDR strains, these strains do not seem to have fitness costs despite their accumulation of fungicide resistance. The evolution of fungicide resistance in *Z. tritici* poses a severe threat to profitability and sustainability of wheat production worldwide. If no fitness penalty of those strains, the majority of a population will become resistant over time and eventually the fungicide loses its effect (Hobbelen *et al.*, 2014). The key principles of resistance management methods without compromising disease control include the optimal timing application, the adjustment of the number of applications, the appropriate dose and the application of fungicide mixtures and/or alterations of active ingredients with different modes of action. The application of the same fungicide more than twice is normally not encouraged and current recommendations follow those of the Fungicide Resistance Action Committee (FRAC 2016). However, the success of these strategies also influences the sensitivity of the population. The selection of resistant individuals is done in three phases: the emergence phase, where resistance occurs spontaneously due to the presence of mutations or through an ascospore from another population ; the selection phase, the resistant strain is present in the population and increases in frequency over time due to selection pressure imposed by fungicide applications and, the adjustment phase, the resistant strains was the most representative of the population (Van der Bosch *et al.*, 2014). According this paper, management strategies can only be successful during the first phase because it's difficult to eradicate resistant strains and can be managed to some degree by agronomical practices. In the case of MDR, the use of multisite fungicides can be a good option for prolong the effective life of fungicides. MDR cause the overexpression of MgMFS1 efflux pumps lead to fungicide resistance from different families, in our case, SDHI (article 1). No multi-site resistant strains have been reported in the literature (Leroux *et al.*, 2007). However, high disease control increased selection for fungicide resistance (Dooley *et al.*, 2016; Heick *et al.* 2017). Dooley *et al.* (2016) showed that decreased doses and consequently reduced control maintain sensitivity, measured as EC<sub>50</sub>. This result is also confirmed in Heick *et al.* (2017). Biocontrol can also provide a new solution in the control of STB. Studies show promising results in laboratory conditions such as *Bacillus subtilis* lipopeptides that reduces disease by 82% (Mejri *et al.*, 2017). However, it is necessary to carry out more studies in field conditions in order to be able to introduce new sustainable solutions on the market that are more environmentally friendly.

## Acknowledgement

This study was supported by Bayer CropScience in the framework of a CIFRE-PhD project.



## References

- Adhikari, T.B., Cavaletto, J.R., Dubcovsky, J., Gieco, J.O., Schlatter, A.R., Goodwin, S.B., 2004. Molecular Mapping of the *Stb4* Gene for Resistance to *Septoria tritici* Blotch in Wheat. *Phytopathology* 94, 1198–1206. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1198>
- Chartrain, L., Sourdille, P., Bernard, M., Brown, J.K.M., 2009. Identification and location of *Stb9*, a gene for resistance to *septoria tritici* blotch in wheat cultivars Courtot and Tonic. *Plant Pathology* 58, 547–555.
- Cools, H.J., Bayon, C., Atkins, S., Lucas, J.A., Fraaije, B.A., 2012. Overexpression of the sterol 14 $\alpha$ -demethylase gene (*MgCYP51*) in *Mycosphaerella graminicola* isolates confers a novel azole fungicide sensitivity phenotype. *Pest. Manag. Sci.* 68, 1034–1040. <https://doi.org/10.1002/ps.3263>
- Cools, H.J., Fraaije, B.A., 2013. Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implications for future control. *Pest management science* 69, 150–155.
- Cowger, Mundt, 2002. Aggressiveness of *Mycosphaerella graminicola* isolates from susceptible and partially resistant wheat cultivars. *Phytopathology* 624–30.
- Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G.D., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13, 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Dooley, H., Shaw, M.W., Spink, J., Kildea, S., 2016. Effect of azole fungicide mixtures, alternations and dose on azole sensitivity in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Plant Pathology* 65, 124–136.
- Eyal, Z., 1999. The *Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum* blotch diseases of wheat. *European Journal of Plant Pathology* 105, 629–641. <https://doi.org/10.1023/A:1008716812259>
- Fones, H., Gurr, S., 2015. The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genet Biol* 79, 3–7. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.004>
- Fouché, S., Plissonneau, C., McDonald, B.A., Croll, D., 2018. Meiosis leads to pervasive copy-number variation and distorted inheritance of accessory chromosomes of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Genome Biol Evol* 10, 1416–1429. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy100>



Article 3 : *Fitness of Zymoseptoria tritici isolates with different resistance mechanisms towards demethylation inhibitors*  
Gandon, S., Michalakos, Y., 2000. Evolution of parasite virulence against qualitative or quantitative host resistance. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 267, 985–990. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1100>

Heick, T.M., Justesen, A.F., Jørgensen, L.N., 2017. Anti-resistance strategies for fungicides against wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* with focus on DMI fungicides. *Crop Protection* 99, 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.05.009>

Hobbelen, P.H.F., Paveley, N.D., Oliver, R.P., Van den Bosch, F., 2013. The usefulness of fungicide mixtures and alternation for delaying the selection for resistance in populations of *Mycosphaerella graminicola* on winter wheat: A modeling analysis. *Phytopathology* 103, 690–707.

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*. <https://doi.org/10.1111/ppa.12891>

Kirikyali N, Diez P, Luo J, Hawkins N, Fraaije BA, 2017. Azole and SDHI sensitivity status of *Zymoseptoria tritici* field populations sampled in France, Germany and the UK during 2015. *Modern Fungicides and Antifungal Compounds* 3, 153–158.

Kuparinen, A., Markkanen, T., Riikonen, H., Vesala, T., 2007. Modeling air-mediated dispersal of spores, pollen and seeds in forested areas. *Ecological Modelling* 208, 177–188.

Lannou, C., 2012. Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 50, 319–338. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-173031>

Larios, E., Búrquez, A., Becerra, J.X., Venable, D.L., 2014. Natural selection on seed size through the life cycle of a desert annual plant. (*Ecology*). 95, 3213–3220.

Leroux, P., Albertini, C., Gautier, A., Gredt, M., Walker, A.-S., 2007. Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 $\alpha$ -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest. Manag. Sci.* 63, 688–698. <https://doi.org/10.1002/ps.1390>

Lockhart, S.R., Wu, W., Radke, J.B., Zhao, R., Soll, D.R., 2005. Increased virulence and competitive advantage of  $\alpha/\alpha$  over  $\alpha/a$  or  $a/\alpha$  offspring conserves the mating system of *Candida albicans*. *Genetics* 169, 1883–1890



Article 3 : Fitness of *Zymoseptoria tritici* isolates with different resistance mechanisms towards demethylation inhibitors

Ma, L.-J., van der Does, H.C., Borkovich, K.A., Coleman, J.J., Daboussi, M.-J., Di Pietro, A., Dufresne, M., Freitag, M., Grabherr, M., Henrissat, B., Houterman, P.M., Kang, S., Shim, W.-B., Woloshuk, C., Xie, X., Xu, J.-R., Antoniw, J., Baker, S.E., Bluhm, B.H., Breakspear, A., Brown, D.W., Butchko, R.A.E., Chapman, S., Coulson, R., Coutinho, P.M., Danchin, E.G.J., Diener, A., Gale, L.R., Gardiner, D.M., Goff, S., Hammond-Kosack, K.E., Hilburn, K., Hua-Van, A., Jonkers, W., Kazan, K., Kodira, C.D., Koehrsen, M., Kumar, L., Lee, Y.-H., Li, L., Manners, J.M., Miranda-Saavedra, D., Mukherjee, M., Park, G., Park, J., Park, S.-Y., Proctor, R.H., Regev, A., Ruiz-Roldan, M.C., Sain, D., Sakthikumar, S., Sykes, S., Schwartz, D.C., Turgeon, B.G., Wapinski, I., Yoder, O., Young, S., Zeng, Q., Zhou, S., Galagan, J., Cuomo, C.A., Kistler, H.C., Rep, M., 2010. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* 464, 367–373. <https://doi.org/10.1038/nature08850>

Morais, D., Laval, V., Sache, I., Suffert, F., 2015. Comparative pathogenicity of sexual and asexual spores of *Zymoseptoria tritici* (septoria tritici blotch) on wheat leaves. *Plant Pathology* 64, 1429–1439. <https://doi.org/10.1111/ppa.12372>

O'Driscoll, A., Kildea, S., Doohan, F., Spink, J., Mullins, E., 2014. The wheat–Septoria conflict: a new front opening up? *Trends in plant science* 19, 602–610.

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, 2805–2823.

Pariaud, B., Robert, C., Goyeau, H., Lannou, C., 2009. Aggressiveness components and adaptation to a host cultivar in wheat leaf rust. *Phytopathology* 99, 869–878. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-7-0869>

Parlevliet, J.E., 1979. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annual Review of Phytopathology* 17, 203–222. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.17.090179.001223>

Sacristà, S., Garcia-Arenall, F., 2008. The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Mol Plant Pathol* 9, 369–384. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00460.x>

Sadeghi, H., Khazaei, F., Sheidaei, S., Yari, L., 2011. Effect of seed size on seed germination behavior of safflower. *ARPN Journal of Agriculture and Biological science* 6, 4.



- Article 3 : Fitness of *Zymoseptoria tritici* isolates with different resistance mechanisms towards demethylation inhibitors
- Siah, A., Bomble, M., Tisserant, B., Cadalen, T., Holvoet, M., Hilbert, J.-L., Halama, P., Reignault, P.L., 2018. Genetic structure of *Zymoseptoria tritici* in northern France at region, field, plant and leaf layer scales. *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-17-0322-R>
- Siah, A., Deweer, C., Morand, E., Reignault, P., Halama, P., 2010. Azoxystrobin resistance of French *Mycosphaerella graminicola* strains assessed by four *in vitro* bioassays and by screening of G143A substitution. *Crop Protection* 29, 737–743.
- Siah, Ali, Tisserant, B., El Chartouni, L., Duyme, F., Deweer, C., Roisin-Fichter, C., Sanssené, J., Durand, R., Reignault, P., Halama, P., 2010. Mating type idiomorphs from a French population of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*: widespread equal distribution and low but distinct levels of molecular polymorphism. *Fungal biology* 114, 980–990.
- Stewart, E. I, Croll, D., Lendenmann, M.H., Sanchez-Vallet, A., Hartmann, F.E., Palma-Guerrero, J., Ma, X., McDonald, B.A., 2018. Quantitative trait locus mapping reveals complex genetic architecture of quantitative virulence in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Molecular Plant Pathology* 19, 201–216. <https://doi.org/10.1111/mpp.12515>
- Van den Bosch, F., Paveley, N., van den Berg, F., Hobbelen, P., Oliver, R., 2014. Mixtures as a fungicide resistance management tactic. *Phytopathology* 104, 1264–1273. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-14-0121-RVW>
- Waalwijk, C., Mendes, O., Verstappen, E.C.P., de Waard, M.A., Kema, G.H.J., 2002. Isolation and characterization of the mating-type idiomorphs from the wheat septoria leaf blotch fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genet. Biol.* 35, 277–286. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2001.1322>
- Yamashita, M., Fraaije, B., 2018. Non-target site SDHI resistance is present as standing genetic variation in field populations of *Zymoseptoria tritici*. *Pest Manag. Sci.* 74, 672–681. <https://doi.org/10.1002/ps.4761>
- Yang, L., Gao, F., Shang, L., Zhan, J., McDonald, B.A., 2013. Association between Virulence and Triazole Tolerance in the Phytopathogenic Fungus *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS ONE* 8, e59568. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059568>
- Zhan, J., Torriani, S., McDonald, B., 2007. Significant difference in pathogenicity between MAT1-1 and MAT1-2 isolates in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal genetics and biology : FG & B* 44, 339–46. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.10.008>



**Conclusions et perspectives**



*Z. tritici* est le pathogène responsable de la septoriose, une maladie majeure des cultures de blé. Actuellement, le contrôle de la septoriose repose essentiellement sur l'utilisation des fongicides et l'utilisation de cultivars partiellement résistants à la maladie. Les dégâts de la septoriose peuvent entraîner des pertes de rendement allant jusqu'à 50% quand les conditions sont favorables (Eyal *et al.*, 1987). Ainsi, 70% des fongicides vendus dans l'UE sont destinés à lutter contre cet agent pathogène. Couplé avec l'utilisation de variétés de blé partiellement résistantes à la septoriose, les pertes totales sont estimées entre 5 et 10 % malgré les traitements fongicides (Fones et Gurr, 2015). Parmi les fongicides destinés à cette lutte, les IDM représentent un atout majeur grâce à leur efficacité. Toutefois, les utilisations répétées ont conduit à l'adaptation et à la sélection de souches résistantes présentant des altérations au niveau du gène cible codant pour la 14-alpha déméthylase, *cyp51*. D'autres mécanismes moléculaires sont apparus comme la surexpression de *cyp51* (Cools *et al.*, 2012) ou le phénotype MDR (Omrane *et al.*, 2015). Ces résistances conduisent à un management plus difficile dans les zones favorables au développement de *Z. tritici*.

Les objectifs de ce projet de thèse étaient de caractériser la résistance aux IDM d'une population récente de *Z. tritici* issues du Nord de la France et d'évaluer la *fitness* de ces souches par l'étude de différents traits d'histoire de vie impliqués dans la croissance et la pathogénicité, et ce, lors de différents stress (température, fongicides, compétitions et cultivars de blé). Les données obtenues pourront apporter une pierre à l'édifice de la connaissance du pouvoir adaptatif des souches de *Z. tritici* résistantes aux IDM, en fonction des contraintes climatiques et des résistances variétales.

## LA RESISTANCE AUX IDM DANS LA NORD DE LA FRANCE

Le criblage de la résistance IDM a été réalisé avec deux méthodes : le séquençage du gène *cyp51* et la détermination des  $CI_{50}$  pour les cinq IDM les plus utilisés au champ (époxyconazole, metconazole, tébuconazole, prothioconazole et prochloraz). Pour les 100 isolats, le séquençage du gène *cyp51* révèle la présence d'altérations en lien avec la résistance aux IDM sur toutes les souches. Ce fait est confirmé par la détermination des  $CI_{50}$  qui indique qu'aucune souche n'est sensible aux cinq IDM testés. Arvalis-Institut du végétal observe aussi une très faible présence des souches ayant une faible résistance en 2016 en France. Un total de 23 haplotypes de CYP51 combinant 18 mutations ont été identifiés, avec deux haplotypes majoritaires : le H5 (ou E4 selon la classification de Huf *et al.*, 2018)) avec une fréquence de 64 % et le H11 (ou F2 (Huf *et al.*, 2018)) représentant 10 % des haplotypes. Le reste de la population est composé d'haplotypes minoritaires concernant 1 ou 2 individus.



La fréquence des mutations ayant un impact important sur la résistance (I381V, V136A, V136C, D134G et A379G) sont proches de l'étude de Jorgensen *et al.* (2018), ce qui montre une cohérence dans notre étude pour la même année et dans une zone présentant le même climat. Seuls neuf haplotypes ont été identifiés (C4, C8, E4, F5, E8, F2, G1, H3 et H5) via la nomenclature de Huf *et al.* (2018). Il serait pertinent de créer une base de données sur internet pour enregistrer les différentes combinaisons identifiées par les différentes équipes de recherches, permettant ainsi d'avoir une classification actualisée et visible par tous. Une analyse complémentaire aurait pu être entreprise en déterminant les IC<sub>50</sub> vis-à-vis d'autres matières actives ou d'autres familles de fongicides présentes sur le marché, afin de mieux comprendre l'aptitude de ces souches face aux produits utilisés par les agriculteurs (mélange d'IDM, mélange IDM-SDHI et/ou mélange IDM-multisite).

L'originalité de l'étude se situe dans la détermination et l'apport des mécanismes de résistance additionnels (surexpression du gène *cyp51* et phénotype MDR), impliqués dans la résistance aux IDM mais peu documentés sur leur fréquence dans les populations européennes. Sur les 100 isolats que nous avons étudiés, 21% présentent des mécanismes additionnels en plus des altérations de CYP51, avec 14% concernant la surexpression de CYP51 et 7% pour le phénotype MDR. Ces mécanismes impactent fortement la résistance aux IDM comme la résistance aux tébuconazole, qui se révèle multipliée par huit pour les individus surexprimant le gène *cyp51*. L'analyse de raréfaction informe que les deux inserts sont relativement récents dans la population, apparus sous l'effet de certaines pressions comme celle exercées par les fongicides pour l'insert de 120 pb. Dans le cas de l'insert de 1000 bp, il correspond à un élément transposable très présent dans le génome de *Z. tritici*. Son action reste indéterminée dans la résistance aux IDM mais sa présence importante dans la population indique potentiellement un rôle neutre ou bénéfique chez le pathogène.

Nos résultats ont montré une variabilité des réponses aux cinq IDM testés, et ce malgré le même haplotype. Il n'a pas été possible de corréliser les haplotypes aux IC<sub>50</sub> obtenues. Pour l'haplotype H5 sans mécanismes additionnels, des variabilités dans la résistance aux cinq IDM testés ont été observées. Ceci pourrait être expliquée par la présence d'autres mécanismes additionnels impliquant d'autres gènes. Il serait intéressant d'étudier en détail les souches du même haplotype CYP51 mais présentant des degrés de résistance bien distincts aux cinq IDM testés et d'essayer de déterminer les autres mécanismes interférant dans la résistance. En effet, chez le phytopathogène *Rynchosporium commune*, trois gènes ont été identifiés lors d'une *genome-wide association study* (GWAS) comme impliqués dans la résistance aux IDM : le canal cationique vacuolaire YVC1, un activateur de transcription et une saccharopine déshydrogénase (Mohd-Assad *et al.*, 2016).





Une autre étude GWAS sur *Fusarium graminearum* a rapporté 74 nucléotides à caractère quantitatif significativement associés à la sensibilité au propiconazole ; ces nucléotides étant situés dans des gènes non associés à la sensibilité aux IDM (Talas *et al.*, 2016). Chez *Penicillium digitatum*, la présence des gènes *sreA* (ou *PdsreA*) et *PdsreB* s'est révélée comme facteur de transcription nécessaire à la résistance au prochloraz via la régulation de l'expression de gène *cyp51* et la virulence (Liu *et al.*, 2015 ; Ruan *et al.*, 2017). Ces exemples constituent des pistes à suivre dans le cas des haplotypes H5. Peu étudiés, les mycovirus peuvent également avoir un impact sur la résistance aux IDM comme pour *P. digitatum* (Niu *et al.*, 2018). Les auteurs prouvent que la diminution de la résistance au prochloraz est due à une co-infection par deux mycovirus (*polymycovirus 1* et *Narna-like virus 1*) pour deux souches étudiées. La présence de mycovirus peut également interférer avec le comportement du pathogène notamment dans sa *fitness* (Pearson *et al.*, 2009).

La hausse des fréquences des souches présentant des caractères additionnels comme la surexpression de *cyp51* et le phénotype MDR, augmente également la probabilité que les souches se recombinent avec des haplotypes CYP51 cumulants de nombreuses altérations. Les coûts de *fitness* restent inconnus pour la surexpression constitutive du gène *cyp51* et MDR, en particulier pour les haplotypes présentant de nombreuses altérations. Leurs combinaisons potentielles entraîneraient une réduction de la sensibilité et une perte d'efficacité sur le terrain. Kirikyali *et al.* (2017) ont identifié deux haplotypes présentant à la fois la surexpression de *cyp51* et le phénotype MDR avec une sensibilité plus réduite, constituant une menace accrue à la lutte contre la septoriose. Il serait ainsi intéressant d'étudier la transmission de ces altérations à la descendance via la reproduction sexuée, en présence et absence de fongicides. Cette expérience permettrait de voir si les descendants conservent les altérations dans un milieu sans pression fongicide ou si ces altérations permettent une meilleure *fitness* et donc la conservation de ces caractères malgré l'absence de pression.

Actuellement la connaissance des coûts de *fitness* est cruciale pour prédire l'efficacité et optimiser l'emploi des fongicides. Les stratégies de lutte contre les maladies fondées sur des combinaisons de fongicides, y compris les mélanges, les alternances et la rotation dynamique des mélanges pourraient être optimisées afin de déterminer les paramètres optimaux pour ces stratégies, grâce à des expérimentations sur le terrain. Dans la littérature, il existe une lacune importante dans les connaissances des coûts de *fitness* chez *Z. tritici*, notamment en ce qui concerne les souches hautement résistantes aux IDM, comme les souches ayant des mécanismes additionnels de surexpression du *cyp51* et MDR.



## L'EXPRESSION DE LA RESISTANCE AUX IDM EN FONCTION DE LA TEMPERATURE

Pour déterminer le coût de la *fitness*, la croissance des souches résistantes aux IDM a été évaluée pour un panel de 51 souches (dont 31 ayant uniquement les altérations CYP51, 14 cumulant altérations et surexpression du gène *cyp51*, et six cumulant altérations et caractère MDR) avec une gamme de température allant de 5 à 30°C avec un pas de 5°C. Pour observer l'expression de la résistance, des milieux enrichis en fongicide (tébuconazole et époxiconazole) ont été implémentés à l'étude avec deux concentrations (1 et 5 mg.L<sup>-1</sup>). L'objectif était d'identifier un potentiel *fitness cost* chez les souches présentant des niveaux de résistance élevés tel que les souches MDR notamment dans les gammes de températures qui ne sont pas optimales pour le champignon.

Aucun *fitness cost* n'a été détecté pour les souches MDR pour toutes les températures et toutes les conditions fongicides testées. De même, aucun *fitness cost* n'a été détecté pour les souches surexprimant *cyp51* et montre même la même capacité de croissance que les souches MDR sur le milieu tébuconazole, pour les deux concentrations testées. La température affecte la croissance des souches mais malgré la présence de fongicides, la croissance est toujours présente, quelle que soit la température et quel que soit la condition fongicide. Les souches MDR présentent le meilleur taux de croissance sur tous les milieux et à toutes les températures. Les souches surexprimant *cyp51* ont le même taux de croissance que les souches possédant uniquement des altérations CYP51. Cependant, leurs surfaces moyennes sont similaires aux souches MDR en condition tébuconazole 1 et 5 mg.L<sup>-1</sup>.

Avec le réchauffement climatique, des épisodes de canicules risquent de se multiplier et/ou durer plus longtemps (Dosio *et al.*, 2018). Nos résultats ont montré que, lors des hautes et basses températures (5 et 30°C), les souches ayant des mécanismes additionnels ont un meilleur taux de croissance en présence de fongicides que les souches uniquement altérées au niveau du CYP51. Cette croissance est peut-être un facteur à l'origine de la propagation de ces souches, qui tolèrent les variations de températures. Par ailleurs, le froid ne semble pas affecter la croissance de ces souches, ce qui permet leur conservation pour produire un nouvel inoculum pour la saison culturale suivante, d'où l'augmentation croissante de la fréquence de ces souches chaque année.

La température est connue pour affecter de nombreux processus biologiques comme la croissance, la reproduction, le développement et la survie des champignons (Zhan et Mc Donald, 2011). Différents mécanismes peuvent être alors mis en place pour s'adapter aux changements thermiques. Lendenmann *et al.* (2016) ont ainsi montré une corrélation entre l'adaptation



thermique de *Z. tritici* et le taux de croissance, la mélanisation et la morphologie des hyphes. Il a été montré par Lendenman *et al.* (2015) que la mélanisation est également en lien avec la résistance aux fongicides, grâce à une étude QTL montrant le potentiel rôle de PKS1 dans la biosynthèse de la mélanine, et l'association entre la mélanine et la résistance aux fongicides (Hu *et al.*, 2012). Des changements de couleur des colonies ont pu être observés en condition de stress comme la température, mais également selon la concentration en fongicide. Chez *Z. tritici*, l'inactivation de *MgSlf2* entraîne à la fois, l'absence de mélanisation, la perte de virulence et l'augmentation de la sensibilité à un IDM, le cyproconazole (Mehrabi *et al.*, 2009). Tiley *et al.* (2019) démontre que l'inactivation de *ZtvelB*, un gène impliqué dans la réponse à la lumière en lien avec la mélanisation est nécessaire à la sporulation et la croissance. La délétion du gène *MVE1* affecte la croissance mycélienne et la mélanisation de *Z. tritici* (Choi et Goodwin, 2011). Aucune étude n'a montré un lien direct entre la mélanisation et le pouvoir pathogène, mais la mélanisation semble jouer un rôle pléiotrope non négligeable chez *Z. tritici*. Il serait intéressant de mesurer le pouvoir pathogène et/ou la sensibilité aux azoles de ces souches mutantes pour étudier le lien entre ces facteurs. Le dosage de la mélanine (Belozerskaya *et al.*, 2017) ou la quantification des expressions des gènes (Schumacher, 2015) précédemment cités peut-être envisagés pour voir si les stress comme la température ou les fongicides influencent la régulation de certains gènes impliqués dans la fabrication de la mélanine.

## **LA FITNESS IN PLANTA DES SOUCHES RESISTANTES AUX IDM**

La *fitness in planta* a été analysée pour 51 souches sur deux cultivars de blé de niveaux de résistance légèrement différents à la septoriose (Alixan et Rubisko). Les traits étudiés sont le pourcentage de surfaces foliaires avec des lésions, la densité des pycnides et la taille des pycnidiospores. En outre, la capacité de compétition des souches MDR a été évaluée. Les résultats ont révélé que Alixan est le plus sensible avec une moyenne de 41% pour les surfaces foliaires malades. Concernant Rubisko, l'un des cultivars les plus semés de France, des niveaux de maladies plus faibles ont été obtenus pour ce cultivar (34.4% en moyenne). Pour les deux cultivars, la maladie a été corrélée à la densité des pycnides. Par ailleurs, nos résultats ont mis en évidence des corrélations entre la sévérité de la maladie et la  $CI_{50}$  pour l'époxiconazole ( $r=0,38$  ;  $p=0,006$ ) et le tébuconazole ( $r=0,31$  ;  $p=0,029$ ) chez Rubisko, mais pas chez Alixan. Il est intéressant de noter que le Rubisko est un cultivar largement utilisé en France et que l'époxiconazole et le tébuconazole sont des composants majeurs des programmes fongicides français. Ainsi, les corrélations que nous avons trouvées pourraient être le résultat d'une pression de sélection sur le terrain exercée par Rubisko et par l'époxiconazole et le tébuconazole. De même, Yang et ses collaborateurs (2013) ont décelé une corrélation positive entre la résistance



au cyproconazole et l'agressivité de *Z. tritici*. De même, les *mating-types* ne semblent pas influencer la pathogénicité des souches car aucune corrélation significative n'a été détectée pour ce facteur. Ces résultats ne concordent pas avec ceux de Zhan *et al.*, (2007) qui ont rapporté des niveaux de pouvoir pathogène légèrement plus élevés chez les souches MAT1-1 par rapport aux souches MAT1-2. Aucune corrélation n'a été établie pour les souches MDR et surexpression de *cyp51* concernant la sévérité de la maladie, la densité des pycnides et la taille des pycnidiospores (données non présentées), suggérant l'absence de *fitness cost* pour ces souches hautement résistantes sur le terrain.

Lors de l'étude de la compétition entre les souches MDR et non MDR, les plantes co-infectées avec les deux types de souches ont présenté une légère hausse des symptômes sur les deux cultivars. Étonnement, les souches les plus sporulantes sont les souches non MDR avec cinq combinaisons sur six. Seule la souche MDR 204 exprime un taux de sporulation de 72% et 68% sur les cultivars Alixan et Rubsiko, respectivement. Le développement d'une épidémie est fortement influencé par la capacité d'un agent pathogène à se reproduire et à provoquer des infections subséquentes (Parlevliet, 1979). Par conséquent, le taux de reproduction d'un pathogène est un déterminant important des dommages qu'il peut causer pendant une épidémie. D'autres tests de *fitness* peuvent être effectués sur les souches MDR, mais la capacité de sporulation est la clé de la propagation et de développement des épidémies. Nous émettons l'hypothèse que la présence croissante des souches MDR est due à la pression fongicide et non pas à un haut degré de *fitness* de ces souches. Comparativement aux souches non MDR, ces souches ne semblent pas avoir de *fitness cost*, malgré leur accumulation de différents mécanismes de résistance aux fongicides.

Dans cette thèse, nous étions limités à un total de sept souches MDR. Une expérience pourrait être menée en augmentant le nombre de souches MDR, potentiellement présentes dans les 140 isolats restant isolés dans les mêmes conditions et même année, utilisés dans l'étude de Siah *et al.* (2018). De plus, la discrimination des souches a été réalisée par l'identification des *mating-types*, combinant de ce fait deux souches de *mating-type* opposés. Un nouvel essai en serre avec des combinaisons entre souches MDR et non MDR de *mating-types* similaires pourrait être envisagé. En effet, la détermination pourrait se baser sur l'utilisation des primers utilisés dans l'étude de Yamashita et Fraaije (2017) permettant de générer un amplicon de 490 bp chez les souches non MDR et un amplicon de 1009 bp chez les souches MDR. Les résultats pourraient enrichir les données concernant les interactions entre les souches MDR et non MDR et définir un potentiel *fitness cost* au niveau de la sporulation lors de compétitions. Différents ratios de concentrations de spores (par exemple 20:80 et 80:20) dans le but d'observer l'influence que peut entraîner la présence majoritaire d'un type d'individus peuvent également être utilisés.



Lors de la notation de la maladie, seuls les symptômes sont mesurés durant la phase nécrotique. Dans le cas de *Z. tritici*, le taux de croissance ne peut être mesuré pendant la phase biotrophe à cause de la colonisation asymptomatique. Il aurait été intéressant d'évaluer la capacité de colonisation des tissus hôtes pendant cette phase grâce à l'utilisation de qPCR. L'une des perspectives serait de quantifier l'ADN fongique *in planta* en réalisant une cinétique de croissance pour de chaque souche pour évaluer son développement. Il avait été envisagé dans cette thèse de quantifier l'ADN fongique *in planta* notamment pour les combinaisons, en réalisant une cinétique de croissance par qPCR pour de chaque souche durant quatre dates (7 dpi (phase sans symptôme), 13 dpi (juste avant l'apparition des symptômes), 17 dpi (juste après l'apparition des symptômes) et 21 dpi (sporulation) pour mieux suivre l'évolution du pathogène. Cette expérience est plus pertinente dans le cas de combinaisons pour observer l'interaction des souches pendant la phase biotrophe et lors de la transition vers la phase nécrotrophe. Dans le cadre de notre étude, l'expression de quatre gènes de défense du blé a été réalisée pour mieux suivre les réponses des deux cultivars aux combinaisons de souches MDR et non MDR : *PR1* (impliqué dans l'inhibition du pathogène), *POX2* (impliqué dans de multiples processus physiologiques dont la lignification, l'oxydation des phénols et la subérisation), *PAL* (impliqué dans la biosynthèse de l'acide salicylique) et *LOX* (impliqué dans la biosynthèse de l'acide jasmonique). Les données ont été collectées et sont en cours d'analyse.

Par ailleurs, le projet visait également à analyser les gènes impliqués dans l'expression d'effecteurs clés chez *Z. tritici*. En effet, l'analyse de l'expression un panel de quatre gènes représentatifs permettrait de voir si une corrélation existe entre les symptômes et la mise en place de l'arsenal de *Z. tritici*. Les gènes ciblés sont : *Mg3LysM* (impliqué dans les stades précoces de l'infection ; essentiel pour perturber la reconnaissance par l'hôte, par élimination des fragments de chitine), *ZtWor1* (régulateur impliqué dans l'initiation de la colonisation et de la fructification), *MgHog1* (impliqué dans la transition entre la germination des spores et la croissance mycélienne) et *MgAtr4* (impliqué dans la détoxification des phytoalexines produites par la plante).

Enfin, nous espérons que les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse stimuleront d'autres recherches expérimentales afin de mieux caractériser la *fitness* des souches de *Z. tritici* hautement résistantes aux IDM, en particulier MDR, pour développer des stratégies visant à freiner leur progression sur le terrain.



# Références bibliographiques



~ A ~

Abrinbana, M., Mozafari, J., Shams-bakhsh, M., Mehrabi, R., 2010. Genetic structure of *Mycosphaerella graminicola* populations in Iran. *Plant Pathology* 59, 829–838. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02309.x>

Adhikari, T.B., Balaji, B., Breeden, J., Goodwin, S.B., 2007. Resistance of wheat to *Mycosphaerella graminicola* involves early and late peaks of gene expression. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71, 55–68. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2007.10.004>

Adhikari, T.B., Cavaletto, J.R., Dubcovsky, J., Gieco, J.O., Schlatter, A.R., Goodwin, S.B., 2004. Molecular Mapping of the *Stb4* Gene for Resistance to Septoria tritici Blotch in Wheat. *Phytopathology* 94, 1198–1206. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1198>

Albertini, C., Gredt, M., Leroux, P., 1999. Mutations of the  $\beta$ -Tubulin Gene Associated with Different Phenotypes of Benzimidazole Resistance in the Cereal Eyespot Fungi *Tapesia yallundae* and *Tapesia acuformis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 64, 17–31. <https://doi.org/10.1006/pest.1999.2406>

Ali, S., Ganai, B.A., Kamili, A.N., Bhat, A.A., Mir, Z.A., Bhat, J.A., Tyagi, A., Islam, S.T., Mushtaq, M., Yadav, P., Rawat, S., Grover, A., 2018. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiol. Res.* 212–213, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.008>

Amand, O., Calay, F., Coquillart, L., Legat, T., Bodson, B., Moreau, J.M., Maraite, H., 2003. First detection of resistance to Qol fungicides in *Mycosphaerella graminicola* on winter wheat in Belgium. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 68, 519–531.

Anderson, J.B., 2005. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nat Rev Microbiol* 3, 547–556. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1179>

Anderson, J.B., Sirjusingh, C., Parsons, A.B., Boone, C., Wickens, C., Cowen, L.E., Kohn, L.M., 2003. Mode of selection and experimental evolution of antifungal drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 163, 1287–1298.

Ansar, M., Leitch, M.H., 2009. The effect of agronomic practices on the development of Septoria Leaf Blotch and its subsequent affect on the yield and yield components of wheat. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* 3, 57–67.



Arraiano, L.S., Balaam, N., Fenwick, P.M., Chapman, C., Feuerhelm, D., Howell, P., Smith, S.J., Widdowson, J.P., Brown, J.K.M., 2009. Contributions of disease resistance and escape to the control of septoria tritici blotch of wheat. *Plant Pathology* 58, 910 - 922. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02118.x>

Arvalis Institut du Végétal : <http://www.arvalisinstitutduvegetal.fr/index.html>

Arvalis Institut du Végétal. 2012. Stratégies de lutte contre les maladies. Choisir et Décider.

Avila-Adame, C., Köller, W., 2003. Characterization of spontaneous mutants of *Magnaporthe grisea* expressing stable resistance to the Qo-inhibiting fungicide azoxystrobin. *Curr. Genet.* 42, 332–338. <https://doi.org/10.1007/s00294-002-0356-1>

~ B ~

Banke, S., Peschon, A., McDonald, B.A., 2004. Phylogenetic analysis of globally distributed *Mycosphaerella graminicola* populations based on three DNA sequence loci. *Fungal Genet. Biol.* 41, 226–238.

Bartlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, J.R., Hall, A.A., Hamer, M., Parr-Dobrzanski, B., 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Management Science* 58, 649–662. <https://doi.org/10.1002/ps.520>

Bataille, C., Duvivier, M., Heens, B., Mahieu, O., 2017. Lutte intégrée contre les maladies 58.

Battistini, G., Ciriani, A., Cavina, F., Prodi, A., Collina, M., 2017. Strobilurin Sensitivity of *Zymoseptoria tritici* Italian Strains. *Modern Fungicides and Antifungal Compounds VIII*, 263–264.

Bearchell, S.J., Fraaije, B.A., Shaw, M.W., Fitt, B.D.L., 2005. Wheat archive links long-term fungal pathogen population dynamics to air pollution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5438–5442. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501596102>

Belozerskaya, T.A., Gessler, N.N., Aver'yanov, A.A., 2017. Melanin Pigments of Fungi, in: Mérillon, J.-M., Ramawat, K.G. (Eds.), *Fungal Metabolites, Reference Series in Phytochemistry*. Springer International Publishing, Cham, pp. 263–291. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4\\_29](https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4_29)

Benhamou, N., Rey, P., 2012. Stimulateurs des défenses naturelles des plantes : une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable. I. Principes de la résistance induite. *phyto* 92, 1–23. <https://doi.org/10.7202/1012399ar>





- Billard, A., Fillinger, S., Leroux, P., Lachaise, H., Beffa, R., Debieu, D., 2012. Strong resistance to the fungicide fenhexamid entails a fitness cost in *Botrytis cinerea*, as shown by comparisons of isogenic strains. *Pest Manag. Sci.* 68, 684–691. <https://doi.org/10.1002/ps.2312>
- Bocquet, L., Rivière, C., Dermont, C., Samaillie, J., Hilbert, J.-L., Halama, P., Siah, A., Sahpaz, S., 2018. Antifungal activity of hop extracts and compounds against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Industrial Crops and Products* 122, 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.061>
- Boukef, S., McDonald, B.A., Yahyaoui, A., Rezgui, S., Brunner, P.C., 2012a. Frequency of mutations associated with fungicide resistance and population structure of *Mycosphaerella graminicola* in Tunisia. *European Journal of Plant Pathology* 132, 111–122.
- Boukef, S., McDonald, B.A., Yahyaoui, A., Rezgui, S., Brunner, P.C., 2012b. Frequency of mutations associated with fungicide resistance and population structure of *Mycosphaerella graminicola* in Tunisia. *Eur J Plant Pathol* 132, 111–122. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9853-8>
- Brent, K.J., 1995. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?, FRAC Monograph. GIFAP, Brussels.
- Brown, A.J.P., Cowen, L.E., di Pietro, A., Quinn, J., 2017. Stress adaptation. *Microbiol Spectr* 5. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0048-2016>
- Brown, J.K.M., Chartrain, L., Lasserre-Zuber, P., Saintenac, C., 2015. Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding. *Fungal genetics and biology, septoria tritici blotch disease of wheat: tools and techniques to study the pathogen Zymoseptoria tritici* 79, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.017>
- Browse, J., 2009. Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annu Rev Plant Biol* 60, 183–205. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092007>
- Brunner, P.C., Stefanato, F.L., McDonald, B.A., 2008. Evolution of the CYP51 gene in *Mycosphaerella graminicola*: evidence for intragenic recombination and selective replacement. *Molecular Plant Pathology* 9, 305–316. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00464.x>
- Brunner, P.C., Torriani, S.F.F., Croll, D., Stukenbrock, E.H., McDonald, B.A., 2013. Coevolution and life cycle specialization of plant cell wall degrading enzymes in a hemibiotrophic pathogen. *Mol. Biol. Evol.* 30, 1337–1347. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst041>



Büchel, K.H., 1986. The History of Azole Chemistry, in: Fungicide Chemistry, ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 1–23. <https://doi.org/10.1021/bk-1986-0304.ch001>

Buitrago, C., Frey, R., Wullschleger, J., Sierotzki, H., 2014. An update on the genetic changes in the *CYP51* gene of *Mycosphaerella graminicola* and their relationship to DMI fungicide sensitivity. Modern fungicides and antifungal compounds VII 103–110.

~ C ~

Carisse, O., 2010. Fungicides. BoD – Books on Demand.

Casado, J., Brigden, K., Santillo, D., Johnston, P., 2019. Screening of pesticides and veterinary drugs in small streams in the European Union by liquid chromatography high resolution mass spectrometry. Science of The Total Environment 670, 1204–1225. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.207>

Chandler, D., Bailey, A.S., Tatchell, G.M., Davidson, G., Greaves, J., Grant, W.P., 2011. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. 366, 1987–1998. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0390>

Chantret, N., Salse, J., Sabot, F., Rahman, S., Bellec, A., Laubin, B., Dubois, I., Dossat, C., Sourdille, P., Joudrier, P., Gautier, M.-F., Cattolico, L., Beckert, M., Aubourg, S., Weissenbach, J., Caboche, M., Bernard, M., Leroy, P., Chalhou, B., 2005. Molecular Basis of Evolutionary Events That Shaped the Hardness Locus in Diploid and Polyploid Wheat Species (*Triticum* and *Aegilops*). Plant Cell 17, 1033–1045. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.029181>

Chapara, V., Taylor, R.J., Pasche, J.S., Gudmestad, N.C., 2011. Competitive parasitic fitness of mefenoxam-sensitive and resistant isolates of *Phytophthora erythroseptica* under fungicides selection pressure. Plant Dis. 95, 691–696. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-10-0730>

Chartrain, L., Brading, P.A., Makepeace, J.C., Brown, J.K.M., 2004. Sources of resistance to septoria tritici blotch and implications for wheat breeding. Plant Pathology 53, 454–460. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2004.01052.x>

Chassot, C., Hugelshofer, U., Sierotzki, H., Gisi, U., 2008. Sensitivity of *CYP51* genotypes to DMI fungicides in *Mycosphaerella graminicola*. Modern fungicides and antifungal compounds V: 15th International Reinhardtsbrunn Symposium, Friedrichroda, Germany, May 6-10, 2007 129–136.



Chen, Z., Malamy, J., Henning, J., Conrath, U., Sánchez-Casas, P., Silva, H., Ricigliano, J., Klessig, D.K., 1995. Induction, modification, and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4134–4137.

Chen, Z., Ricigliano, J.W., Klessig, D.F., 1993. Purification and characterization of a soluble salicylic acid-binding protein from tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 9533–9537. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.20.9533>

Cheval, P., Siah, A., Bomble, M., Popper, A.D., Reignault, P., Halama, P., 2017. Evolution of Qol resistance of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in Northern France. *Crop Protection* 92, 131–133. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.10.017>

Chin, K.M., Chavaillaz, D., Kaesbohrer, M., Staub, T., Felsenstein, F.G., 2001. Characterizing resistance risk of *Erysiphe graminis f.sp. tritici* to strobilurins. *Crop Protection* 20, 87–96. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00059-4](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00059-4)

Choi, Y.-E., Goodwin, S.B., 2011. MVE1, encoding the velvet gene product homolog in *Mycosphaerella graminicola*, is associated with aerial mycelium formation, melanin biosynthesis, hyphal swelling, and light signaling. *Applied and environmental microbiology* 77, 942–953.

Çıfci, E., Yagdı, K., 2012. Study of Genetic diversity in wheat (*Triticum aestivum*) varieties using random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Turkish Journal of Field Crops* 17, 91–95.

Clement, M., Snell, Q., Walker, P., Posada, D., Crandall, K., 2002. Proceedings: International Parallel and Distributed Processing Symposium: April 15-19, 2002, Ft. Lauderdale, Florida, USA, INTERNATIONAL PARALLEL AND DISTRIBUTED PROCESSING SYMPOSIUM. IEEE Computer Society, Los Alamitos, California.

Consortium (IWGSC), T.I.W.G.S., Appels, R., Eversole, K., Stein, N., Feuillet, C., Keller, B., Rogers, J., Pozniak, C.J., Choulet, F., Distelfeld, A., Poland, J., Ronen, G., Sharpe, A.G., Barad, O., Baruch, K., Keeble-Gagnère, G., Mascher, M., Ben-Zvi, G., Josselin, A.-A., Himmelbach, A., Balfourier, F., Gutierrez-Gonzalez, J., Hayden, M., Koh, C., Muehlbauer, G., Pasam, R.K., Paux, E., Rigault, P., Tibbits, J., Tiwari, V., Spannagl, M., Lang, D., Gundlach, H., Haberer, G., Mayer, K.F.X., Ormanbekova, D., Prade, V., Šimková, H., Wicker, T., Swarbreck, D., Rimbart, H., Felder, M., Guilhot, N., Kaithakottil, G., Keilwagen, J., Leroy, P., Lux, T., Twardziok, S., Venturini, L., Juhász, A., Abrouk, M., Fischer, I., Uauy, C., Borrill, P., Ramirez-Gonzalez, R.H., Arnaud, D., Chalabi, S., Chalhoub, B., Cory, A., Datla, R., Davey, M.W., Jacobs, J., Robinson, S.J., Steuernagel, B., Ex, F. van, Wulff, B.B.H., Benhamed, M., Bendahmane, A., Concia, L., Latrasse, D., Bartoš, J., Bellec, A., Berges, H., Doležel, J., Frenkel, Z., Gill, B., Korol, A., Letellier, T., Olsen, O.-A., Singh, K., Valárik, M., Vossen, E. van der, Vautrin, S., Weining, S., Fahima, T., Glikson, V., Raats, D., Čiháliková, J.,



Toegelová, H., Vrána, J., Sourdille, P., Darrier, B., Barabaschi, D., Cattivelli, L., Hernandez, P., Galvez, S., Budak, H., Jones, J.D.G., Witek, K., Yu, G., Small, I., Melonek, J., Zhou, R., Belova, T., Kanyuka, K., King, R., Nilsen, K., Walkowiak, S., Cuthbert, R., Knox, R., Wiebe, K., Xiang, D., Rohde, A., Golds, T., Čížková, J., Akpınar, B.A., Biyiklioglu, S., Gao, L., N'Daiye, A., Kubaláková, M., Šafář, J., Alfama, F., Adam-Blondon, A.-F., Flores, R., Guerche, C., Loaec, M., Quesneville, H., Condie, J., Ens, J., Maclachlan, R., Tan, Y., Alberti, A., Aury, J.-M., Barbe, V., Couloux, A., Cruaud, C., Labadie, K., Mangenot, S., Wincker, P., Kaur, G., Luo, M., Sehgal, S., Chhuneja, P., Gupta, O.P., Jindal, S., Kaur, P., Malik, P., Sharma, P., Yadav, B., Singh, N.K., Khurana, J.P., Chaudhary, C., Khurana, P., Kumar, V., Mahato, A., Mathur, S., Sevanthi, A., Sharma, N., Tomar, R.S., Holušová, K., Plíhal, O., Clark, M.D., Heavens, D., Kettleborough, G., Wright, J., Balcárková, B., Hu, Y., Salina, E., Ravin, N., Skryabin, K., Beletsky, A., Kadnikov, V., Mardanov, A., Nesterov, M., Rakitin, A., Sergeeva, E., Handa, H., Kanamori, H., Katagiri, S., Kobayashi, F., Nasuda, S., Tanaka, T., Wu, J., Cattonaro, F., Jiumeng, M., Kugler, K., Pfeifer, M., Sandve, S., Xun, X., Zhan, B., Batley, J., Bayer, P.E., Edwards, D., Hayashi, S., Tulpová, Z., Visendi, P., Cui, L., Du, X., Feng, K., Nie, X., Tong, W., Wang, L., 2018. Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science* 361, eaar7191. <https://doi.org/10.1126/science.aar7191>

Cools, H.J., Fraaije, B.A., 2013. Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implications for future control. *Pest management science* 69, 150–155.

Cools, H.J., Hawkins, N.J., Fraaije, B.A., 2013. Constraints on the evolution of azole resistance in plant pathogenic fungi. *Plant Pathol* 62, 36–42. <https://doi.org/10.1111/ppa.12128>

Cools, H.J., Parker, J.E., Kelly, D.E., Lucas, J.A., Fraaije, B.A., Kelly, S.L., 2010. Heterologous expression of mutated eburicol 14  $\alpha$  -demethylase (CYP51) proteins of *Mycosphaerella graminicola* to assess effects on azole fungicide sensitivity and intrinsic protein function. *Applied and environmental microbiology* 76, 2866–2872.

Cordo, C.A., Monaco, C.I., Segarra, C.I., Simon, M.R., Mansilla, A.Y., Perelló, A.E., Kripelz, N.I., Bayo, D., Conde, R.D., 2007. *Trichoderma* spp. as elicitors of wheat plant defense responses against *Septoria tritici*. *Biocontrol Science and Technology* 17, 687–698. <https://doi.org/10.1080/09583150701527094>

Corio-Costet, M.-F., Dufour, M.-C., Cigna, J., Abadie, P., Chen, W.-J., 2011b. Diversity and fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to Qol fungicides. *Eur J Plant Pathol* 129, 315–329. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9711-0>



Cousin, A., Mehrabi, R., Guilleroux, M., Dufresne, M., VAN DER Lee, T., Waalwijk, C., Langin, T., Kema, G.H.J., 2006. The MAP kinase-encoding gene *MgFus3* of the non-appressorium phytopathogen *Mycosphaerella graminicola* is required for penetration and *in vitro* pycnidia formation. *Mol. Plant Pathol.* 7, 269–278. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00337.x>

Cowger, C., Hoffer, M.E., Mundt, C.C., 2000. Specific adaptation by *Mycosphaerella graminicola* to a resistant wheat cultivar. *Plant Pathology* 49, 445–451. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00472.x>

Cowger, Mundt, 2002. Aggressiveness of *Mycosphaerella graminicola* isolates from susceptible and partially resistant wheat cultivars. *Phytopathology* 624–30.

Cunfer, B.M., 1997. Taxonomy and nomenclature of *Septoria* and *Stagonospora* species on small grain cereals. *Plant Disease* 81, 427–428. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.5.427>

Czaja, K., Góralczyk, K., Struciński, P., Hernik, A., Korcz, W., Minorczyk, M., Łyczewska, M., Ludwicki, J.K., 2015. Biopesticides-towards increased consumer safety in the European Union. *Pest Manag. Sci.* 71, 3–6. <https://doi.org/10.1002/ps.3829>

~ D ~

De Miccolis Angelini, Polastro, Faretra, 2015. Genetics of Fungicide Resistance | SpringerLink [WWW Document]. URL [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-4-431-55642-8\\_2](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-4-431-55642-8_2) (accessed 11.20.19).

Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G.D., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13, 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>

Delmotte, F., Mestre, P., Schneider, C., Kassemeyer, H.-H., Kozma, P., Richart-Cervera, S., Rouxel, M., Delière, L., 2014. Rapid and multiregional adaptation to host partial resistance in a plant pathogenic oomycete: evidence from European populations of *Plasmopara viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew. *Infect. Genet. Evol.* 27, 500–508. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.10.017>



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.

Dooley, H., Shaw, M.W., Mehenni-Ciz, J., Spink, J., Kildea, S., 2016. Detection of *Zymoseptoria tritici* SDHI insensitive field isolates carrying the SdhC-H152R and SdhD-R47W substitutions. *Pest Management Science*. <https://doi.org/10.1002/ps.4269>

Dooley, H., Shaw, M.W., Spink, J., Kildea, S., 2016b. Effect of azole fungicide mixtures, alternations and dose on azole sensitivity in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Plant Pathology* 65, 124–136.

Dosio, A., Mentaschi, L., Fischer, E.M., Wyser, K., 2018. Extreme heat waves under 1.5°C and 2°C global warming. *Environ. Res. Lett.* 13, 054006. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aab827>

Doussinault, G., Pavoine, M.-T., Jaudeau, B., Jahier, J., 2001. Évolution de la variabilité génétique chez le blé. *Dossier de l'environnement de l'INRA* 91–103.

Drabešová, J., Ryšánek, P., Brunner, P., McDonald, B.A., Croll, D., 2013. Population genetic structure of *Mycosphaerella graminicola* and Quinone Outside Inhibitor (Qol) resistance in the Czech Republic. *European journal of plant pathology* 135, 211–224.

Duncan, K.E., Howard, R.J., 2000. Cytological analysis of wheat infection by the leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Mycological Research* 104, 1074–1082. <https://doi.org/10.1017/S0953756299002294>

~ E ~

El Chartouni, L., Tisserant, B., Ali, S., Duyme, F., Durand, R., Halama, P., Reignault, P., 2012. Evolution of *Mycosphaerella graminicola* at the wheat leaf and field levels. *Phytopathologia Mediterranea* 51, 332–339.

Eriksen, L., Munk, L., 2003. The occurrence of *Mycosphaerella graminicola* and its anamorph *Septoria tritici* in winter wheat during the growing season. *European Journal of Plant Pathology* 109, 253–259. <https://doi.org/10.1023/A:1022851502770>

Estep, L.K., Torriani, S.F.F., Zala, M., Anderson, N.P., Flowers, M.D., McDonald, B.A., Mundt, C.C., Brunner, P.C., 2015. Emergence and early evolution of fungicide resistance in North American populations of *Zymoseptoria tritici*. *Plant Pathology* 64, 961–971.



Eyal, Z., 1999. The Septoria Tritici and Stagonospora Nodorum Blotch diseases of wheat. *European Journal of Plant Pathology* 105, 629–641. <https://doi.org/10.1023/A:1008716812259>

Eyal, Z., Center International Maize and Wheat Improvement, 1987. *The Septoria Diseases of wheat: concepts and methods of disease management*. CIMMYT.

~ F ~

Feder, M.E., Hofmann, G.E., 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 243–282. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.61.1.243>

Feldman, M., Levy, A.A., 2012. Genome evolution due to allopolyploidization in wheat. *Genetics* 192, 763–774. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.146316>

Flor, H.H., 1971. Current status of the gene-for-gene concept | *Annual Review of Phytopathology*. *Annual Review of Phytopathology* 9, 275–296. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001423>

Fones, H., Gurr, S., 2015. The impact of Septoria tritici Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genet Biol* 79, 3–7. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.004>

Fouché, S., Plissonneau, C., McDonald, B.A., Croll, D., 2018. Meiosis leads to pervasive copy-number variation and distorted inheritance of accessory chromosomes of the Wheat Pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Genome Biol Evol* 10, 1416–1429. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy100>

Fraaije, B.A., Bayon, C., Atkins, S., Cools, H.J., Lucas, J.A., Fraaije, M.W., 2012. Risk assessment studies on succinate dehydrogenase inhibitors, the new weapons in the battle to control Septoria leaf blotch in wheat. *Molecular plant pathology* 13, 263–275.

Fraaije, B.A., Cools, H.J., Fountaine, J., Lovell, D.J., Motteram, J., West, J.S., Lucas, J.A., 2005. Role of ascospores in further spread of Qol-resistant cytochrome b alleles (G143A) in field populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* 95, 933–941. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0933>

Fraaije, B.A., Cools, H.J., Kim, S.-H., Motteram, J., Clark, W.S., Lucas, J.A., 2007. A novel substitution I381V in the sterol 14  $\alpha$ -demethylase (CYP51) of *Mycosphaerella graminicola* is differentially selected by azole fungicides. *Molecular Plant Pathology* 8, 245–254. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00388.x>



Francisco, C.S., Ma, X., Zwyssig, M.M., McDonald, B.A., Palma-Guerrero, J., 2019. Morphological changes in response to environmental stresses in the fungal plant pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Sci Rep* 9, 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45994-3>

Friesen, T., Xu, S., Harris, M., 2008. Stem Rust, Tan Spot, Stagonospora nodorum Blotch, and Hessian fly resistance in *Langdon durum*— Synthetic hexaploid wheat lines. *Crop Science* 48. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.08.0463>

~ G ~

Gandon, S., Michalakis, Y., 2000. Evolution of parasite virulence against qualitative or quantitative host resistance. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 267, 985–990. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1100>

Garcia-Rubio, R., Cuenca-Estrella, M., Mellado, E., 2017. Triazole Resistance in *Aspergillus* Species: An Emerging Problem. *Drugs* 77, 599–613. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0714-4>

Gascoigne, K.E., Taylor, S.S., 2009. How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *Journal of Cell Science* 122, 2579–2585. <https://doi.org/10.1242/jcs.039719>

Gauthier, G.M., 2015. Dimorphism in fungal pathogens of mammals, plants, and insects. *PLOS Pathogens* 11, e1004608. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004608>

Georgopoulos, S.G., Skylakakis, G., 1986. Genetic variability in the fungi and the problem of fungicide resistance. *Crop Protection* 5, 299–305. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(86\)90107-9](https://doi.org/10.1016/0261-2194(86)90107-9)

Ghaffary, S.M.T., Robert, O., Laurent, V., Lonnet, P., Margalé, E., van der Lee, T.A., Visser, R.G., Kema, G.H., 2011. Genetic analysis of resistance to septoria tritici blotch in the French winter wheat cultivars Balance and Apache. *Theoretical and Applied Genetics* 123, 741–754.

Ghini, R., Hamada, E., Bettiol, W., 2008. Climate change and plant diseases. *Scientia Agricola - SCI AGRIC* 65. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162008000700015>

Gigot, C., Saint-Jean, S., Huber, L., Maumené, C., Leconte, M., Kerhornou, B., Vallavieille-Pope, C., 2013. Protective effects of a wheat cultivar mixture against splash-dispersed septoria tritici blotch epidemics. *Plant Pathology* 62, 1011–1019.





Gijzen, M., Nürnberger, T., 2006. Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. *Phytochemistry* 67, 1800–1807. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.12.008>

Gisi, U., Sierotzki, H., Cook, A., McCaffery, A., 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Manag. Sci.* 58, 859–867. <https://doi.org/10.1002/ps.565>

Gohari, A.M., Ware, S.B., Wittenberg, A.H., Mehrabi, R., M'Barek, S.B., Verstappen, E.C., van der Lee, T.A., Robert, O., Schouten, H.J., de Wit, P.P., others, 2015. Effector discovery in the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Mol. Plant Pathol* 26.

Goodwin, S.B., M'Barek, S.B., Dhillon, B., Wittenberg, A.H., Crane, C.F., Hane, J.K., Foster, A.J., Van der Lee, T.A., Grimwood, J., Aerts, A., others, 2011. Finished genome of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* reveals dispensome structure, chromosome plasticity, and stealth pathogenesis. *PLoS Genet* 7, e1002070.

Goudemand, E., Laurent, V., Duchalais, L., Ghaffary, S.M.T., Kema, G.H., Lonnet, P., Margalé, E., Robert, O., 2013. Association mapping and meta-analysis: two complementary approaches for the detection of reliable *Septoria tritici* blotch quantitative resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular breeding* 32, 563–584.

Groth, J., 1976. Multilines and “super-races”: a simple model 937–939.

Gurung, S., Goodwin, S.B., Kabbage, M., Bockus, W.W., Adhikari, T.B., 2011. Genetic differentiation at microsatellite loci among populations of *Mycosphaerella graminicola* from California, Indiana, Kansas, and North Dakota. *Phytopathology* 101, 1251–1259.

~ H ~

Habig, M., Quade, J., Stukenbrock, E.H., 2017. Forward genetics approach reveals host genotype-dependent importance of accessory chromosomes in the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *mBio* 8. <https://doi.org/10.1128/mBio.01919-17>

Hahn, M., Leroch, M., 2015. Multidrug Efflux Transporters, in: Ishii, H., Hollomon, D.W. (Eds.), *Fungicide resistance in plant pathogens: principles and a guide to practical management*. Springer Japan, Tokyo, pp. 233–248. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8\\_15](https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8_15)



Halama, P., 1996. The occurrence of *Mycosphaerella graminicola*, teleomorph of *Septoria tritici* in France. *Plant Pathology* 45, 135–138. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1996.d01-103.x>

Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141, 312–322. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>

Hammond-Kosack, K.E., Rudd, J.J., 2008. Plant resistance signalling hijacked by a necrotrophic fungal pathogen. *Plant Signal Behav* 3, 993–995. <https://doi.org/10.4161/psb.6292>

Hawkins, N.J., Fraaije, B.A., 2016. Predicting resistance by mutagenesis: Lessons from 45 Years of MBC Resistance. *Front Microbiol* 7, 1814. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01814>

Heick, T.M., Justesen, A.F., Jørgensen, L.N., 2017. Anti-resistance strategies for fungicides against wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* with focus on DMI fungicides. *Crop Protection* 99, 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.05.009>

Herth, A., 2011. Le biocontrôle pour la protection des cultures, 15 recommandations pour soutenir les technologies vertes.

Hobbelen, P.H.F., Paveley, N.D., Oliver, R.P., Van den Bosch, F., 2013. The usefulness of fungicide mixtures and alternation for delaying the selection for resistance in populations of *Mycosphaerella graminicola* on winter wheat: A modeling analysis. *Phytopathology* 103, 690–707.

Hu, Y., Hao, X., Lou, J., Zhang, P., Pan, J., Zhu, X., 2012. A PKS gene, *pks-1*, is involved in chaetoglobosin biosynthesis, pigmentation and sporulation in *Chaetomium globosum*. *Sci. China Life Sci.* 55, 1100–1108. <https://doi.org/10.1007/s11427-012-4409-5>

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*. <https://doi.org/10.1111/ppa.12891>

~ | ~

INRA, Anses, ARAVALIS – Institut du Végétal, Note commune Résistances aux fongicides / Céréales à pailles / janvier 2019 [https://www.r4p-inra.fr/wp-content/uploads/2019/01/NC2019\\_cereales.pdf](https://www.r4p-inra.fr/wp-content/uploads/2019/01/NC2019_cereales.pdf)



Ishii, H., 2015. Stability of Resistance, in: Ishii, H., Hollomon, D.W. (Eds.), Fungicide Resistance in Plant Pathogens: Principles and a Guide to Practical Management. Springer Japan, Tokyo, pp. 35–48. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8_3)

~ J ~

Jefcoate, C.R., 1978. Measurement of substrate and inhibitor binding to microsomal cytochrome P-450 by optical-difference spectroscopy, in: Fleischer, S., Packer, L. (Eds.), Methods in Enzymology, Biomembranes - Part C: Biological Oxidations. Academic Press, pp. 258–279. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52029-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52029-6)

Jones, J.D.G., Dangl, J.L., 2006. The plant immune system. *Nature* 444, 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>

Jørgensen, L., Matzen, N., Hansen, J., Semaskiene, R., Korbas, M., Danielewicz, J., Maumene, C., Rodemann, B., Weigand, S., Hess, M., Blake, J., Clark, B., Kildea, S., Batailles, C., Rita, B., Havis, N., Treikale, O., Głazek, M., 2018. Four azoles' profile in the control of *Septoria*, yellow rust and brown rust in wheat across Europe. *Crop Protection* 105, 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.10.018>

Jørgensen, L.N., Hovmøller, M.S., Hansen, J.G., Lassen, P., Clark, B., Bayles, R., Rodemann, B., Flath, K., Jahn, M., Goral, T., Jerzy Czembor, J., Cheyron, P., Maumene, C., De Pope, C., Ban, R., Nielsen, G.C., Berg, G., 2014. IPM Strategies and their dilemmas including an introduction to [www.eurowheat.org](http://www.eurowheat.org). *Journal of Integrative Agriculture* 13, 265–281. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60646-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60646-2)

~ K ~

Karaoglanidis, G.S., Luo, Y., Michailides, T.J., 2010. Competitive ability and fitness of *Alternaria alternata* isolates resistant to QoI fungicides. *Plant Disease* 95, 178–182. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-10-0510>

Karaoglanidis, G.S., Thanassoulopoulos, C.C., Ioannidis, P.M., 2001. Fitness of *Cercospora Beticola* field isolates – resistant and – sensitive to demethylation inhibitor fungicides. *European Journal of Plant Pathology* 107, 337–347. <https://doi.org/10.1023/A:1011219514343>



- Kärkönen, A., Kuchitsu, K., 2015. Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants. *Phytochemistry* 112, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.09.016>
- Kema, G., 1996. Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopathology* 86, 777. <https://doi.org/10.1094/Phyto-86-777>
- Kema, G.H., van der Lee, T.A., Mendes, O., Verstappen, E.C., Lankhorst, R.K., Sandbrink, H., van der Burgt, A., Zwieters, L.-H., Csukai, M., Waalwijk, C., 2008. Large-scale gene discovery in the septoria tritici blotch fungus *Mycosphaerella graminicola* with a focus on *in planta* expression. *Molecular plant-microbe interactions* 21, 1249–1260.
- Kema, G.H.J., Annone, J.G., 1991. *In vitro* production of pycnidia by *Septoria tritici*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 97, 65–72. <https://doi.org/10.1007/BF01974270>
- Kema, G.H.J., van Silfhout, C.H., 1997. Genetic Variation for Virulence and Resistance in the Wheat- *Mycosphaerella graminicola* Pathosystem III. Comparative Seedling and Adult Plant Experiments. *Phytopathology* 87, 266–272. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.3.266>
- Kildea, S., Marten-Heick, T., Grant, J., Mehenni-Ciz, J., Dooley, H., 2019. A combination of target-site alterations, overexpression and enhanced efflux activity contribute to reduced azole sensitivity present in the Irish *Zymoseptoria tritici* population. *Eur J Plant Pathol* 154, 529–540. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01676-4>
- Kildea, S., Ransbotyn, V., Khan, M.R., Fagan, B., Leonard, G., Mullins, E., Doohan, F.M., 2008. *Bacillus megaterium* shows potential for the biocontrol of septoria tritici blotch of wheat. *Biological control* 47, 37–45.
- Kim, Y.K., Xiao, C.L., 2011. Stability and fitness of pyraclostrobin and boscalid-resistant phenotypes in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology* 101, 1385–1391. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-11-0123>
- Kinealy, C., 1994. *This great calamity : the Irish famine, 1845-52*. Dublin : Gill & Macmillan.
- Kirikyali N, Diez P, Luo J, Hawkins N, Fraaije BA, 2017. Azole and SDHI Sensitivity status of *Zymoseptoria tritici* Field populations sampled in France, Germany and the UK during 2015. *Modern Fungicides and Antifungal Compounds* 3, 153–158.
- Koenraadt, H., Somerville, S.C., Jones, A.L., 1992. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. <https://doi.org/10.1094/phyto-82-1348>



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 Pathog.* 5, e1000696. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000696>

Kuparinen, A., Markkanen, T., Riikonen, H., Vesala, T., 2007. Modeling air-mediated dispersal of spores, pollen and seeds in forested areas. *Ecological Modelling* 208, 177–188.

~ L ~

Larios, E., Búrquez, A., Becerra, J.X., Venable, D.L., 2014. Natural selection on seed size through the life cycle of a desert annual plant. (*Ecology*). 95, 3213–3220.

Leach, M.D., Cowen, L.E., 2014. Membrane fluidity and temperature sensing are coupled via circuitry comprised of *Ole1*, *Rsp5*, and *Hsf1* in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 13, 1077–1084. <https://doi.org/10.1128/EC.00138-14>

Lee, W.-S., Rudd, J.J., Hammond-Kosack, K.E., Kanyuka, K., 2014. *Mycosphaerella graminicola* LysM effector-mediated stealth pathogenesis subverts recognition through both CERK1 and CEBiP homologues in wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27, 236–243.

Lehmann, S., Serrano, M., L'Haridon, F., Tjamos, S.E., Metraux, J.-P., 2015. Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. *Phytochemistry* 112, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.08.027>

Lendenmann, M.H., Croll, D., Palma-Guerrero, J., Stewart, E.L., McDonald, B.A., 2016. QTL mapping of temperature sensitivity reveals candidate genes for thermal adaptation and growth morphology in the plant pathogenic fungus *Zymoseptoria tritici*. *Heredity* 116, 384–394. <https://doi.org/10.1038/hdy.2015.111>

Leroux, P., Albertini, C., Gautier, A., Gredt, M., Walker, A.-S., 2007. Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14  $\alpha$  -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest. Manag. Sci.* 63, 688–698. <https://doi.org/10.1002/ps.1390>

Leroux, P. et al., 2006. Resistance to fungicides in French populations of *Septoria*. *Aspect of applied biology* 78, 153–162.



Leroux, P., Walker, A.-S., 2011. Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14  $\alpha$  - demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest management science* 67, 44–59.

Levin, B.R., Perrot, V., Walker, N., 2000. Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. *Genetics* 154, 985–997.

Lev-Yadun, S., Gopher, A., Abbo, S., 2000. The Cradle of Agriculture. *Science* 288, 1602–1603. <https://doi.org/10.1126/science.288.5471.1602>

Linde, C.C., Zhan, J., McDonald, B.A., 2002. Population Structure of *Mycosphaerella graminicola*: From Lesions to Continents. *Phytopathology* 92, 946–955. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.9.946>

Liu, J., Yuan, Y., Wu, Z., Li, N., Chen, Y., Qin, T., Geng, H., Xiong, L., Liu, D., 2015. A novel sterol regulatory element-binding protein gene (*sreA*) identified in *Penicillium digitatum* is required for prochloraz resistance, full virulence and *erg11* (*cyp51*) regulation. *PLoS ONE* 10, e0117115. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117115>

Lucas, J.A., Fraaije, B.A., 2008. QoI resistance in *Mycosphaerella graminicola*: what have we learned so far? *Modern fungicides and antifungal compounds V: 15th International Reinhardsbrunn Symposium, Friedrichroda, Germany, May 6-10, 2007* 71–77.

Lucas, J.A., Hawkins, N.J., Fraaije, B.A., 2015. The evolution of fungicide resistance. *Adv. Appl. Microbiol.* 90, 29–92. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.001>

Lynch, K. m., Zannini, E., Guo, J., Axel, C., Arendt, E. k., Kildea, S., Coffey, A., 2016. Control of *Zymoseptoria tritici* cause of septoria tritici blotch of wheat using antifungal *Lactobacillus* strains. *J Appl Microbiol* 121, 485–494. <https://doi.org/10.1111/jam.13171>

~ M ~

Ma, B., Uddin, W., 2009. Fitness and competitive ability of an azoxystrobin-resistant G143A mutant of *Magnaporthe oryzae* from perennial ryegrass. *Plant disease* 93, 1044–1049. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-10-1044>

Ma, L.-J., van der Does, H.C., Borkovich, K.A., Coleman, J.J., Daboussi, M.-J., Di Pietro, A., Dufresne, M., Freitag, M., Grabherr, M., Henrissat, B., Houterman, P.M., Kang, S., Shim, W.-B., Woloshuk, C., Xie, X., Xu, J.-R., Antoniw, J., Baker, S.E., Bluhm, B.H., Breakspear, A., Brown, D.W., Butchko, R.A.E., Chapman, S., Coulson, R., Coutinho, P.M., Danchin, E.G.J., Diener, A., Gale, L.R.,



Gardiner, D.M., Goff, S., Hammond-Kosack, K.E., Hilburn, K., Hua-Van, A., Jonkers, W., Kazan, K., Kodira, C.D., Koehrsen, M., Kumar, L., Lee, Y.-H., Li, L., Manners, J.M., Miranda-Saavedra, D., Mukherjee, M., Park, G., Park, J., Park, S.-Y., Proctor, R.H., Regev, A., Ruiz-Roldan, M.C., Sain, D., Sakthikumar, S., Sykes, S., Schwartz, D.C., Turgeon, B.G., Wapinski, I., Yoder, O., Young, S., Zeng, Q., Zhou, S., Galagan, J., Cuomo, C.A., Kistler, H.C., Rep, M., 2010. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* 464, 367–373. <https://doi.org/10.1038/nature08850>

Macho, A.P., Zipfel, C., 2014. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Mol. Cell* 54, 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.028>

MAGBOUL, A.M., GENG, S., GILCHRIST, D.G., JACKSON, L.F., 1992. Environmental influence on the infection of wheat by *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* 82, 1407–1413.

Marichal, P., Gorrens, J., Laurijssens, L., Vermuyten, K., Van Hove, C., Le Jeune, L., Verhasselt, P., Sanglard, D., Borgers, M., Ramaekers, F.C., Odds, F., Vanden Bossche, H., 1999. Accumulation of 3-ketosteroids induced by itraconazole in azole-resistant clinical *Candida albicans* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2663–2670.

Marshall, R., Kombrink, A., Motteram, J., Loza-Reyes, E., Lucas, J., Hammond-Kosack, K.E., Thomma, B.P.H.J., Rudd, J.J., 2011. Analysis of two in planta expressed LysM effector homologs from the fungus *Mycosphaerella graminicola* reveals novel functional properties and varying contributions to virulence on wheat. *Plant Physiol.* 156, 756–769. <https://doi.org/10.1104/pp.111.176347>

Matsuoka, Y., 2011. Evolution of polyploid *Triticum* wheats under cultivation: the role of domestication, natural hybridization and allopolyploid speciation in their diversification. *Plant Cell Physiol* 52, 750–764. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr018>

Mc Kendry, A.L., Henke, G.E., Finney, P.L., 1995. Effects of Septoria leaf blotch on Soft Red winter wheat milling and baking quality. *Cereal Chem* 72, 142–146.

McDonald, M.C., McDonald, B.A., Solomon, P.S., 2015. Recent advances in the *Zymoseptoria tritici*–wheat interaction: insights from pathogenomics. *Front Plant Sci* 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00102>

Mehrabi, R., M'Barek, S.B., Lee, T.A.J. van der, Waalwijk, C., Wit, P.J.G.M. de, Kema, G.H.J., 2009.  $G\alpha$  and  $G\beta$  proteins regulate the cyclic AMP pathway that is required for development and pathogenicity of the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Eukaryotic Cell* 8, 1001–1013. <https://doi.org/10.1128/EC.00258-08>



Mehrabi, R., Zwiers, L.-H., de Waard, M.A., Kema, G.H.J., 2006. MgHog1 Regulates dimorphism and pathogenicity in the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 1262–1269. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1262>

Mejri, S., Siah, A., Abuhaie, C.-M., Halama, P., Magnin-Robert, M., Randoux, B., Reignault, P., Rigo, B., Ghinet, A., 2019. New salicylic acid and pyroglutamic acid conjugated derivatives confer protection to bread wheat against *Zymoseptoria tritici*. *J. Sci. Food Agric.* 99, 1780–1786. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9370>

Mejri, S., Siah, A., Coutte, F., Magnin-Robert, M., Randoux, B., Tisserant, B., Krier, F., Jacques, P., Reignault, P., Halama, P., 2017. Biocontrol of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* using cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Environ Sci Pollut Res* 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9241-9>

Miao, V.P., Covert, S.F., VanEtten, H.D., 1991. A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable (“B”) chromosome. *Science* 254, 1773–1776. <https://doi.org/10.1126/science.1763326>

Mikaberidze, A., McDonald, B.A., 2015. Fitness cost of resistance: impact on management, in: Ishii, H., Hollomon, D.W. (Eds.), *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*. Springer Japan, pp. 77–89. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8_6)

Mirzadi Gohari, A., Mehrabi, R., Robert, O., Ince, I.A., Boeren, S., Schuster, M., Steinberg, G., Wit, P.J., Kema, G.H., 2014. Molecular characterization and functional analyses of ZtWor1, a transcriptional regulator of the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Molecular plant pathology* 15, 394–405.

Montarry, J., Corbiere, R., Andrivon, D., 2007. Is there a trade-off between aggressiveness and overwinter survival in *Phytophthora infestans*? *Functional Ecology* 21, 603–610.

Morais, D., Laval, V., Sache, I., Suffert, F., 2015. Comparative pathogenicity of sexual and asexual spores of *Zymoseptoria tritici* (septoria tritici blotch) on wheat leaves. *Plant Pathology* 64, 1429–1439.

Mouël, C.L., Schmitt, B., 2017. *La dépendance alimentaire de l’Afrique du Nord et du Moyen-Orient à l’horizon 2050*. Editions Quae.

Mullins, J.G., Parker, J.E., Cools, H.J., Togawa, R.C., Lucas, J.A., Fraaije, B.A., Kelly, D.E., Kelly, S.L., 2011. Molecular modelling of the emergence of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS One* 6, e20973.





Mundt, C.C., Brophy, L.S., Schmitt, M.S., 1995. Choosing crop cultivars and cultivar mixtures under low versus high disease pressure: A case study with wheat. *Crop Protection* 14, 509–515. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(95\)00035-K](https://doi.org/10.1016/0261-2194(95)00035-K)

Murren, C.J., Auld, J.R., Callahan, H., Ghalambor, C.K., Handelsman, C.A., Heskell, M.A., Kingsolver, J.G., Maclean, H.J., Masel, J., Maughan, H., Pfennig, D.W., Relyea, R.A., Seiter, S., Snell-Rood, E., Steiner, U.K., Schlichting, C.D., 2015. Constraints on the evolution of phenotypic plasticity: limits and costs of phenotype and plasticity. *Heredity* 115, 293–301. <https://doi.org/10.1038/hdy.2015.8>

~ N ~

Niu, Y., Yuan, Y., Mao, J., Yang, Z., Cao, Q., Zhang, T., Wang, S., Liu, D., 2018. Characterization of two novel mycoviruses from *Penicillium digitatum* and the related fungicide resistance analysis. *Sci Rep* 8, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23807-3>

Nopsa, J.F.H., Pfender, W.F., 2014. A Latent Period Duration Model for Wheat Stem Rust. *Plant Disease* 98, 1358–1363. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-13-1128-RE>

Norros, V., Rannik, U., Hussein, T., Petaja, T., Vesala, T., Ovaskainen, O., 2014. Do small spores disperse further than large spores? *Ecology* 95, 1612–1621.

Nosanchuk, J.D., Casadevall, A., 2006. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3519–3528. <https://doi.org/10.1128/AAC.00545-06>

Nuismer, S.L., Gandon, S., 2008. Moving beyond common-garden and transplant designs: insight into the causes of local adaptation in species interactions. *Am. Nat.* 171, 658–668. <https://doi.org/10.1086/587077>

~ O ~

O’Callaghan, J.R., Dahab, M.H., Hossain, A.H.M.S., Wyseure, G.C.L., 1994. Simulation of *Septoria tritici*—winter wheat interactions. *Computers and Electronics in Agriculture, Solar Driven Computational Plant Models* 11, 309–321. [https://doi.org/10.1016/0168-1699\(94\)90022-1](https://doi.org/10.1016/0168-1699(94)90022-1)

O’Driscoll, A., Kildea, S., Doohan, F., Spink, J., Mullins, E., 2014. The wheat–*Septoria* conflict: a new front opening up? *Trends in plant science* 19, 602–610.



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, e00393-17. <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, 2805–2823.

Orr, H.A., 2009. Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nat Rev Genet* 10, 531–539. <https://doi.org/10.1038/nrg2603>

~ P ~

Palmer, C.-L., Skinner, W., 2002. *Mycosphaerella graminicola*: latent infection, crop devastation and genomics. *Mol. Plant Pathol.* 3, 63–70. <https://doi.org/10.1046/j.1464-6722.2002.00100.x>

Panadero, J., Pallotti, C., Rodríguez-Vargas, S., Randez-Gil, F., Prieto, J.A., 2006. A downshift in temperature activates the high osmolarity glycerol (HOG) pathway, which determines freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 281, 4638–4645. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512736200>

Parent, C., Capelli, N., Dat, J., 2008. Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. *C. r., biol* 331, 255–261.

Pariaud, B., Robert, C., Goyeau, H., Lannou, C., 2009. Aggressiveness components and adaptation to a host cultivar in wheat leaf rust. *Phytopathology* 99, 869–878. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-7-0869>

Parker, J.E., Warrilow, A.G.S., Cools, H.J., Martel, C.M., Nes, W.D., Fraaije, B.A., Lucas, J.A., Kelly, D.E., Kelly, S.L., 2011. Mechanism of binding of prothioconazole to *Mycosphaerella graminicola* CYP51 differs from that of other azole antifungals. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1460–1465. <https://doi.org/10.1128/AEM.01332-10>

Parker, J.E., Warrilow, A.G.S., Price, C.L., Mullins, J.G.L., Kelly, D.E., Kelly, S.L., 2014. Resistance to antifungals that target CYP51. *J Chem Biol* 7, 143–161. <https://doi.org/10.1007/s12154-014-0121-1>



Pearson, M.N., Beever, R.E., Boine, B., Arthur, K., 2009. Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 10, 115–128. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00503.x>

Peever, T.L., Milgroom, M.G., 1995. Fungicide Resistance—Lessons for Herbicide Resistance Management? *Weed Technology* 9, 840–849. <https://doi.org/10.1017/S0890037X00024313>

Ponomarenko, A., Goodwin, S.B., Kema, G.H.J., 2011. Septoria tritici blotch (STB) of wheat. *The Plant Health Instructor*.

Price, C.L., Parker, J.E., Warrilow, A.G., Kelly, D.E., Kelly, S.L., 2015. Azole fungicides—understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. *Pest management science* 71, 1054–1058.

~ Q ~

Quaedvlieg, W., Kema, G.H.J., Groenewald, J.Z., Verkley, G.J.M., Seifbarghi, S., Razavi, M., Gohari, A.M., Mehrabi, R., Crous, P.W., 2011. *Zymoseptoria* gen. nov.: a new genus to accommodate Septoria-like species occurring on graminicolous hosts. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 26, 57–69.

~ R ~

Ray, S., Anderson, J.M., Urmeev, F.I., Goodwin, S.B., 2003. Rapid induction of a protein disulfide isomerase and defense-related genes in wheat in response to the hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Mol Biol* 53, 741–754. <https://doi.org/10.1023/B:PLAN.0000019120.74610.52>

Reina-Pinto, J.J., Yephremov, A., 2009. Surface lipids and plant defenses. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 540–549. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.01.004>

Ritov, V.B., Menshikova, E.V., He, J., Ferrell, R.E., Goodpaster, B.H., Kelley, D.E., 2005. Deficiency of Subsarcolemmal Mitochondria in Obesity and Type 2 Diabetes. *Diabetes* 54, 8–14. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.1.8>



Robin, M.-H., 2013. Analyse et modélisation des effets des pratiques culturales et de la situation de production sur les dégâts causés par les bioagresseurs des cultures. Application au blé d'hiver [WWW Document]. URL <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00002650/> (accessed 11.22.19).

Roohparvar, R., Mehrabi, R., Nistelrooy, J.G.V., Zwiers, L.-H., Waard, M.A.D., 2008. The drug transporter *MgMfs1* can modulate sensitivity of field strains of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* to the strobilurin fungicide trifloxystrobin. *Pest Management Science* 64, 685–693. <https://doi.org/10.1002/ps.1569>

Ruan, R., Wang, M., Liu, X., Sun, X., Chung, K.-R., Li, H., 2017. Functional analysis of two sterol regulatory element binding proteins in *Penicillium digitatum*. *PLOS ONE* 12, e0176485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176485>

Rudd, J.J., Kanyuka, K., Hassani-Pak, K., Derbyshire, M., Andongabo, A., Devonshire, J., Lysenko, A., Saqi, M., Desai, N.M., Powers, S.J., others, 2015. Transcriptome and metabolite profiling of the infection cycle of *Zymoseptoria tritici* on wheat reveals a biphasic interaction with plant immunity involving differential pathogen chromosomal contributions and a variation on the hemibiotrophic lifestyle definition. *Plant physiology* 167, 1158–1185.

Russell, P.E., 2009. Fungicide dose rates and resistance development in *Mycosphaerella graminicola*: a spurious correlation or reasonable hypothesis? *Outlooks on Pest Management* 20, 194.

~ S ~

Sadeghi, H., Khazaei, F., Sheidaei, S., Yari, L., 2011. Effect of seed size on seed germination behavior of safflower. *ARNP Journal of Agriculture and Biological science* 6, 4.

Sahli, R., Rivière, C., Siah, A., Smaoui, A., Samaillie, J., Hennebelle, T., Roumy, V., Ksouri, R., Halama, P., Sahpaz, S., 2017. Biocontrol activity of effusol from the extremophile plant, *Juncus maritimus*, against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Environ Sci Pollut Res* 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9043-0>

Sánchez-Vallet, A., McDonald, M.C., Solomon, P.S., McDonald, B.A., 2015. Is *Zymoseptoria tritici* a hemibiotroph? *Fungal Genetics and Biology* 79, 29–32.



Sanderson, F.R., Hampton, J.G., 1978. Role of the perfect states in the epidemiology of the common Septoria diseases of wheat. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 21, 277–281. <https://doi.org/10.1080/00288233.1978.10427411>

Scalliet, G., Bowler, J., Luksch, T., Kirchhofer-Allan, L., Steinhauer, D., Ward, K., Niklaus, M., Verras, A., Csukai, M., Daina, A., 2012. Mutagenesis and functional studies with succinate dehydrogenase inhibitors in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS One* 7, e35429.

Schoustra, S.E., Debets, A.J.M., Slakhorst, M., Hoekstra, R.F., 2006. Reducing the cost of resistance; experimental evolution in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *J. Evol. Biol.* 19, 1115–1127. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2006.01102.x>

Schumacher, J., 2016. DHN melanin biosynthesis in the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea* is based on two developmentally regulated key enzyme (PKS)-encoding genes. *Molecular Microbiology* 99, 729–748. <https://doi.org/10.1111/mmi.13262>

Shetty, N.P., Jensen, J.D., Knudsen, A., Finnie, C., Geshi, N., Blennow, A., Collinge, D.B., Jørgensen, H.J.L., 2009. Effects of  $\beta$ -1, 3-glucan from *Septoria tritici* on structural defence responses in wheat. *Journal of experimental botany* 60, 4287–4300.

Shetty, N.P., Kristensen, B.K., Newman, M.-A., Møller, K., Gregersen, P.L., Jørgensen, H.J.L., 2003. Association of hydrogen peroxide with restriction of *Septoria tritici* in resistant wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62, 333–346. [https://doi.org/10.1016/S0885-5765\(03\)00079-1](https://doi.org/10.1016/S0885-5765(03)00079-1)

Shetty, N.P., Mehrabi, R., Lütken, H., Haldrup, A., Kema, G.H.J., Collinge, D.B., Jørgensen, H.J.L., 2007. Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat. *New Phytol.* 174, 637–647. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02026.x>

Siah, A., Bomble, M., Tisserant, B., Cadalen, T., Holvoet, M., Hilbert, J.-L., Halama, P., Reignault, P.L., 2018a. Genetic structure of *Zymoseptoria tritici* in northern France at region, field, plant and leaf layer scales. *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-17-0322-R>

Siah, A., Deweer, C., Morand, E., Reignault, P., Halama, P., 2010. Azoxystrobin resistance of French *Mycosphaerella graminicola* strains assessed by four in vitro bioassays and by screening of G143A substitution. *Crop Protection* 29, 737–743.



- Siah, A., Elbekali, A.Y., Ramdani, A., Reignault, P., Torriani, S.F.F., Brunner, P.C., Halama, P., 2014. Qol resistance and mitochondrial genetic structure of *Zymoseptoria tritici* in Morocco. *Plant Disease* 98, 1138–1144.
- Siah, A., Magnin-Robert, M., Randoux, B., Choma, C., Rivière, C., Halama, P., Reignault, P., 2018b. Natural agents inducing plant resistance against pests and diseases, in: Mérillon, J.-M., Riviere, C. (Eds.), *Natural Antimicrobial Agents, Sustainable Development and Biodiversity*. Springer International Publishing, Cham, pp. 121–159. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-67045-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-67045-4_6)
- Sidhu, G.S., 1975. Gene-for-gene relationships in plant parasitic systems. *Science Progress (1933- )* 62, 467–485.
- Sierotzki, H., Parisi, S., Steinfeld, U., Tenzer, I., Poirey, S., Gisi, U., 2000. Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome *bc1* enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. *Pest Management Science* 56, 833–841. [https://doi.org/10.1002/1526-4998\(200010\)56:10<833::AID-PS200>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1526-4998(200010)56:10<833::AID-PS200>3.0.CO;2-Q)
- Simon, M.R., Cordo, C.A., 1997. Inheritance of partial resistance to *Septoria tritici* in wheat (*Triticum aestivum*): limitation of pycnidia and spore production. *Agronomie* 17, 343–347. <https://doi.org/10.1051/agro:19970605>
- Simón, M.R., Cordo, C.A., Castillo, N.S., Struik, P.C., Börner, A., 2012. Population structure of *Mycosphaerella graminicola* and location of genes for resistance to the pathogen: recent advances in Argentina. *International Journal of Agronomy* 2012.
- Simón, M.R., Cordo, C.A., Perelló, A.E., Struik, P.C., 2003. Influence of nitrogen supply on the susceptibility of wheat to *Septoria tritici*. *Journal of Phytopathology* 151, 283–289. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2003.00720.x>
- Stammler, G., Taher, K., Koch, A., Haber, J., Liebmann, B., Bouagila, A., Yahyaoui, A., Nasraoui, B., 2012. Sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* isolates from Tunisia to epoxiconazole and pyraclostrobin. *Crop Protection* 34, 32–36. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.11.007>
- Steinberg, G., 2015. Cell biology of *Zymoseptoria tritici*: Pathogen cell organization and wheat infection. *Fungal Genetics and Biology* 79, 17–23.
- Steinfeld, U., Sierotzki, H., Parisi, S., Poirey, S., Gisi, U., 2001. Sensitivity of mitochondrial respiration to different inhibitors in *Venturia inaequalis*.



Stergiopoulos, I., Gielkens, M.M.C., Goodall, S.D., Venema, K., Zwijs, L.H., Waard, M.A.D., 2001. Functional analysis of ABC transporters in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. Book of Abstracts 13th International Reinhardtsbrunn Symposium, Friedrichroda, Germany, 14-18 May 2001.

Stergiopoulos, I., Zwijs, L.-H., De Waard, M.A., 2003. The ABC transporter MgAtr4 is a virulence factor of *Mycosphaerella graminicola* that affects colonization of substomatal cavities in wheat leaves. *MPMI* 16, 689–698. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.8.689>

Stewart, E. I., Croll, D., Lendenmann, M.H., Sanchez-Vallet, A., Hartmann, F.E., Palma-Guerrero, J., Ma, X., McDonald, B.A., 2018. Quantitative trait locus mapping reveals complex genetic architecture of quantitative virulence in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Molecular Plant Pathology* 19, 201–216. <https://doi.org/10.1111/mpp.12515>

Stukenbrock, E.H., Bataillon, T., Dutheil, J.Y., Hansen, T.T., Li, R., Zala, M., McDonald, B.A., Wang, J., Schierup, M.H., 2011. The making of a new pathogen: insights from comparative population genomics of the domesticated wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* and its wild sister species. *Genome research* 21, 2157–2166.

Stukenbrock, E.H., McDonald, B.A., 2007. Geographical variation and positive diversifying selection in the host-specific toxin SnToxA. *Molecular Plant Pathology* 8, 321–332. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00396.x>

Suffert, F., Ravigné, V., Sèche, I., 2015. Seasonal changes drive short-term selection for fitness traits in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 6367–6379. <https://doi.org/10.1128/AEM.00529-15>

Suffert, F., Sèche, I., 2011. Relative importance of different types of inoculum to the establishment of *Mycosphaerella graminicola* in wheat crops in north-west Europe. *Plant Pathology* 60, 878–889.

Suffert, F., Sèche, I., Lannou, C., 2013. Assessment of quantitative traits of aggressiveness in *Mycosphaerella graminicola* on adult wheat plants. *Plant Pathology* 62, 1330–1341. <https://doi.org/10.1111/ppa.12050>

Suffert, F., Sèche, 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.



~ T ~

Taborda, C.P., da Silva, M.B., Nosanchuk, J.D., Travassos, L.R., 2008. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. *Mycopathologia* 165, 331–339. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9061-4>

Tanno, K.-I., Willcox, G., 2006. How fast was wild wheat domesticated? *Science* 311, 1886. <https://doi.org/10.1126/science.1124635>

Tiley, A.M.M., White, H.J., Foster, G.D., Bailey, A.M., 2019. The *ZtvelB* gene is required for vegetative growth and sporulation in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02210>

Torriani, S.F., Brunner, P.C., McDonald, B.A., Sierotzki, H., 2009. Qol resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science* 65, 155–162. <https://doi.org/10.1002/ps.1662>

~ V ~

Van den Bosch, F., Paveley, N., van den Berg, F., Hobbelen, P., Oliver, R., 2014. Mixtures as a fungicide resistance management tactic. *Phytopathology* 104, 1264–1273. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-14-0121-RVW>

Van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J., 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44, 135–162. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>

Verhage, A., van Wees, S.C.M., Pieterse, C.M.J., 2010. Plant immunity: it's the hormones talking, but what do they say? *Plant Physiol* 154, 536–540. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161570>

Vidhyasekaran, P., 2015. Plant hormone signaling systems in plant innate immunity, signaling and communication in plants. Springer Netherlands.

~ W ~

Walters, Newtons, Lyon, 2014. Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection | Wiley [WWW Document]. Wiley.com. URL <https://www.wiley.com/en-fr/Induced+Resistance+for+Plant+Defence%3A+A+Sustainable+Approach+to+Crop+Protection-p-9781405134477> (accessed 11.19.19).





Wanyera, R., Owuoche, J., 2017. Wheat improvement, management and utilization. BoD – Books on Demand.

Weiss, E., Zohary, D., Hopf, M., 2012. Domestication of plants in the old world - the origin and spread of domesticated plants in South-west Asia, Europe, and the Mediterranean basin.

Willger, S.D., Puttikamonkul, S., Kim, K.-H., Burritt, J.B., Grahl, N., Metzler, L.J., Barbuch, R., Bard, M., Lawrence, C.B., Cramer, R.A., 2008. A sterol-regulatory element binding protein is required for cell polarity, hypoxia adaptation, azole drug resistance, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* 4, e1000200. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000200>

Wong, F.P., Wilcox, W.F., 2000. Distribution of baseline sensitivities to Azoxystrobin among isolates of *Plasmopara viticola*. *plant disease* 84, 275–281. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.3.275>

Wood, P.M., Hollomon, D.W., 2003. A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of Complex III. *Pest Management Science* 59, 499–511. <https://doi.org/10.1002/ps.655>

~ Y ~

Yamashita, M., Fraaije, B., 2018. Non-target site SDHI resistance is present as standing genetic variation in field populations of *Zymoseptoria tritici*. *Pest Manag. Sci.* 74, 672–681. <https://doi.org/10.1002/ps.4761>

Yamori, W., Noguchi, K., Hikosaka, K., Terashima, I., 2010. Phenotypic plasticity in photosynthetic temperature acclimation among crop species with different cold tolerances. *Plant Physiol* 152, 388–399. <https://doi.org/10.1104/pp.109.145862>

Yang, F., Li, W., Jørgensen, H.J.L., 2013a. Transcriptional reprogramming of wheat and the hemibiotrophic pathogen *Septoria tritici* during two phases of the compatible interaction. *PLOS ONE* 8, e81606. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081606>

Yang, F., Melo-Braga, M.N., Larsen, M.R., Jørgensen, H.J.L., Palmisano, G., 2013b. Battle through signaling between wheat and the fungal pathogen *Septoria tritici* revealed by proteomics and phosphoproteomics. *Mol Cell Proteomics* 12, 2497–2508. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.027532>



~ Z ~

Zadoks, J.C., 2008. The potato murrain on the European continent and the revolutions of 1848. *Potato Research* 51, 5–45. <https://doi.org/10.1007/s11540-008-9091-4>

Zadoks, J.C., Chang, T.T., Konzak, C.F., 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* 14, 415–421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x>

Zhan, J., McDonald, B.A., 2011. Thermal adaptation in the fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Molecular ecology* 20, 1689–1701.

Zhan, J., Pettway, R.E., McDonald, B.A., 2003. The global genetic structure of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* is characterized by high nuclear diversity, low mitochondrial diversity, regular recombination, and gene flow. *Fungal Genetics and Biology* 38, 286–297. [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00538-8](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00538-8)

Zhan, J., Stefanato, F.L., McDonald, B.A., 2006. Selection for increased cyproconazole tolerance in *Mycosphaerella graminicola* through local adaptation and in response to host resistance. *Mol. Plant Pathol.* 7, 259–268. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00336.x>

Zhuk, I., G, L., Z, D., Dmitriev, A., 2014. The induction of *Triticum aestivum* L. tolerance to *Septoria Tritici* By Oxalic Acid. <https://doi.org/10.5281/zenodo.160461>

Ziogas, B.N., Malandrakis, A.A., 2015. Sterol Biosynthesis Inhibitors: C14 demethylation (DMIs), in: Ishii, H., Hollomon, D.W. (Eds.), *Fungicide resistance in plant pathogens: principles and a guide to practical management*. Springer Japan, Tokyo, pp. 199–216. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8\\_13](https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8_13)

Zipfel, C., 2014. Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol.* 35, 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.05.004>



**Annexes**



## ANNEXE 1 : MATERIELS ET METHODES

### Matériel biologique

#### Matériel fongique et modalités d'isolement

Les travaux de thèses se sont portés sur une collection de 240 souches de *Z. tritici* représentatives des populations actuelles du Nord de la France. La constitution d'une collection locale permet le choix de souches issues du même contexte agro-climatique qui ont été utilisées pour l'étude du *fitness* afin de s'affranchir de la variabilité liée aux conditions environnementales. Pour constituer la collection locale, des échantillonnages de feuilles de blé présentant des symptômes de septoriose ont été réalisés en juin 2016 sur deux sites expérimentaux situés à Lorgies et Tilloy-lès-mofflaines (Hauts de France).



**Figure 1.** Situation géographique des sites d'échantillonnage de Lorgies et de Tilloy-lès-Mofflaines. Un total de 240 souches de *Z. tritici* ont été isolées en 2016, soit 120 souches par sites (Modifié de Google Maps).

Quatre micro-parcelles de blé tendre (30 x 18 m) étaient présentes dans chaque site, dont deux semées avec la variété Bergamo et deux autres avec la variété Terroir. Les isolats proviennent de blé non traité et naturellement infectées par l'inoculum provenant de la région. Toutes les feuilles de blé ont été collectées de façon aléatoire sur différentes plantes séparées des unes des autres par au minimum 1 mètre de distance dans le but de diminuer la probabilité de sélection de clone issu de la reproduction asexuée.



Après les prélèvements foliaires effectués, les feuilles ont été mises en chambres humides pendant 48h à 20°C dans le but d'expulser le cirrhe des pycnides. Les spores contenues dans le cirrhe ont été ensuite prélevés à l'aide d'une loupe binoculaire et d'une aiguille stérile puis mis en suspension dans un tube à hémolyse contenant 1mL d'eau stérile. Les suspensions sporales ont été étalées sur boîte de Pétri contenant du milieu Potatoes Dextrose Agar (PDA) puis incubée pendant 4 jours à 20°C à l'obscurité. Les colonies de *Z. tritici* ont été identifiées, prélevé grâce à une oese stérile puis étalé de nouveau sur milieu PDA. Les souches monospores ont été ensuite placées dans des cryotubes puis placés au congélateur à -80°C.

La référence utilisée dans l'étude est la souche hollandaise IPO323 conservée dans la mycothèque du laboratoire (Kema et Silfhout, 1997).

### **Matériels végétaux**

Pour les tests *in planta*, deux variétés de blé tendre (*Triticum aestivum* L.) ont été retenues : Alixan (Limagrain) et Rubisko (RAGT). Ces cultivars présentent des degrés de sensibilités différents à la septoriose, respectivement : sensible (référence du laboratoire) et assez sensible (Fiche variété, ARVALIS, 2019).



## Caractérisation des mating-types et du polymorphisme génétique

### Extraction d'ADN de *Z. tritici*

Les 240 souches ont été repiquées sur milieu PDA puis incubées à 20°C à la lumière pendant 6 jours. Pour réaliser l'extraction d'ADN, 50 mg de cirrhes ont été récoltés et mis en suspension dans 300 µL d'eau ultra-pure. Une lyse du champignon durant 20 min a été faite par le biais de l'utilisation d'un sonificateur Elmasonic S30 (Elma). La séparation des acides nucléiques des protéines et des débris cellulaires a été réalisée par ajout de 600 µL de phénolchloroforme. Après une centrifugation de 4 min à 18000g, la phase aqueuse a été récupérée et transférée dans un nouveau tube. Deux lavages successifs ont été réalisés en ajoutant 450 µL de chloroforme et en centrifugeant à 18000g pendant 3 min. La phase aqueuse a été récupérée une nouvelle fois afin de précipiter l'ADN sur la nuit, à -20°C, après ajout de 15 µL de NaCl et 750 µL d'éthanol absolu. À la suite de cette étape, un lavage avec 750 µL d'éthanol 70% a été réalisé après centrifugation à 21000g pendant 30min. Une dernière centrifugation à 21000g durant 15min et élimination du surnageant précède une dessiccation de chaque échantillon pendant 20 min. L'ADN a été remis en suspension dans 40 µL d'eau ultra pure, incubé 20 min à 37°C et dosé à 260 nm grâce à un spectrophotomètre Uvi light XS5 (Secomam). Les tubes d'ADN ont été ensuite conservés au congélateur à -20°C pour plus des analyses ultérieures

### Caractérisation des mating-types

Les *mating types* ont été déterminés par PCR multiplex. Combinant deux couples d'amorces, chacun d'entre eux étant spécifique d'un type sexuel et permettant d'amplifier des séquences partielles des deux idiomorphe *mat1-1* et *mat1-2* (Waalwijk *et al.*, 2002). Les amorces utilisées pour amplifier un fragment de 340pb du locus *mat1-1* (numéro d'accès GenBank : AF440399) sont F (5'-CCGCTTCTGGCTTCTCGCACTG-3', située entre les nucléotides 5494 et 5517 et R (5'- TGGACACCATGGTGAGAGAACCT-3', situé entre les nucléotides 5812 et 5834. Pour le locus *mat 1-2* (numéro d'accès GenBank : AF440398), les amorces utilisées pour amplifier un fragment de 660pb sont : F (5'-GGCGCCTCCGAAGCAACT-3', situés entre les nucléotides 10048 et 10065 et R (5'-GATGCGTCTGGACTGGAG-3', situés entre les nucléotides 10685 et 10704).



Les PCR ont été réalisées dans un volume final de 50  $\mu\text{L}$  contenant 10 ng d'ADN, 50 mM de KCl et 10 mM de Tris-HCl, 4 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM de chaque dNTP, 0.05  $\mu\text{M}$  de chacune des 4 amorces et 0.07 unités de Taq DNA polymerase (Fisher Scientific). Les amplifications se sont déroulées selon les conditions suivantes : une étape initiale de dénaturation à 94°C pendant 10 min puis 40 cycles composés d'une dénaturation 1 min à 94°C, une hybridation 30s à 62°C et une élongation 1 min à 72°C. L'amplification s'est terminée par une étape finale d'élongation de 10 min à 72°C.

Les résultats d'amplifications ont été visualisés sur gel d'agarose 1.5% en utilisant le marqueur de taille DNA Molecular Weight Marker XIV (Roche) pour estimer la taille des amplicons obtenus. La révélation sous UV a été possible par l'ajout de GelRed™ (Interchim) lors de la conception du gel.

### **Analyse de la variabilité génétique des marqueurs microsatellites**

Huit marqueurs microsatellites ont été sélectionnés en tenant compte des précédents travaux réalisés par Owen *et al.*, 1998 et Goodwin *et al.*, 2007. Les réactions PCR ont été réalisées dans un volume final de 20  $\mu\text{L}$  contenant approximativement 4 ng d'ADN, 50 mM de KCl et 10 mM de Tris-HCl, 4 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM de chaque dNTP, 0.05  $\mu\text{M}$  de chaque amorce et 0.03 unités de Taq DNA polymerase (Fisher Scientific). Pour permettre une révélation via électrophorèse capillaire, les amorces antisens (R) de chaque couple ont été marquées en 3' avec un fluorochrome 6-Fam (bleu) ou Hex (vert).

Les réactions PCR ont été réalisées selon les conditions suivantes : étape initiale de dénaturation à 94°C pendant 10 min puis 40 cycles composés d'une dénaturation 1 min à 94°C, une hybridation de 30s à 58 ou 65°C en fonction du couple d'amorces (tableau 1) et une élongation 1 min à 72°C. Une étape d'élongation de 10 min à 72°C met fin à la PCR. Les produits d'amplification ont ensuite été couplés deux à deux, pour chaque souche, comme indiqué dans le tableau 1. Pour chaque mélange réalisé, 1  $\mu\text{L}$  de mix a été couplé à 10  $\mu\text{L}$  de formamide (Sigma-Aldrich) et 0,15  $\mu\text{L}$  de marqueur de taille Genescan™ 500 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems). Une étape de dénaturation à 94°C pendant 10 min a précédé la migration électrophorétique des échantillons effectuée sur séquenceur capillaire 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) à 60°C et 1.8 kV.



**Tableau 4.** Séquences des amorces utilisées pour la détermination des huit microsattellites pour l'analyse de la population de *Z. tritici*.

Multiplex	Marqueur	Séquences des amorces (sens 5'-3')	Température d'hybridation	Fluorochrome
1	ST1A4F	GGTTCGATGGAGAGATT	58°C	Hex
	ST1A4R	TCACCTCCTCATCGCAGA		
	ST1E3F	GTTCCGCCGGTCGAAGTCG	65°C	6-fam
	ST1E3R	GCCAAGGCACTCGCTGCTCC		
2	ST1D7F	ATCTCCATTCACACTACTGCAT	65°C	6-fam
	ST1D7R	TGTGGAACAGGAATAGGCTTG		
	ST1E7F	GATCTCGAGCAGGGCGGAAGT	65°C	Hex
	ST1E7R	TCACACGCTGGTCTCTGAATC		
3	ST2C10F	AGGCGAGAACTTGCTTGACG	58°C	6-fam
	ST2C10R	AATGAACGTCCCATGGACGTG		
	ST1G7F	ATGCTGAGAAGTTCGGTGAGG	65°C	Hex
	ST1G7R	CGTTCTCCACCTCCAACACT		
4	ST2E4F	GAAGATCAACAGCATGGGCGG	58°C	Hex
	ST2E4R	CTCCAGAGGGATCACAAAGGC		
	AC0007F	TGCTCGCAAGACATAAAACG	58°C	6-fam
	AC0007R	CTCTAGCATTGGTGGTCGGTGG		

L'analyse a été réalisée grâce aux logiciels Genescan® (Applied Biosystems) et Genotyper™. (Applied Biosystems). Respectivement, ils permettent de standardiser les données par rapport au marqueur de taille et de transformer les données standardisées en données alléliques utilisables pour l'exploitation des résultats via le logiciel Popgene V1.32.

### Evaluation génotypique et phénotypique de la résistance aux IDM

#### Séquençage du gène *cyp51*

Afin d'estimer la variabilité génétique associée au gène de la 14 $\alpha$ -déméthylase (cible des IDM), 100 souches également répartie sur les sites de Lorgies (50) et de Tilloy-les-Mofflaines (50), ont été séquencées. Après la réalisation au préalable des extractions d'ADN des souches, les amplifications par PCR de *cyp51* se sont déroulées en quatre étapes distinctes selon les amorces utilisées par Leroux et al., (2007) (tableau 2).





**Tableau 5.** Séquences utilisées pour le séquençage du gène *cyp51*, fragmenté en quatre parties selon les amorces de Leroux *et al.* (2007).

Partie amplifiée	Couples d'amorces	Séquences des amorces (sens 5'-3')	Température d'hybridation	Taille des amplicons
CYPA	CYP1F CYP2R	GAACAGCGTGTGTGAGAGC GCGTTGACGTCCTCAGTTT	58°C	564pb
CYPB	CYP3F CYP4R	CTGCTCCCAAAGAAGACGAC TCTTCTCTGCGCATAATCG	55°C	555pb
CYPC	CYP5F CYP6R	GGGATTCACACCGATCAACT AGTTTCGAGAGGTTGGCGTA	55°C	614pb
CYPD	AF BR	CACTCTTCATCTGCGACCGAGTC CTGCTGTAATCCGTACCCACCAC	62°C	622pb

Chaque réaction d'amplification a été réalisée dans un volume final de 50 µL contenant 10 ng d'ADN, 50 mM de KCl et 10 mM de Tris-HCl, 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de chaque dNTP, 0.5 µM de chaque amorce ainsi que 0.03 unités de Taq DNA polymerase (Fisher Scientific). Les PCR ont été réalisées suivant le protocole suivant : une première dénaturation à 94°C pendant 10 min suivie de 35 cycles composés d'une dénaturation 1 min à 94°C, une hybridation de 1 min et une élongation 1 min à 72°C. Les températures d'hybridation varient en fonction des amorces utilisées : elles sont de 58°C pour CYP A, de 55°C pour CYP B et CYP C et de 62°C pour CYP D. La PCR se termine par une étape d'élongation de 10 min à 72°C.

Les produits amplifiés ont été envoyés à la plateforme de séquençage du Génoscope (Evry, France). Pour chaque fragment, 10 µL d'amplicons ainsi que les amorces correspondantes ont été fournis. La réaction de séquençage a été réalisée sur séquenceur capillaire ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystem) suivant une méthode SANGER « paired end » visant à séquencer les fragments à partir de chaque extrémité de l'amplicon.

#### ***Evaluation de la résistance aux IDM en milieu liquide***

Pour les 100 souches, l'expérience a été réalisée en microplaques 96 puits pour cinq molécules IDM différentes : l'époxiconazole, le metconazole, le tébuconazole, le prothioconazole-desthio et le prochloraz Pestanal® (Sigma). La souche IPO323 a également été ajoutée à l'étude comme référence sensible à tous les fongicides testés (numéro d'accension GenBank : GCA\_000219625.1).



Les essais ont été réalisés suivant la méthode utilisée par Siah *et al.* (2010). Brièvement, les fongicides sont mis en solution dans 200µL de dimethyl sulfoxide (DMSO ; Merk) puis ajouté dans du milieu de type glucose-peptone composé de 14.3g.L<sup>-1</sup> de dextrose (VWR), 7.1g.L<sup>-1</sup> de bactopeptone (Difco Laboratories) et 1.4g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure (Merk). Des dilutions en cascades des solutions mères sont ensuite réalisées dans le but d'obtenir une concentration de 75, 25, 8.33, 2.78, 0.93, 0.31, 0.10, and 0.03 mg.L<sup>-1</sup> dans un volume final de 200µL. Chaque puits contiendra un volume de 150µL de milieu amendé et un volume d'inoculum de 50µL amené à une concentration de 2.10<sup>5</sup> spores.mL<sup>-1</sup>. Quatre puits ont été utilisés en tant que réplica pour chaque dilution d'une matière active. Les plaques ont été mises à incubation à 20°C, à l'abri de la lumière et sous agitation à 140 rpm. Après 6 jours la croissance fongique a été mesurée à 405 nm avec un lecteur de microplaques (Biotek El808). Les concentrations inhibitrices médianes (CI<sub>50</sub>) ont été déterminées pour chaque souche et chaque molécule active grâce au logiciel XLSTAT© (2017 Addinsoft). Les facteurs de résistances moyens ont ensuite été calculés comme étant le ratio : FR = CI<sub>50</sub> souche testée / CI<sub>50</sub> souche référence (dans cette étude, IPO323).

#### **Détection des inserts impliqués dans la surexpression de *cyp51* et du phénotype MDR**

L'insert de 120pb associée à la surexpression de *cyp51* a été détecté lors du séquençage du gène *cyp51*. En effet, l'amplification du gène a débuté à la position -207pb (zone promotrice) et l'insert se situe à la position -83pb (Cools *et al.*, 2012). Toutes les séquences ont été analysées via BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) contre la séquence de l'insert indiqué dans l'article de Cools *et al.* (2012).

L'amplification du promoteur de *MgMSF1* a été réalisée grâce aux amorces décrite par Yamashita et Fraaije (2017). Les séquences sont F (5'-AAGGTAGGTGAACACCTTATACTC-3') et R (5'-TTCTTGCTGAAGAAGCGCATGGTTGT-3'). Les réactions d'amplifications ont été réalisées dans un volume final de 50 µL contenant 10 ng d'ADN, 50 mM de KCl et 10 mM de Tris-HCl, 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de chaque dNTP, 0.5 µM de chaque amorce ainsi que 0.03 unités de Taq DNA polymerase (Fisher Scientific). Le programme PCR a été le suivant : dénaturation à 94°C pendant 10 min suivie de 35 cycles composés d'une dénaturation 1 min à 94°C, une hybridation de 30s à 58°C et une élongation 1 min à 72°C. Une étape d'élongation de 10 min à 72°C clôture le programme. Les fragments obtenus ont été révélés grâce à une électrophorèse via un gel d'agarose à 1.5% additionné de GelRed™ (Interchim). Selon la présence ou l'absence d'insert, les amplicons ont présentés deux tailles : une de 490pb correspondant à l'absence d'insert et une de 1009pb correspondant à un fragment contenant l'insert impliqué dans la surexpression.



### **Modélisation structurale, docking et dynamique de CYP51**

Un modèle structural analogue à CYP51 a été construit à partir de la lanostérol 14-alpha déméthylase de *Saccharomyces cerevisiae*. Le set de donnée crystallographique est le 4LXJ (Monk BC). La région de l'hème du modèle 4LXJ a été transférée au modèle de CYP51 en optimant la géométrie. Trois étapes ont composé cette partie : un contrôle des chaînes latérales en conservant la structure et la rigidité de l'hème réalisée avec 1000 étapes (steepest descent ?), un gradient de 500 étapes sans contrainte jusqu'à 0.5Kcal/mol/Å sans contrainte résiduels au niveau de la structure et une minimisation énergétique en 1000 étapes avec un gradient conjugué. Le modèle a été contrôlé pour détecter les incohérences dans les torsions et la chiralité au niveau de la structure ainsi que pour l'orientation des chaînes latérales. La structure finale a été évalué avec Silicon Graphics octane 2 workstation, un package du logiciel de modélisation Sybyl 6.9.2 associés à Tripos pour le champ de force du modèle. Les résidus ont été mutés avec l'outil monomère mutant dans Sybyl et en cas de chocs stériques, la structure mutante a été minimisée comme décrit précédemment. Les modèles de type sauvage et de type mutants résultants étaient les entrées d'un protocole de dynamique moléculaire exécuté sous GROMACS (Beredsen), utilisant le champ de force gromos54a7 et spc water et fonctionnant sur un poste de travail quadricore Dell Precision T1700. Le protocole était le suivant : d'abord une optimisation du système solvaté et neutralisé avec 40K étape de 0.001 fs de descente suivie de 40K pas de 0.0001 fs de gradient conjugué, puis un équilibrage du système avec 100 ps de NVT et 300 ps de NPT et enfin 4 productions indépendantes en série de 10 ns. L'analyse des dynamiques a été faite avec les outils fournis dans le package GROMACS et les analyses complémentaires et illustrations avec UCSF Chimera 1.13.1. Les résultats ont été exprimés sous forme d'écart quadratique moyen de la racine (EQMR), montrant la différence entre la protéine entière et sa conformation initiale dans le temps et la fluctuation quadratique moyenne de la racine (EQMR), exprimant le mouvement individuel du résidu pendant la simulation. Des études d'amarrage ont été réalisées avec GOLD (Jones), le site de liaison étant défini comme une sphère de 7 Å autour du lanostérol extrait de 4LXJ, profitant de la conservation de la position de l'hème. Au total, 30 solutions ont été générées et classées à l'aide de ChemScore. Une sélection supplémentaire a été effectuée en jugeant la cohérence de la solution la mieux notée par une inspection visuelle de ses interactions et de la superposition globale des 30 solutions.



## ***Fitness des souches de Z. tritici in planta***

### ***Sélection, culture et préparation de l'inoculum des souches***

Un total de 50 souches a été sélectionné selon le critère des résistances aux IDM. La répartition des souches selon leurs  $CI_{50}$  pour les cinq matières actives. Les souches ont été mises en culture sur milieu PDA puis incubées à 20°C pendant 6 jours à la lumière. Les boîtes ont été rincées avec 10mL d'eau stérile sous hotte à flux laminaire horizontale et les suspensions sporale ont été transférées dans des tubes stériles. La concentration de la suspension sporale a été déterminée sous microscope à l'aide d'une cellule de Malassez.

### ***Culture et croissance du matériel végétal***

Une pré-germination des semences de la variété Alixan et Rubisko est effectuée dans des boîtes plastique carrée de 12x12cm. Après ensemencement sur du papier filtre humidifié, les boîtes sont stockées à l'obscurité pendant 24h à 20°C, puis 48h à 4°C et 24h à 20°C. Les graines germées sont ensuite plantées dans des pots contenant du terreau universel (Gammvert©) à raison de 12 graines par pot. Pour chaque condition, trois pots sont utilisés, soit 36 plants de blé. La croissance des plants de blé a été réalisée en serre semi-contrôlée pendant 3 semaines suivant une photopériode de 16h/8h avec une température de 20°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ).

### ***Inoculation des plantes***

Après 3 semaines de croissance, les plantules de blé au stade 3 feuilles ont été inoculées avec *Z. tritici* grâce à une suspension sporale à  $10^6$  spores.mL<sup>-1</sup> mélangé avec du polyoxythylène-sorbitan monolaurate (Tween 20, Sigma Aldrich) à 0.05% pour une meilleure adhésion sur feuille. Pour chaque pot, 30mL de solution sporales ont été inoculé par un pulvérisateur manuel. La condition témoin non inoculés a été pulvérisée avec 30mL d'eau stérile additionné de 0.05% de Tween. Des sacs plastiques transparents ont été placés sur chaque pot pendant 72h post inoculation pour créer une atmosphère humide favorisant la germination des spores. Pour les expériences de compétitions, les deux souches ont été inoculées à une concentration de  $10^6$  spores.mL<sup>-1</sup> avec un volume de 50 :50 par souche.



### **Notation de la maladie**

A 21 jours post inoculation, des notations des symptômes (chlorose et nécrose) ont été effectués par notation visuelle de la 3<sup>ème</sup> feuille de chaque plante. Les symptômes ont été exprimés en pourcentage d'infection. La densité des pycnides est évaluée sur une échelle de 0 (absence de pycnide) à 5 (forte densité).

### **Taille des spores**

A 21 jours post inoculation, les 3<sup>ème</sup> feuilles les plus représentatives de la maladie ont été prélevées et placées en chambre humide pendant 48h. Trois répétitions sont faites par souche inoculée. Pour chaque feuille, un rinçage avec un volume de 2mL d'eau stérile a été réalisé. Les concentrations des suspensions sporales obtenues ont été déterminées grâce à l'usage de cellule de Malassez. Les spores ont été photographiées grâce à une caméra digitale (Digital camera, DXM1200C). Les tailles ont été déterminées grâce aux

### **Quantification des individus sporulant lors de co-inoculation**

Réalisé à 21 jours post inoculation, le réisolement des souches sporulantes s'est déroulé comme lors d'isolement de souche sur le terrain (cf paragraphe). Pour chaque combinaison, 10 souches ont été isolées de façon homogène sur cinq feuilles, soit 50 souches par combinaison. Les suspensions sporales sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant du PDA (Potatoes Dextrose Agar) et incubées à 20°C sous lumière. Après 6 jours de croissance, une seule colonie a été récupérée aléatoirement et étalée sur une nouvelle boîte de Pétri contenant du milieu PDA afin d'obtenir un seul individu sur chaque boîte de Pétri. Des extractions d'ADN ont été réalisées selon le protocole décrit (Siah *et al.* 2018). La caractérisation des isolats est réalisée par PCR multiplex, en se basant sur le mating-type.



## **Effet de la température sur la résistance aux IDM**

### ***Préparation des inoculums***

Un total de 60 souches a été mises en culture sur milieu PDA à 20°C à la lumière. Après 6 jours d'incubation, les souches ont été collectées par rinçage avec un volume de 10mL d'eau osmosée stérile. La suspension sporale a été ajustée à une concentration de  $5.10^5$  spore.mL<sup>-1</sup> après dénombrement sous microscope à l'aide d'une cellule de Malassez.

### ***Préparation des milieux enrichies en fongicide et conditions de culture***

Les fongicides testées ont été l'époxiconazole et le tébuconazole (Pestanal, Sigma) à des concentrations de 1 et 5 mg.L<sup>-1</sup>. Après la pesée, les composés ont été dissous dans 200µL de dimethylsulfoxyde (DMSO) et ajouté au milieu PDA autoclavés maintenu en surfusion à une température de 30-40°C. Un volume de 2mL du milieu témoin (PDA) et des milieux enrichis ont été coulés dans des plaques 12 puits (Greiner bio-one, GBO). Chaque puits a été inoculé avec un volume de 5µL de suspension sporale avec 4 répétitions pour chaque souche. Les plaques ont été incubées dans l'obscurité à 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C et 30°C pour toutes les conditions de milieu. Les diamètres de croissance fongique ont été mesurés manuellement à 7 et 14 jours après inoculation.

### **Traitement des données et analyses statistiques**

#### ***Caractérisation des mating-types et diversité génétique***

La significativité de la répartition des fréquences de chaque *mating-type* dans les populations a été estimée en utilisant un test du Chi<sup>2</sup> (XLSTAT© 2017 Addinsoft). Les données de diversité génétique associée aux marqueurs microsatellites ont été analysées avec le logiciel Popgene v1.32. L'indice de Nei caractérisant la diversité génique a été déterminé selon la méthode de Nei (1973). Les indices de différenciation génétique brut et corrigé en raison du faible nombre de populations analysées (GST et G'ST) ont été calculés selon les formules fournies par Meirmans et Hedrick (2011) pour déterminer s'il existe une structuration de la population. En parallèle, une analyse de variance moléculaire (AMOVA) a été réalisée pour estimer le degré de différenciation génétique entre, et au sein de, chaque population. Le flux de gènes (Nm) caractérisé par la formule  $Nm = 0.5(1 - G_{st})/G_{st}$  a également été estimé afin d'évaluer le taux de migration. Enfin, le déséquilibre gamétique a été calculé afin de déterminer



si l'association entre les allèles se fait de manière aléatoire lors de la reproduction (McDermott and McDonald, 1993) ; un résultat non significatif statistiquement ( $P \geq 0,05$ ) indique que la répartition de ceux-ci au sein de la population se fait de façon aléatoire. Toutes ces analyses ont également été réalisées avec le logiciel Popgene v1.32.

### **Evaluation génotypique et phénotypique de la résistance aux IDM**

Toutes les séquences de *cyp51* ont été analysées sur Chromas (<http://technelysium.com.au/wp/>) pour vérifier la qualité des signaux de fluorescence des nucléotides et couper les extrémités qui ne répondaient pas aux critères de qualité. Pour chaque individu, les quatre régions séquencées ont été concaténées grâce au logiciel CAP3 (<http://dova.prabi.fr/software/cap3>). Blastx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a permis la traduction des séquences nucléotidiques en protéines qui ont été ensuite alignées sur la séquence de référence IPO323 (référence : XM\_003851044.1) en utilisant le logiciel Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

La sensibilité aux IDM testés par plaque de microtitration a été déterminée par calcul des concentrations inhibitrices minimales ( $CI_{50}$ ). Le modèle utilisé se base sur une régression non linéaire du logiciel XLSTAT© (2017 Addinsoft). La représentation des  $CI_{50}$  sous forme de heatmap a été obtenue par l'utilisation du package heatmaply du logiciel R. Les résistances croisées entre les 5 IDM ont été obtenues par corrélation de Spearman selon le logiciel Graphpad Prism 8© (2018 GraphPad Software). Les corrélations entre les  $CI_{50}$  et les mating-types ont été obtenues grâce à un *t-test* de comparaison de moyenne selon XLSTAT© (2017 Addinsoft). L'analyse de raréfaction de la zone promotrice de *cyp51* et le réseau TCS ont été réalisés avec le logiciel (Clement *et al.*, 2002).

### **Fitness des souches de *Z.tritici* in planta**

Pour l'évaluation des symptômes (pourcentage d'infection et densité des pycnides) à 21 jpi, une ANOVA a été réalisée avec un test de Tuckey au risque  $\alpha = 5\%$  en utilisant le logiciel XLSTAT© (2017 Addinsoft). Les relations entre les composantes de l'agressivité ont été comparées à l'aide de l'analyse de corrélation de Pearson ( $\alpha = 5\%$ ). Les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel statistique ExcelStat (Addinsoft). Un test t d'une valeur p égale à 0,05 (logiciel XLSTAT©) a été réalisé entre le type mating-type et la composante de la condition physique (infection, densité des pycnides et spore de taille) ainsi que les concentrations minimales inhibitrices ( $CI_{50}$ ) pour cinq IDM (tébuconazole (TBZ), metconazole (MTZ), époxiconazole (EPZ), prothioconazole (PTZ) et prochloraz (PZ)). Le potentiel de sporulation des souches combinées a



été évalué en déterminant la fréquence des types d'accouplement. L'importance de la distribution de fréquence de chaque accouplement standard dans les populations a été estimée à l'aide d'un test  $\chi^2$  (logiciel XLSTAT©).

### **Effet de la température sur la résistance aux IDM**

Les diamètres mesurés ont été converti en surface suivant la formule  $S = d^2 \cdot \pi$ . Pour les colonies non homogènes, la conversion en surface a été réalisée suivant une échelle créée grâce au logiciel ImageJ. Les données ont été traitées via le logiciel XLSTAT© (2017 Addinsoft) pour déterminer les statistiques descriptives.

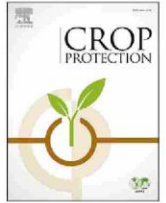




## ANNEXE 2 : SHORT COMMUNICATION

### Evolution of Qol resistance of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in Northern France

Dans le cadre de la détection de la résistance aux strobilurines dans la population du Nord de la France, ce travail a été réalisé principalement par l'équipe et s'est finalisée au début de la thèse. La résistance aux strobilurines pour la septoriose s'est vite répandue sur le terrain via la propagation de la mutation G143A dans le gène codant pour le *cytochrome c*, la cible des Qol. Cette substitution cause une résistance totale pour *Z. tritici*. Un suivi de la population a été effectué durant un intervalle de 10ans, entre 2005 et 2015. La résistance concerne 100% de la population en 2011 et semble se stabiliser autour des 99% jusqu'en 2015 (99.7% en 2012 et 99.6% en 2015). Cette étude suggère que la substitution G143A ne cause pas de pénalités sur la *fitness* des souches résistantes. La pression de sélection réalisées par Qol est toujours présente aux champs car ces molécules sont toujours utilisées dans le contrôle d'autres pathogènes fongiques. Cette stabilisation de la résistance a permis d'écarter l'étude de la résistance aux Qol dans la population étudiée dans l'ensemble de la thèse.



## Short communication

Evolution of QoI resistance of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in Northern FrancePénélope Cheval<sup>a</sup>, Ali Siah<sup>a</sup>, Myriam Bomble<sup>a</sup>, Azul D. Popper<sup>a</sup>, Philippe Reignault<sup>b</sup>, Patrice Halama<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Institut Supérieur d'Agriculture, Laboratoire Charles Viollette (EA 7394), 48 Bd Vauban, F-59046, Lille cedex, France<sup>b</sup> Université du Littoral Côte d'Opale, Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (EA 4492), CS 80699, F-62228, Calais cedex, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 26 April 2016

Received in revised form

14 September 2016

Accepted 28 October 2016

## Keywords:

Septoria tritici blotch

Wheat

Strobilurins

Fungicide resistance

G143A substitution

## ABSTRACT

Quinone outside Inhibitors (QoIs), also referred as strobilurins, have been widely used to manage *Zymoseptoria tritici*, the causal agent of Septoria tritici blotch of wheat. A few studies from the last decade reported the occurrence of QoI resistance in most European countries. However, no information is today available on the current distribution of such a resistance. A total of 828 single-conidial isolates collected between 2005 and 2015 years (65 in 2005, 32 in 2009, 166 in 2011, 337 in 2012 and 228 in 2015) were used to assess the evolution of *Z. tritici* QoI resistance in Northern France. The resistance was determined by screening the cytochrome *b* G143A substitution conferring QoI resistance, using a PCR-based mismatch mutation assay. The frequencies of resistant isolates increased from 83.1% in 2005 to 96.9% in 2009 and then reached almost 100% from 2009 to 2015 (100% in 2011, 99.7% in 2012 and 99.6% in 2015). Such a finding highlights a full and possibly irreversible widespread of *Z. tritici* QoI resistance in Northern France and indicates a lack of recent introduction of sensitive genotypes to this region from other areas, where *Z. tritici* QoI resistance has not emerged or is not widespread yet. Maintaining the use in the field, but in a reasoned manner, of other fungicide classes such as DMIs and SDHIs to manage *Z. tritici* is therefore still strongly justified.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Zymoseptoria tritici* (teleomorph: *Mycosphaerella graminicola*), responsible for Septoria tritici blotch, is currently one of the most damaging fungal pathogens on wheat crops worldwide. Severe disease epidemics can reduce wheat yields by 50% (Ponomarenko et al., 2011). In France, losses due to *Z. tritici* are estimated each year to 1.7 tons/hectare on average ([www.arvalis-infos.fr](http://www.arvalis-infos.fr)). The management of *Z. tritici* relies mainly on the use of fungicides since no wheat cultivar totally resistant to this pathogen is available. Benzimidazoles and demethylation inhibitors (DMIs) have been widely used against *Z. tritici* since the 1970s. After their introduction in 1996, Quinone outside Inhibitors (QoIs), also called strobilurins, were intensively used in the management of *Z. tritici*. QoI fungicides inhibit fungal growth by binding to the Quinone outside (Qo) binding site of the cytochrome *bc1* enzyme complex (ubiquinol oxidase), resulting in the blocking of electron transfer, ATP synthesis and mitochondrial respiration (Gisi et al., 2002).

As a result of their extensive use, *Z. tritici* quickly developed resistance to QoI fungicides in European populations (Fraaije et al., 2003). Similar to the majority of other fungi, resistance is conferred by a point mutation in the mitochondrial cytochrome *b* gene, giving rise to a substitution from glycine to alanine at position 143 (G143A) of the cytochrome *b* enzyme (Fraaije et al., 2003; Torriani et al., 2009; Siah et al., 2010a, 2014; Drabešová et al., 2013; Estep et al., 2013; Alloui et al., 2016). The isolates with such a substitution are characterized by very high levels of resistance when compared to sensitive wild-type isolates, agreeing with the disruptive mode of resistance known for single-site fungicides including QoIs (Fraaije et al., 2003; Siah et al., 2010a, 2014). G143A substitution prevents binding of QoI fungicides to the fungal Qo site, allowing mitochondrial respiration by the fungus despite the presence of the fungicide.

The first QoI-resistant *Z. tritici* isolates were detected in the United Kingdom in 2001 (Fraaije et al., 2003). Since then, the incidence of QoI-resistant isolates has been shown to be higher in northern Europe compared to the southern Europe. The incidence of resistance was higher in the North-European countries such as

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 28 38 46 20; fax: +33 3 28 38 48 47.

E-mail address: [patrice.halama@isa-lille.fr](mailto:patrice.halama@isa-lille.fr) (P. Halama).

Denmark, Republic of Ireland, United-Kingdom, Belgium, northern France and northern Germany (Amand et al., 2003; Gisi et al., 2005; McCartney et al., 2007; Leroux et al., 2006; Torriani et al., 2009; Siah et al., 2010a) when compared to the South-European areas such as southern France and southern Germany (Gisi et al., 2005; Leroux et al., 2006; Siah et al., 2010a). More recently, the presence at a low frequency of *Z. tritici* resistant isolates was reported in Italy (Battistini et al., 2016). Such a north-south gradient for resistance distribution was thought to be due to differences in the intensity of QoI use since disease pressure in the northern regions is overall higher than the southern ones (Torriani et al., 2009; Siah et al., 2010a). However, no precise data are available on the current frequencies of resistance within the fungal populations from such areas, although a widespread of resistance in north-western European countries and an absence or an occurrence with variable frequencies in north-eastern European countries were recently reported in published minutes from the Fungicide Resistance Action Committee ([http://www.frac.info/docs/default-source/qoi-wg/qoi-meeting-minutes/minutes-of-the-2015-qoi-meeting-recommendations-for-2016-\(april-2016\).pdf?sfvrsn=2](http://www.frac.info/docs/default-source/qoi-wg/qoi-meeting-minutes/minutes-of-the-2015-qoi-meeting-recommendations-for-2016-(april-2016).pdf?sfvrsn=2)). The aims of the present study were to assess the evolution of QoI resistance in *Z. tritici* populations of Northern France and to determine whether the resistance is still widespread or there was a shift in resistance frequency.

A total of 828 single-conidial isolates of *Z. tritici* were collected between 2005 and 2015 in northern France (Table 1) according to Siah et al. (2010b). The isolates were collected during the heading stage from naturally infected wheat leaves untreated with fungicides. All infected leaves were sampled randomly from different plants, separated each other by at least 1 m distance to avoid the occurrence of clones within fungal collections. Fungal isolation, isolate culture and DNA extraction were performed according to Siah et al. (2010b). The *Z. tritici* isolate IPO323 from the Netherlands (Kema and VanSijfhout, 1997) was used as sensitive reference isolate for validation of the used QoI-resistance screening method.

The sensitivities of the isolates to QoIs were determined using a mismatch amplification mutation assay on part of the cytochrome *b* gene (Ware, 2006; Siah et al., 2010a). Primer sets used to amplify a 639 bp DNA fragment in sensitive isolates and a 302 bp DNA fragment in resistant isolates were those described previously by Ware (2006) and Siah et al. (2010a; 2014). PCR reactions, PCR-thermal cycling conditions, agarose-gel electrophoresis and amplicon revelation were performed according to Siah et al. (2010a). Phenotypic confirmation of QoI sensitivity or resistance was performed for six selected isolates (three isolates with the G143 allele and three isolates with the A143 allele) in clear and sterile flat-bottomed polystyrene microplates (Iwaki, Asahi techno glass, Japan) according to Siah et al. (2010a). Ten different concentrations (100, 33, 11, 3.67, 1.22, 0.41, 0.14, 0.045, 0.015 and 0.005 mg/L) of azoxystrobin (Sigma Aldrich) and eight replicates (eight wells) per each concentration/isolate combination were used. For each isolate, 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) was determined using the GraphPad Prism 7 software (Hearne Scientific Software).

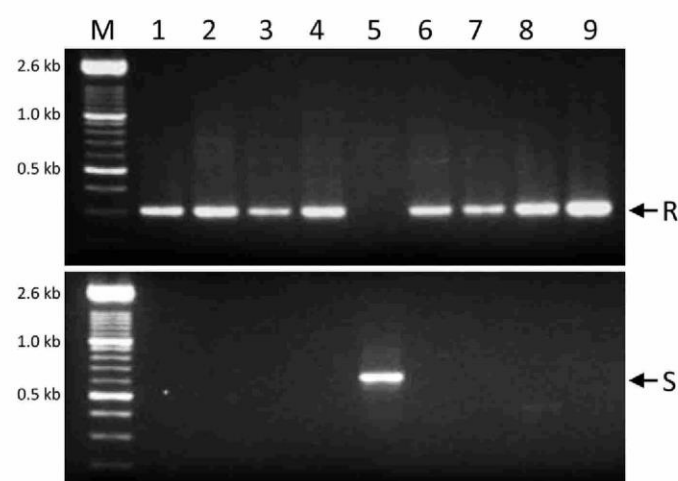
**Table 1**  
Number of isolates of *Zymoseptoria tritici* used in this study and their origin.

Region	Location	Year of isolation	Number of isolates
Nord-Pas de Calais	La Chapelle-d'Armentières	2005	65
	Vieille-Eglise	2009	32
	Vieille-Eglise	2011	166
	Tilloy-les-Mofflaines	2012	260
Lorgies	Lorgies		77
	Tilloy-les-Mofflaines	2015	115
	Lorgies		113

Results revealed that all sensitive (including the sensitive reference isolate IPO323) and resistant *Z. tritici* isolates possessing either the G143 or A143 allele, respectively, generated single amplicons of the expected sizes (Fig. 1). Among the 65 isolates sampled in 2005, 54 (83.1%) were resistant and only 11 (16.9%) were sensitive. Regarding the isolates collected in the other years, all of them were resistant, except three isolates (T01035 isolated in 2009 from Vieille-Eglise, T02176 isolated in 2012 from Tilloy-les-Mofflaines, and T05096 isolated in 2015 also from Tilloy-les-Mofflaines) which were sensitive. The sensitivity of these isolates was confirmed with the phenotypic assay since they displayed very low IC<sub>50</sub> values to azoxystrobin (0.18, 0.12 and 0.09 mg/L, respectively) compared to IC<sub>50</sub> values (>100 mg/L) found for three resistant isolates sampled in same years and locations (T01048 isolated in 2009 from Vieille-Eglise, T02185 isolated in 2012 from Tilloy-les-Mofflaines, and T05078 isolated in 2015 also from Tilloy-les-Mofflaines). Overall, the frequencies of resistant isolates remained very high during the recent years (96.9% in 2009, 100% in 2011, 99.7% in 2012 and 99.6% in 2015).

These findings indicate that *Z. tritici* QoI resistance is still widespread in Northern France and report a long-term stabilization of resistance within the Northern French populations, at least since 2011. Indeed, a high frequency of resistance (83.1%) was detected in 2005 and then resistance frequencies stabilized near 100% by 2011. The widespread of resistance within the population was likely due to selection in the field of resistant isolates under fungicide use regime. In Europe, the rapid increase of QoI resistance in *Z. tritici* was explained by multiple (at least four times) and independent emergence events of resistance among fungal populations, leading to an increase in resistance frequency owing to strong fungicide selection and spread eastward through wind dispersal of ascospores (Torriani et al., 2009).

As a consequence of the widespread resistance, resulting in the failure of disease management, in conjunction with launching next generation succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI) fungicides, the use of QoIs against *Z. tritici* was stopped in most north-western European countries by the end of the last decade. In France, QoIs were withdrawn from the list of market of fungicides registered for the management of *Z. tritici* by 2010, although they are still infrequently used to manage other wheat diseases such as rusts (less



**Fig. 1.** Mismatch amplification mutation assay on a part of the cytochrome *b* gene to determine the G143 or A143 allele in nine French *Zymoseptoria tritici* isolates sampled in 2015. Resistant isolates carrying the A143 allele (lines 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9) generated an amplicon of 302 bp (according to the cytochrome *b* sequence of the reference isolate IPO323). The sensitive isolate carrying the G143 allele (line 5) generated an amplicon of 639 bp (according to the cytochrome *b* sequence of the reference isolate IPO323). Lane M, molecular size standard XIV (100-bp ladder).

frequent than *Septoria tritici* blotch). Our results indicate that such a reduction in QoI applications coupled with an absence of targeted use of QoIs against *Z. tritici* did not affect the frequencies of resistance, since no shift in resistance frequencies was observed since 2011. This could be supported by three hypotheses. First, no fitness penalty is associated with the G143A point mutation since it occurs with very high frequencies in the population despite QoI fungicides are not being used against *Z. tritici* within and around the sampled areas. Second, the stabilization in resistance frequencies could be boosted by an inadvertent selection pressure by QoI applications since these fungicides are still used on wheat against other pathogens. Third, the stabilization in resistance (close to 100%) since several years ago agrees with an absence of recent fungal genotype introduction to Northern France from south-eastern European areas where QoI-sensitive *Z. tritici* genotypes occur at significant frequencies, such as Italy (Battistini et al., 2016) and Czech Republic (Drabešová et al., 2013). Ascospore dispersal and gene flow in Europe actually follow a west-east direction, according to dominant wind directions (Torriani et al., 2009). A lack of recent gene flow between Europe and North Africa was also reported since only few QoI-resistant genotypes were detected in *Z. tritici* populations from Tunisia (2%), Algeria (2.5%) and Morocco (9%), while resistance was already widespread in Europe (Taher et al., 2014; Siah et al., 2014; Alliou et al., 2016). The lack of gene flow was attributed to the Mediterranean Sea separating Northern Africa from Europe, which may constitute a geographical barrier that prevents or limits ascospore dispersal between the two areas.

Regarding the three sensitive isolates we detected in 2009, 2012 and 2015, they could have two origins: they survived in areas with no QoI application (i.e. in untreated wheat fields, on secondary host plants or in the leaf canopy where they did not receive the full complement of fungicide application due to weed pressure or applicator error) or they could be introduced from other areas through air-borne ascospores, since *Z. tritici* ascospores may travel over spatial scales of up to 100 km (McDonald et al., 1999). Further analyses using highly polymorphic microsatellite markers would determine whether the three sensitive isolates emerged locally or they migrated from another area. Concerning other parts of the world, no QoI resistance has been reported to date in Asia such as Iran (Saidi et al., 2012), while a detection of QoI-resistant isolates of *Z. tritici* was recently reported in the USA (Estep et al., 2013).

In conclusion, this study reports a total and a stabilization of QoI resistance in *Z. tritici* populations of Northern France, hence suggesting a lack of recent introduction of sensitive genotypes to this region from other areas where QoI resistance is not yet widely spread. Maintaining the use, but in a reasoned manner (i.e. in combination), of other fungicide classes such as, DMIs, SDHIs and multisite fungicides to manage *Z. tritici*, is therefore still recommended.

## Acknowledgements

This research was supported by both ARCir (Actions de Recherche Concerté d'initiative régionale) and Dephy Expe programs from the Nord-Pas de Calais regional council, France.

## References

- Alliou, N., Siah, A., Brinis, L., Reignault, Ph., Halama, P., 2016. Identification of QoI-resistant genotypes of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in Algeria. *Phytopathol. Mediterr.* 55, 89–97.
- Amand, O., Calay, F., Coquillart, L., Legat, T., Bodson, B., Moreau, J.M., Maraite, H., 2003. First detection of resistance to QoI fungicides in *Mycosphaerella graminicola* on winter wheat in Belgium. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 68, 519–531.
- Battistini, G., Ciriani, A., Cavina, F., Prodi, A., Collina, M., 2016. Sensitivity of Italian *Zymoseptoria tritici* Strains to Strobilurins: Preliminary Results, 9th International Symposium on Septoria Diseases of Cereals, Paris, France.
- Drabešová, J., Ryšánek, P., Brunner, P., McDonald, B.A., Croll, D., 2013. Population genetic structure of *Mycosphaerella graminicola* and Quinone Outside Inhibitor (QoI) resistance in the Czech Republic. *Eur. J. Plant Pathol.* 135, 211–224.
- Estep, L.K., Zala, M., Anderson, N.P., Sackett, K.E., Flowers, M.D., McDonald, B.A., Mundt, C., 2013. First report of resistance to QoI fungicides in North American populations of *Zymoseptoria tritici*, causal agent of Septoria tritici blotch of wheat. *Plant Dis.* 97, 1511.
- Fraaije, B.A., Lucas, J.A., Clark, W.S., Burnett, F.J., 2003. QoI resistance development in populations of cereal pathogens in the UK. In: Proceedings of the BCPC International Congress, Crop Science and Technology. The British Crop Protection Council, Alton, Hampshire, UK, pp. 689–694.
- Gisi, U., Sierotzki, H., Cook, A., Mccaffery, A., 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Manag. Sci.* 58, 859–867.
- Gisi, U., Pavic, L., Stanger, C., Hugelshofer, U., Sierotzki, H., 2005. Dynamics of *Mycosphaerella graminicola* populations in response to selection by different fungicides. In: Dehne, H.W., Gisi, U., Kuck, K.H., Russell, P.E., Lyr, H. (Eds.), *Modern Fungicides and Antifungal Compounds IV*. BCPC, Alton, UK, pp. 73–80.
- Kema, G.H.J., VanSilfhout, C.H., 1997. Genetic variation for virulence and resistance in the wheat-*Mycosphaerella graminicola* pathosystem. III. Comparative seedling and adult plant experiments. *Phytopathology* 87, 266–272.
- Leroux, P., Walker, A.S., Albertini, C., Gredt, M., 2006. Resistance to fungicides in French populations of *Septoria tritici*, the causal agent of wheat leaf blotch. *Asp. Appl. Biol.* 78, 153–162.
- McCartney, C., Mercer, P.C., Cooke, L.R., Fraaije, B.A., 2007. Effects of a strobilurin-based spray programme on disease control, green leaf area, yield and development of fungicide-resistance in *Mycosphaerella graminicola* in Northern Ireland. *Crop Prot.* 26, 1272–1280.
- McDonald, B.A., Zhan, J., Yarden, O., Hogan, K., Garton, J., Pettway, R.E., 1999. The population genetics of *Mycosphaerella graminicola* and *Stagonospora nodorum*. In: Lucas, J.A., Bower, P., Anderson, H.M. (Eds.), *Septoria on Cereals: A Study of Pathosystems*. CABI Publishing, New York, pp. 44–69.
- Ponomarenko, A., Goodwin, S.B., Kema, G.H.J., 2011. Septoria tritici blotch (STB) of wheat. *Plant Health Instr.* <http://dx.doi.org/10.1094/PHI-I-2011-0407-01>.
- Saidi, A., Safaie, N., Palizi, P., 2012. Study on mating types and sensitivity to strobilurin fungicide in fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *J. Crop Prot.* 1, 271–277.
- Siah, A., Elbekali, A.Y., Ramdani, A., Reignault, P., Torriani, S.F.F., Brunner, P.C., Halama, P., 2014. QoI resistance and mitochondrial genetic structure of *Zymoseptoria tritici* in Morocco. *Plant Dis.* 98, 1138–1144.
- Siah, A., Deweer, C., Morand, E., Reignault, P., Halama, P., 2010a. Azoxystrobin resistance of French *Mycosphaerella graminicola* strains assessed by four *in vitro* bioassays and by screening of G143A substitution. *Crop Prot.* 29, 737–743.
- Siah, A., Tisserant, B., El Chartouni, L., Duyme, F., Deweer, C., Fichter, C., Sanssené, J., Durand, R., Reignault, P., Halama, P., 2010b. Mating type idiomorphs from a French population of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*: widespread equal distribution and low but distinct levels of molecular polymorphism. *Fungal Biol.* 114, 980–990.
- Taher, K., Graf, S., Fakhfakh, M.M., Salah, H.B.H., Yahyaoui, A., Rezgui, S., Nasraoui, B., Stammler, G., 2014. Sensitivity of *Zymoseptoria tritici* isolates from Tunisia to pyraclostrobin, fluxapyroxad, epoxiconazole, metconazole, prochloraz and tebuconazole. *J. Phytopathol.* 162, 442–448.
- Torriani, S.F.F., Brunner, P.C., McDonald, B.A., Sierotzki, H., 2009. QoI resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manag. Sci.* 65, 155–162.
- Ware, S.B., 2006. Aspects of sexual reproduction in *Mycosphaerella* species on wheat and barley: genetic studies on specificity, mapping and fungicide resistance. PhD Thesis. Wageningen University, The Netherlands, pp. 101–122.



## ANNEXE 3 : ARTICLE 4

### **Genetic Structure of *Zymoseptoria tritici* in Northern France at Region, Field, Plant, and Leaf Layer Scales**

La population étudiée durant la thèse a fait part d'analyses préliminaires dans le but de sélectionner des individus ayant un génotype unique. Ce choix s'est basé sur l'utilisation de huit marqueurs microsatellites polymorphiques pour étudier la diversité génétique des 240 souches composant la population. Les mating-types ont été également identifiées pour chaque souche selon la méthode de Siah *et al.* (2010). Auparavant, l'analyse des microsatellites se faisant grâce à la migration des marqueurs sur gel d'acrylamide, selon la méthode de El Chartouni *et al.*, (2011). Une des premières étapes de mon travail a été de mettre au point cette révélation par électrophorèse capillaire grâce à l'utilisation de primers marqués par des fluorochromes. Cette technique a permis d'établir un travail collaboratif entre les équipes ASQV d'Yncréa-Haut de France et l'université de Lille. L'étude de la population des 105 individus isolés composant l'échelle plante et étage foliaire m'a été confié et les premiers résultats ont été présentés sous forme de poster lors du 69<sup>ème</sup> International Symposium on Crop Protection (ISCP) à Gand (2017). Les résultats indiquent que *Z. tritici* possède une forte diversité génétique à toutes les échelles examinées. Les mating-type ont été détectés en proportion égale pour toutes les populations. À l'échelle de la plante et des étages foliaires, la distribution clonale reste faible, indiquant que les ascospores ont un rôle important dans les épidémies de septoriose. Un total de 6 clusters génétiques ont été identifiés en fonction de la localisation géographique des souches due probablement à l'adaptation locale aux différents climats.

# Genetic Structure of *Zymoseptoria tritici* in Northern France at Region, Field, Plant, and Leaf Layer Scales

Ali Siah, Myriam Bomble, Benoit Tisserant, Thierry Cadalen, Maxime Holvoet, Jean-Louis Hilbert, Patrice Halama, and Philippe Reignault\*

First, second, fourth, fifth, sixth, and seventh authors: Institut Charles Viollette (ICV-EA 7394), ISA, Université de Lille, SFR Condorcet FR CNRS 3417, 48 bd Vauban, BP 41290, F-59014 Lille Cedex, France; and third and eighth authors: Univ. Littoral Côte d'Opale, Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (UCEIV-EA 4492), SFR Condorcet FR CNRS 3417, CS 80699, F-62228, Calais Cedex, France.

Accepted for publication 9 April 2018.

## ABSTRACT

Population genetic structure of the worldwide-distributed wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* has been extensively studied at large geographical scales, but to a much less extent at small or local spatial scales. A total of 627 single-conidial fungal isolates were sampled from several locations in northern France (Hauts-de-France Region) to assess fungal genetic structure at region, field, plant, and leaf layer scales, using highly polymorphic microsatellite markers and mating type idiomorphs. Important and overall similar levels of both gene and genotype diversities (gene diversity values of  $\geq 0.44$  and haplotype frequencies of  $\geq 94\%$ ) were found at all the examined scales. Such rates of diversity are likely due to an active sexual recombination in the investigated areas, as revealed by equal proportions of the two mating types scored in all sampled populations. Interestingly, a rare occurrence of clones among lesions from a same leaf, as well as among leaves from different plant leaf layers (e.g., upper versus lower leaves), was highlighted, indicating that ascospores

contribute much more than expected to *Z. tritici* epidemics, compared with pycnidiospores. Population structure and analyses of molecular variance revealed significant genetic differentiation at the regional scale ( $G_{ST} = 0.23$ ) and, as expected, not at the other more local scales ( $G_{ST} \leq 0.01$ ). Further analyses using Bayesian and unweighted neighbor-joining statistical methods detected six genetic clusters within the regional population, overall distributed according to the locations from which the isolates were sampled. Neither clear directional relative migration linked to the geographical distribution of the locations, nor isolation by distance, were observed. Separate evolutionary trajectories caused by selection and adaptations to habitat heterogeneity could be the main forces shaping such structuration. This study provides new insights into the epidemiology and the genetic structure of *Z. tritici* at small local and, for the first time, at single plant and leaf layer scales. Such findings would be helpful in implementing effective control strategies.

*Septoria tritici* blotch (STB) caused by the heterothallic ascomycete fungus *Zymoseptoria tritici* (synonym *Mycosphaerella graminicola*) is one of the most devastating foliar diseases on wheat crops worldwide, especially in Europe (O'Driscoll et al. 2014). In France, losses due to STB are estimated each year to 1.7 tons per hectare on average, and yield reductions can reach 50% when environmental conditions are suitable for disease development (<https://www.arvalis-infos.fr/>). *Z. tritici* emerged as a host-specialized wheat pathogen around 10,000 years ago through host tracking, likely during the domestication of wheat in the Fertile Crescent (Stukenbrock and McDonald 2008). The pathogen was then globally dispersed, as a result of the expansion of wheat cultivation (Banke and McDonald 2005). Because of its economic importance, experimental amenability, and growing interest within scientist and agronomist communities, *Z. tritici* has arose as a model for the order Dothideales (Kema et al. 2008) and was ranked among the top 10 fungal pathogens in the area of molecular plant pathology (Dean et al. 2012). The nuclear genome of *Z. tritici* contains 21 chromosomes, including 13 core chromosomes and a set of eight

repeat-rich accessory chromosomes (Goodwin et al. 2011). *Z. tritici* undergoes both asexual and sexual reproductions in the field. Clonal multiplication occurs mainly during the wheat-growing season, by producing pycnidiospores that are dispersed locally by rain splash and physical contact. During the sexual stage, the pathogen produces, in each ascus, four couples of genetically distinct (with 4:4 mating type ratio) ascospores (Kema et al. 1996), which have the potential to be dispersed over long distances by wind. Ascospores contribute not only to primary initial infections of wheat in the autumn, but also to disease progression during the growing season since sexual reproduction in *Z. tritici* occurs usually throughout the whole year (Duvivier et al. 2013; Hunter et al. 1999). Host resistance against *Z. tritici* is not completely effective in most wheat cultivars. Therefore, disease control relies mainly of the use of conventional fungicides. Nonetheless, the durability of both chemical and genetic control strategies is regularly impacted in the field since *Z. tritici* frequently develops resistance to fungicides and circumvents host resistance (Cheval et al. 2017; Zhong et al. 2017). This is due to its high fitness degree resulting very likely from its frequent sexual reproduction and genetic recombination in the field (El Chartouni et al. 2011; Linde et al. 2002).

Knowledge of population genetic structure is especially useful for better understanding pathogen epidemiology and evolutionary potential. The importance of such information in devising more efficient control strategies against *Z. tritici* has recently been well reviewed (McDonald and Mundt 2016). Genetic structure refers to the patterns of genetic diversity within and between populations, resulting from the interactions among the major forces shaping pathogen evolution, including natural selection, mutation, genetic

\*Corresponding author: P. Reignault; E-mail: [philippe.reignault@univ-littoral.fr](mailto:philippe.reignault@univ-littoral.fr)

**Funding:** This research was conducted in the framework of both ARCir (Actions de Recherche Concertée d'initiative régionale) project supported by the Hauts-de-France Regional Council (France) and Dephy Expe Ecophyto project supported by the Hauts-de-France Regional Council and the Interdepartmental organization Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (France). It has been carried out in the framework of Alibiotech project, which is funded by the European Union, the French State, and the French Region of Hauts-de-France.

drift, recombination/mating, and migration (Milgroom 2015). In nature, all of these forces interact to determine the course of evolution of a pathogen and to generate the genetic structure of its populations, hence facilitating its adaptation to environmental changes and ecological niches. Usually, pathogens with a mixed reproduction system, a high potential for genotype flow, large effective population sizes, and high mutation rates pose a greatest risk of breaking down resistance genes than pathogens with strict asexual reproduction, low potential for gene flow, small effective population sizes, and low mutation rates (McDonald and Linde 2002).

*Z. tritici* has been intensively studied for genetic diversity and population structure over the three last decades, and findings provided important insight into the biology, epidemiology, and evolutionary history of the pathogen (McDonald and Mundt 2016). The investigations were performed using a wide range of molecular markers including mating type idiomorphs (Siah et al. 2010; Zhan et al. 2002), random amplified polymorphic DNA (Czembor and Arseniuk 1999), restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Linde et al. 2002), amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Abrinbana et al. 2010), and microsatellite markers (Gurung et al. 2011). Some studies examining the diversity and structure in *Z. tritici* populations using mitochondrial DNA-based markers were also undertaken (Siah et al. 2014; Torriani et al. 2011). More recently, a population genomic approach based on whole genome alignments to infer genomic structure and genome wide patterns of selection among isolates of *Z. tritici* was applied (Grandaubert et al. 2017). Most of these studies were set up to assess fungal genetic structure at the country scale or compared populations from different countries (Gurung et al. 2011; Zhan et al. 2003). Overall, these investigations reported high levels of genetic diversity, rates of population differentiation, and gene flow that vary depending on the sampled geographical area and/or the marker used (Abrinbana et al. 2010; El Chartouni et al. 2011; Grandaubert et al. 2017; Gurung et al. 2011; Linde et al. 2002). For instance, molecular profiling of worldwide *Z. tritici* collections using RFLP markers revealed a lack or little structure and very high gene flow between *Z. tritici* populations at the world scale (Zhan et al. 2003). On the other hand, more recent studies performed using microsatellite or AFLP markers showed significant levels of genetic differentiation in populations from countries such as Iran (Abrinbana et al. 2010), France (El Chartouni et al. 2011), and the United States (Gurung et al. 2011). In France, a characterization of *Z. tritici* population using microsatellite markers and sequences from two housekeeping genes (actin and  $\beta$ -tubulin) revealed population clustering into three genetic groups (El Chartouni et al. 2011). However, no significant investigation was conducted since then in France to decipher fungal population genetics at smaller scales, and reports on genetic structure of *Z. tritici* on more localized levels such as a single plant or plant leaf layers (e.g., upper versus lower leaves) are still lacking. This later aspect is of particular importance since it should provide new insights into the epidemiology of the pathogen. Moreover, investigations on the *Z. tritici* genetic diversity at the field level are limited and no study was performed at this scale since Linde et al. (2002), who used RFLP markers. The goal of the present study was thus to assess the *Z. tritici* population structure in northern France at different spatial scales (region, field, plant, and leaf layer), with a focus on the Hauts-de-France region. This major wheat-growing area of France was chosen because it is the most impacted region by *Z. tritici* epidemics due to its humid and mild climate suitable for wheat growing, but unfortunately also for STB infections. Population characterization was performed by measuring the patterns of both genetic diversity and population structure at each scale, using microsatellite markers. In addition, the potential of fungal sexual recombination was estimated by assessing the frequencies of two fungal mating types (MAT1-1 and MAT1-2) and linkage disequilibrium within populations.

## MATERIALS AND METHODS

**Fungal collection and isolation.** Six hundred twenty-seven single-conidial isolates of *Z. tritici* were collected in northern France, from the Hauts-de-France region (~12,414 km<sup>2</sup>). First, 282 isolates were sampled in June 2009 from 12 distinct geographic locations in different representative parts of the region in order to assess the genetic structure of the pathogen at the region scale. Distances between locations ranged from 16 km (locations 7 and 8) to 45 km (locations 3 and 12), with an average distance between locations of 67 km. In each location, the isolates were randomly collected in a single field from flag leaves of different plants 1 m apart to each other. Furthermore, a subset of 240 isolates were harvested in June 2016 from two fields of 200 m × 20 m each located in Lorgies and Tilloy-les-Mofflaines, respectively. In order to have a representative view of fungal populations within the fields, the isolates were sampled in each field from four plots of 30 m × 20 m each at 10 m apart. In each plot, 30 isolates were isolated from flag leaves of different plants 1 m apart to each other, leading to a collection of 120 isolates per field. Finally, 105 additional isolates were obtained in June 2012 from five plants 10 cm apart to each other in order to examine pathogen genetic structure at the plant and leaf layer scales (Fig. 1). On each leaf, the isolates were collected from different lesions. Only five isolates were obtained from the fourth leaf layer (four isolates from plant 1 and one isolate from plant 3) because of advanced leaf senescence that caused strong contaminations during fungal isolation procedure. All leaves were collected from untreated and naturally infected bread wheat plants, and isolates were obtained from the sampled leaves according to the fungal isolation procedure described by Siah et al. (2010). Once obtained, the isolates were grown on potatoes dextrose agar (PDA) medium and stored at -80°C for further analyses. All isolates from each investigated scale (region, field, plant, and leaf layer) will hereafter be referred to as a collection, and all isolates from each subscale within each collection (location, plot, single plant, or single leaf layer, respectively) will be referred to as a subcollection.

**DNA extraction, microsatellite fingerprinting, and mating type determination.** Genomic DNA was extracted from 2-week-old PDA-growing culture of each strain, according to Siah et al. (2010). All isolates were fingerprinted using eight microsatellite markers: ST1A4, ST2C10, ST1D7, ST1E3, ST2E4, ST1E7, ST1G7 (Owen et al. 1998), and AC0007 (Goodwin et al. 2007) (Table 1). These markers were chosen because they were found to be polymorphic in preliminary experiments. PCR reactions were performed in a 20- $\mu$ l reaction volume containing 0.05  $\mu$ l of each primer (20  $\mu$ M), 1.6  $\mu$ l of 2.5 mM dNTPs, 2  $\mu$ l of 10 $\times$  reaction buffer, 3.2  $\mu$ l of 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.20 U of Taq DNA polymerase (Ampli Taq Gold, Applied Biosystem, Roche), and 2  $\mu$ l of fungal DNA (1 ng/ $\mu$ l final DNA concentration). The amplifications were carried out using a Peltier thermal cycler (MJ Research) under the following temperature program: initial denaturation at 94°C for 10 min; followed by 40 cycles of 94°C for 1 min, 58°C or 65°C for 30 s (depending on the primer pair used), and 72°C for 1 min; with a final extension at 72°C for 10 min. After the final cycle, the samples were stored at 4°C for further investigations. Amplicons obtained from the 282 isolates obtained at the region scale were separated in a 6% urea-polyacrylamide gel on a vertical electrophoresis system according to El Chartouni et al. (2011), while PCR products from the 240 and 105 isolates collected at the field, plant, and leaf layer scales, respectively, were separated using capillary array electrophoresis. The separation was performed in multiplex after pooling the amplicons into four pools of two amplicons per pool (Table 1). Within each pool, the primer pair used to amplify each marker was labeled with a fluorescent dye (Applied Biosystems, CA) with either blue (6-FAM) or green (HEX) fluorochromes for a better resolution on the capillary system (Table 1). Mixtures were prepared by using 1  $\mu$ l of each pooled-PCR product mixed with

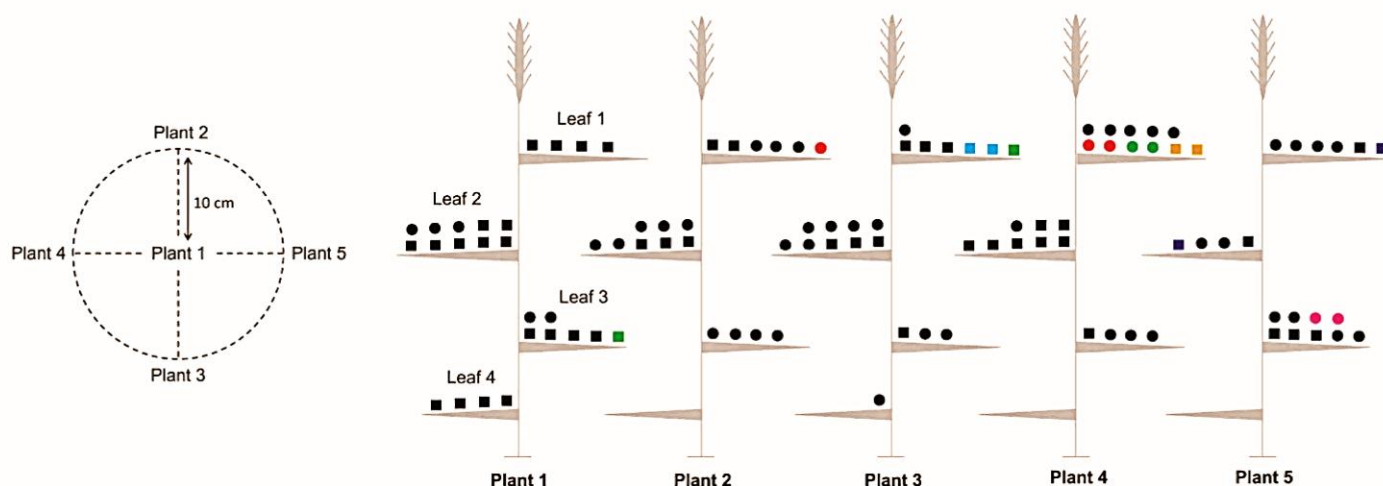
10 µl of formamide (Sigma-Aldrich, France) and 0.15 µl of GeneScan 500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems). After a denaturation step at 94°C for 10 min, the pooled-PCR products were analyzed in a 3130xl Genetic Analyzer DNA sequencer (Applied Biosystems) at 60°C and 1.5 Kv. Fluorescent peaks were standardized using the Genescan Analysis software v 3.7.1. The conversion into alleles and the determination of allele sizes were estimated using the software Genotyper (Applied Biosystems). Alleles scored with each microsatellite marker in each collection were summarized in an Excel sheet before being submitted for statistical analyses.

Mating types of the isolates were determined using a multiplex PCR assay, allowing the amplification of partial sequences from the two mating-type idiomorphs (Waalwijk et al. 2002). PCR reactions as well as PCR thermal cycling conditions were performed according to Siah et al. (2010). PCR products were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gels run at 100 V for 45 min. After ethidium bromide staining and visualizing under UV light, images were captured with a digital camera (Clara Vision, France) and scored manually.

**Data analyses.** Isolates with the same combination of alleles at all loci (probably clones) were considered as identical multilocus haplotypes and only a single representative multilocus haplotype (unique genotype) was used within subcollections for subsequent analyses, except for genotype diversity analysis. Genotype diversity

was estimated by calculating the clonal fraction and the frequency of haplotypes in each collection using the program Arlequin version 3.5.2.2 (Excoffier and Lischer 2010). Gene diversity in each collection was measured with several indices, including the number of different alleles, gene diversity (Nei 1973) and the unbiased gene diversity (Anon 1996), calculated using the GenAlEx version 6.501 program (Peakall and Smouse 2012).

Genetic structure was tested using different approaches. First, the magnitude of genetic differentiation among subcollections, according to each locus, was assessed using several fixation indices including the Wright's  $F_{ST}$  index ( $F_{ST}$ ) implemented in GenAlEx version 6.501, the Nei's  $G_{ST}$  index, a multiallelic analog of  $F_{ST}$  that is suitable for haploids as well as diploids (Nei 1973), implemented in POPGENE version 1.32 (Yeh et al. 2000), and new standardized estimators of genetic structure, including the Hedrick's standardized fixation index  $G'_{ST}$  (Meirmans and Hedrick 2011) and the Jost's standardized fixation index Jost's  $D_{est}$  (Jost 2008), implemented in GenAlEx version 6.501. These different indices were calculated since there was much discussion about the best statistic tool to use when measuring genetic differentiation between or among populations (Jost 2008; Meirmans and Hedrick 2011; Whitlock 2011). In addition, the program GenAlEx version 6.501 was run to calculate both  $F_{ST}$  and  $\Phi_{PT}$  indices to highlight the amount of population differentiation among pairs of subcollections (locations).  $\Phi_{PT}$  is an analog of standardized  $F_{ST}$  for haploid data



**Fig. 1.** Spatial distribution of the 105 *Zymoseptoria tritici* isolates sampled from five wheat plants distanced to each other by 10 cm and from different layers. Isolates represented in black are unique multilocus haplotypes, while the other isolates indicated by another and same color are identical multilocus haplotypes, i.e., clones (according to microsatellite fingerprinting). MAT1-1 isolates are represented by circles (●) and MAT1-2 isolates are represented by squares (■). MAT1-1 and MAT1-2 refer to mating types. All isolates were sampled from different lesions within the leaves. The isolates are randomly represented on the leaves since no information was noted regarding the localization of the lesions on the sampled leaves during the fungal isolation procedure.

**TABLE 1.** Characteristics of the eight pairs of microsatellite primers used in this study

Multiplex pool	Locus	Repeat motif	Primer sequences (5'-3')	Optimal annealing temperature	Fluorescent dye
Pool 1	ST1A4	(CGG) <sub>7</sub>	F GGTTCGATGGAGAGATTT R TCACCTCCTCATCGCAGA	58°C	HEX
	ST1E3	(CGG) <sub>5</sub>	F GTTCCGCCGGTCAAGTCC R GCCAAGGCACTGCTGCTCC	65°C	6-FAM
Pool 2	ST1E7	(CGG) <sub>5</sub>	F GATCTCGAGCAGGGCGGAAGT R TCACACGCTGGTCTGTGAATC	65°C	HEX
	ST1D7	(AC) <sub>22</sub>	F ATCCTCCATTCACACTACTGCAT R TGTGGAACAGGAATAGGCTTG	65°C	6-FAM
Pool 3	ST2E4	(GGC) <sub>5</sub>	F GAAGATCAACAGCATGGGCGG R CTCCAGAGGGATCACAAAGGC	58°C	HEX
	AC0007	(AC) <sub>15</sub>	F TGCTCGCAAGACATAAAACG R CTCTTAGCATTGGTCGGTGG	58°C	6-FAM
Pool 4	ST1G7	(TG) <sub>9</sub>	F ATGCTGAGAAGTTCGGTGAGG R CGTTCTCCACCTCCAACACT	65°C	HEX
	ST2C10	(AGCGG) <sub>4</sub>	F AGGCGAGAACTTGCTTGCAG R AATGAACGTCCCATGGACGTG	58°C	6-FAM



and represents a 0 to 1 scaled estimator of population differentiation (Meirmans 2006; Meirmans and Hedrick 2011). Sources of genetic structure in each collection were investigated using hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) implemented in GenA-LEx version 6.501, by estimating the degree of genetic differentiation within and among subcollections, using 1,000 permutations.

Fungal population structure was also analyzed using Structure version 2.3.4, a model-based clustering program that uses a Bayesian approach to estimate the number of populations (clusters) and to assign probabilistically individuals to populations (Falush et al. 2003; Pritchard et al. 2000). The analysis was performed without prior information on the subcollections to which the individuals belonged. The admixture model with correlated allele frequencies was applied, with 100,000 iterations of the Markov Monte Carlo Chain (MCMC) used as 'burn-in' that were followed by 1,000,000 MCMC iterations. The data were analyzed with K ranging from 1 to 13, with 10 repeat runs for each K. The best estimate of K was based on  $\Delta K$  values calculated from  $\ln P(D)$ , as described in Evanno et al. (2005). This approach reduces the risk of overestimating K and, therefore, provides a correct estimation of the number of clusters. The Structure Harvester web interface (Earl and vonHoldt 2012) was used to identify the most likely number of occurring clusters (highest  $\Delta K$  value) according to the method of Evanno et al. (2005). Furthermore, a dendrogram estimating genetic clustering of the haplotypes was produced using the unweighted neighbor-joining method based on the dissimilarity matrix (10,000 bootstraps), as implemented in the DARwin version 6.0.014 software (Perrier and Jacquemoud-Collet 2006). In addition, directional relative migration network among the 12 locations of the region scale was determined using the divMigrate-online software using Jost's  $D$  ( $D_{est}$ ) as a measure of genetic differentiation (Jost 2008; Sundqvist et al. 2016). This approach provides network plots that visualize patterns of directional relative migration between locations. Finally, the nonparametric Mantel test was applied to determine a potential isolation by distance among the subcollections of the region scale, i.e., to test the correlation between geographical distance between locations and the rates of genetic differentiation. The test was carried out using the GenA-LEx version 6.501 software with 1,000 random permutations, with the matrix of pairwise genetic differentiation between locations (with  $\Phi_{PT}$  index), and a matrix of geographic distance obtained from the universal transverse Mercator (UTM) values of the locations.

Random mating in the collections was tested using two approaches. First, the standardized index of association ( $sI_A$ ) was calculated using the LIAN (LIInage ANalysis) version 3.7 web interface (Haubold and Hudson 2000) to test multilocus linkage disequilibrium under the null hypothesis that alleles observed at different loci are unlinked. Significant difference from linkage equilibrium was tested using the Monte Carlo random sampling method (1000 iterations), as implemented in LIAN version 3.7. Then, the potential of sexual reproduction was evaluated by determining whether the frequencies of the two mating types (MAT1-1 and MAT1-2) deviated significantly from the 1:1 ratio, using the  $\chi^2$  test at  $P = 0.05$ . The two idiomorphs are expected to occur at equal proportions under the scenario of regular cycles of sexual reproduction.

## RESULTS

**High and similar levels of both gene and genotype diversities for *Z. tritici* at region, field, plant, and leaf layer scales.** A collection of 627 *Z. tritici* isolates sampled from northern France (Hauts-de-France region) at different scales (region, field, plant, and leaf layer) was typed using microsatellite markers to assess genetic diversity and population structure of the pathogen at local spatial scales. All markers were polymorphic in all examined collections. In the regional collection, a total of 83 different alleles was scored over the eight tested loci and the number of amplified

alleles per locus ranged from 6 (ST2C10 locus) to 17 (AC0007 locus), with an average of 10.4 alleles per locus. Within the region locations, the average number of different alleles per locus ranged from 3.12 (location 6) to 6.75 (location 4), with an average of 4.21 alleles per locus across all locations (Table 2). When considering the single field fungal collection, 76 distinct alleles were detected over the eight tested loci and the number of observed alleles per locus ranged from 3 (ST1G7 locus) to 23 (ST1D7 locus), with an average of 9.5 alleles per locus. Within the fields, the average number of different alleles per locus ranged from 4.12 (plot 1) to 4.87 (plot 4) in field 1 and from 4.62 (plots 1 and 2) to 4.87 (plot 3) in field 2, with an average of 4.71 alleles per locus per field (Table 2). Finally, in the plant and leaf layer collections, which consisted of the same collection used for both scale investigations, a total of 73 different alleles were highlighted over the eight tested loci and the number of alleles per locus ranged from 3 (ST1G7 locus) to 23 (AC0007 locus), with an average of 9.1 alleles per locus. The average number of different alleles per locus ranged from 4.12 (plant 5) to 5.37 (plant 1) across all plants and from 2.37 (leaf layer 4) to 5.87 (leaf layer 2) over all leaf layers, with an average of 4.72 and 4.87 alleles per locus, per plant and per leaf layer, respectively (Table 2). The low number of alleles observed in the leaf layer 4 was likely due to the very small sample size of isolates, since only five isolates were successfully obtained for this leaf layer during fungal isolation procedure.

Multilocus analysis revealed high and similar amounts of genotype diversity within all tested collections, with 269 (95%), 231 (96%), and 99 (94%) haplotypes identified among the 282, 240, and 105 fungal isolates sampled from the region, field, and both plant and leaf layer scales, respectively (Table 2). Interestingly, in the plant collection, most of the clones detected on the plants were found on the same leaf (four couples of clones occurred on leaf layer 1 among which one clone on both plants 2 and 4, and one couple of clones on leaf layer 3) (Fig. 1). Only two couples of clones occurred on different leaf layers (Fig. 1). The haplotype frequency within subcollections varied slightly in each collection, but this variation could likely be due to the variation in sample size (Table 2).

Allele diversity analyses revealed also high and close levels of gene diversity among the studied collections. The averaged Nei's gene diversity index consisted of 0.47, 0.44, 0.56, and 0.54 in collections from the region, field, plant, and leaf layer scales, respectively, with very slight variations among the subcollections in each collection (Table 2). The values of the unbiased gene diversity index (standardized for sample size) were overall slightly higher than those of the Nei's index, but globally display a similar extent of gene diversity when compared with the values of Nei's index (Table 2).

**Significant clustering of *Z. tritici* populations at the region scale.** All measures of genetic structure showed significant population structure at the region scale and no significant genetic differentiation at the field, plant, and leaf layer scales (Table 3). The values of the different fixation indices ( $F_{ST}$ ,  $G_{ST}$ ,  $G''_{ST}$ , and  $D_{est}$ ) varied strongly among loci, especially in the region collection, where the highest values for all indices (except for  $D_{est}$ ) were found for the ST2C10 locus and the lowest ones for the ST1E3 locus. However, their value range was overall similar within all collections. Statistical analyses at  $P = 0.01$  showed that only the region collection showed significant genetic differentiation (at all loci, except ST1E3), with averaged  $F_{ST}$ ,  $G_{ST}$ ,  $G''_{ST}$ , and  $D_{est}$  values of 0.27, 0.23, 0.49, and 0.32, respectively (Table 3). All values of fixation indices did not exceed 0.04 in the field, plant, and leaf layer collections (Table 3). AMOVA confirmed these findings and showed that 25% of the genetic variation could be explained by differences among subcollections (locations) and 75% by differences within subcollections in the region collection, while such percentages did not exceed 1% among subcollections and exceeded 99% within subcollections in field, plant, and leaf layer collections (Fig. 2). Additional analyses using the Structure software confirmed

the lack of genetic structure within the field, plant, and leaf layer collections (data not shown).

Pairwise  $F_{ST}$  and  $\Phi_{PT}$  comparisons among subcollections in the region collection revealed significant genetic differentiation

between all sampled locations, with  $F_{ST}$  and  $\Phi_{PT}$  values among locations ranging from 0.03 to 0.26 and from 0.02 to 0.38, respectively (Table 4). The value range of both fixation indices was overall similar among all locations, and all  $F_{ST}$  and  $\Phi_{PT}$  comparisons

TABLE 2. Genetic diversity based on eight microsatellite markers in *Zymoseptoria tritici* subcollections sampled in northern France (Hauts-de-France region) from different scales

Scale	Year of sampling	Location	Abbreviation	Cultivar	N <sup>a</sup>	H <sup>b</sup>	Na <sup>c</sup>	H <sup>d</sup>	uH <sup>e</sup>	sI <sub>A</sub> <sup>f</sup>	MAT <sup>g</sup>		
Region	2009	Teteghem	Location 1	Boisseau	24	24	4.25	0.47	0.49	0.00	7:17		
		Vieille-Eglise	Location 2	Pireneo	24	23	4.37	0.49	0.51	0.04	12:11		
		Carly	Location 3	Raspail	24	24	5.50	0.56	0.59	-0.01	14:10		
		Campigneulles-les-Grandes	Location 4	Bermude	24	24	6.75	0.65	0.68	0.01	11:13		
		Campagne-les-Wardrecques	Location 5	Bermude	24	23	3.50	0.41	0.43	-0.01	14:9		
		Troisveaux	Location 6	Pireneo	20	20	3.12	0.38	0.40	-0.02	11:9		
		Warlincourt-les-Pas	Location 7	Pactole	24	23	4.12	0.44	0.46	-0.00	11:12		
		Izel-les-Hameaux	Location 8	Cordiale	24	20	3.62	0.38	0.40	0.03	9:11		
		Carvin	Location 9	Cadenza	24	22	3.50	0.40	0.42	0.01	11:11		
		Bapaume	Location 10	Bermude	22	22	3.87	0.42	0.44	0.02	9:13		
		Marcq-en-Ostrevent	Location 11	Apache	24	22	3.75	0.52	0.55	0.03	9:13		
		Sautain	Location 12	Mixture <sup>h</sup>	24	22	4.12	0.47	0.50	0.01	7:15		
		Total or overall			282	269	4.21	0.47	0.49	<b>0.01*</b>	125/144		
Field	2016	Lorgies (field 1)	Plot 1	Bergamo	30	30	4.12	0.42	0.44	0.01	13:17		
			Plot 2	Bergamo	30	27	4.75	0.47	0.49	0.02	10:20		
			Plot 3	Terroir	30	28	4.25	0.40	0.42	-0.01	14:16		
			Plot 4	Terroir	30	30	4.87	0.43	0.45	-0.00	13:17		
			Total or overall		120	115	4.50	0.43	0.44		50:70		
		Tilloy-les-Mofflaines (field 2)	Plot 1	Bergamo	30	30	4.62	0.41	0.43	-0.00	15:15		
			Plot 2	Bergamo	30	30	4.62	0.46	0.48	0.04	22:8		
			Plot 3	Terroir	30	29	4.87	0.47	0.49	0.03	16:14		
			Plot 4	Terroir	30	27	4.75	0.45	0.47	-0.02	18:12		
			Total or overall		120	116	4.71	0.44	0.46		71:49		
				Total or overall			240	231	4.61	0.44	0.46	0.01	121/119
		Plant	2012	Vieille-Eglise	Plant 1	Pireneo	25	25	5.37	0.58	0.61	<b>0.07</b>	<b>5:20</b>
Plant 2	Pireneo				18	18	4.87	0.60	0.64	<b>0.05</b>	13:5		
Plant 3	Pireneo				20	19	4.75	0.58	0.62	0.02	9:10		
Plant 4	Pireneo				23	20	4.50	0.53	0.55	0.01	11:9		
Plant 5	Pireneo				19	17	4.12	0.49	0.52	0.10	11:6		
Total or overall					105	99	4.72	0.56	0.59	<b>0.03</b>	49:50		
Leaf layer	2012	Vieille Eglise	Leaf layer 1	Pireneo	34	29	5.62	0.53	0.55	0.01	15:14		
			Leaf layer 2	Pireneo	39	39	5.87	0.58	0.59	0.02	17:22		
			Leaf layer 3	Pireneo	27	26	5.62	0.60	0.63	<b>0.05</b>	17:9		
			Leaf layer 4	Pireneo	5	5	2.37	0.44	0.55	<b>0.18</b>	1:4		
			Total or overall		105	99	4.87	0.54	0.58	<b>0.03</b>	50:49		

<sup>a</sup> Number of isolates.

<sup>b</sup> Number of haplotypes per subpopulation, calculated with XSTAT.

<sup>c</sup> Number of different alleles averaged over all loci, calculated with GenAIEx version 6.501.

<sup>d</sup> Nei's gene diversity averaged over all loci, calculated with GenAIEx version 6.501.

<sup>e</sup> Unbiased gene diversity averaged over all loci, calculated with GenAIEx version 6.501.

<sup>f</sup> Standardized index of association ( $sI_A$ ) between pairs of loci, calculated using the program LIAN version 3.7. Significant values ( $P < 0.05$ ) based on 1,000 permutations according to Haubold and Hudson (2000) are indicated in bold. Persisting significant values ( $P < 0.05$ ) with the same test, after the removal of isolates with private alleles, are marked by an asterisk.

<sup>g</sup> Mating type ratio (MAT1-1: MAT1-2). Significant differences ( $P < 0.05$ ) between frequencies of the two mating types with the  $\chi^2$  test are indicated in bold.

<sup>h</sup> Mixture with the cultivars Premio, Boisseau, Apache, Oakley, Bermude, and Caphorn.

TABLE 3. Genetic structure at eight microsatellite markers in *Zymoseptoria tritici* subcollections sampled in northern France (Hauts-de-France region) from different scales

Locus	Region				Field				Plant				Leaf layer			
	$F_{ST}$ <sup>a</sup>	$G_{ST}$ <sup>b</sup>	$G'_{ST}$ <sup>c</sup>	$D_{est}$ <sup>d</sup>	$F_{ST}$	$G_{ST}$	$G'_{ST}$	$D_{est}$	$F_{ST}$	$G_{ST}$	$G'_{ST}$	$D_{est}$	$F_{ST}$	$G_{ST}$	$G'_{ST}$	$D_{est}$
ST2C10	<b>0.63<sup>e</sup></b>	<b>0.62</b>	<b>0.85</b>	<b>0.60</b>	0.03	0.01	0.01	0.00	0.05	0.01	0.03	0.01	0.02	0.00	0.00	0.00
ST2E4	<b>0.48</b>	<b>0.45</b>	<b>0.82</b>	<b>0.66</b>	0.04	0.01	0.01	0.00	0.05	0.01	0.02	0.01	0.02	0.00	0.02	0.01
AC0007	<b>0.36</b>	<b>0.33</b>	<b>0.49</b>	<b>0.21</b>	0.03	0.01	0.04	0.03	0.04	0.00	0.00	0.00	0.04	0.02	0.10	0.04
ST1E7	<b>0.17</b>	<b>0.13</b>	<b>0.28</b>	<b>0.16</b>	0.03	0.00	0.01	0.01	0.03	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
ST1D7	<b>0.15</b>	<b>0.11</b>	<b>0.42</b>	<b>0.34</b>	0.02	0.01	0.06	0.05	0.10	0.06	0.21	0.14	0.02	0.00	0.01	0.01
ST1A4	<b>0.13</b>	<b>0.09</b>	<b>0.26</b>	<b>0.18</b>	0.03	0.01	0.01	0.00	0.08	0.03	0.08	0.04	0.05	0.03	0.09	0.05
ST1G7	<b>0.11</b>	<b>0.08</b>	<b>0.21</b>	<b>0.14</b>	0.05	0.02	0.02	0.01	0.05	0.00	0.01	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
ST1E3	0.07	0.03	0.07	0.04	0.04	0.01	0.01	0.01	0.03	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.01	0.01
Mean <sup>e</sup>	<b>0.27</b>	<b>0.23</b>	<b>0.49</b>	<b>0.32</b>	0.03	0.01	0.02	0.02	0.05	0.01	0.04	0.02	0.03	0.01	0.03	0.01

<sup>a</sup>  $F_{ST}$  = Wright's F index providing a measure of genetic differentiation among populations, calculated with GenAIEx version 6.501.

<sup>b</sup>  $G_{ST}$  = Nei's fixation index estimating genetic differentiation among subpopulations, calculated with POPGENE version 1.32.

<sup>c</sup>  $G'_{ST}$  = Hedrick's standardized  $G_{ST}$ , adjusted for small population size, calculated with GenAIEx version 6.501.

<sup>d</sup>  $D_{est}$  = Jost's  $D_{est}$  standardized fixation index, implemented in GenAIEx version 6.501.

<sup>e</sup> Significant values at  $P = 0.05$ , based on 1,000 permutations using GenAIEx version 6.501 software, are highlighted in bold.

were significant at  $P = 0.05$ , except for location 1/location 2 and location 8/location 9 combinations, which showed nonsignificant genetic differentiation (Table 3). Bayesian analysis implemented in Structure version 2.3.4 supported the occurrence of genetic differentiation among locations and showed that several haplotypes had mixed origins (Fig. 3C). The measures of  $\Delta K$  calculated from  $\text{LnP}(D)$  revealed that  $K = 6$  is the most likely number of clusters (highest  $\Delta K$  value = 23.10). The six identified clusters were overall differentially distributed among the sampled locations. Cluster 1 (in blue) is relatively more present in locations 1, 2, and 3; clusters 2 and 3 (in yellow and green) in locations 3 and 4; clusters 4 and 6 (in red and clear blue) in locations 5, 6, 8, 9, 10, 11, and 12; and the cluster 5 (in pink) in location 7 and 11 (Fig. 3A).

Interestingly, the dendrogram constructed using the unweighted neighbor-joining method clearly highlighted a clustering of the haplotypes according to their geographical origin (Fig. 4). Most of fungal haplotypes from each location seem to cluster together in a same group, except for location 11 (in black) where individuals were mostly distributed in different groups. Overall, haplotype clustering in the dendrogram was consistent with that highlighted using the Structure program, with several common cluster features (Figs. 3 and 4). Location 7 generated a separate cluster with both approaches. Locations 1, 2, and 3, with a higher proportion of blue in Figure 3, clustered together in Figure 4. Locations 8 and 9, on one hand, and locations 5, 6, and 12, on the other hand, clustered together as shown in Figure 4, while these locations shared similar cluster patterns in Figure 3. Clustering of locations 5 and 6 as well as locations 8 and 9 is supported by the pairwise  $F_{ST}$  and  $\Phi_{PT}$  values, which indicated a nonsignificant genetic subdivision among these location combinations (Table 3). However, locations 4 and 10 clustered closely to each other in Figure 4, although these locations showed distinct clustering profiles in Figure 3.

Directional relative migration network revealed disparate levels of gene flow among locations (Fig. 5). The highest rate of relative migration occurred from location 6 to location 12 (0.88), while the

lowest rate was obtained from location 6 to location 3 (0.20). Location 4 was the one receiving gene flow to the most extent, which occurred from all locations except locations 3 and 7. No gene flow was observed toward location 7. Instead, a high level of relative migration occurred from this location to locations 6 and 11. Overall, no clear relationship between the relative directional migration rates and geographic position of the locations across the Hauts-de-France region was observed (Figs. 3 and 4). Data analyses using the Mantel test confirmed this conclusion and revealed a lack of relationship between the amounts of genetic clustering ( $\Phi_{PT}$ ) and the distance (in kilometers) between locations ( $r = 0.02$ ,  $P = 0.49 > 0.05$ ), indicating an absence of isolation by distance event within the investigated region.

***Z. tritici* displays a near random mating and a strong potential for sexual reproduction.** Both fungal mating types (MAT1-1 and MAT1-2) were identified in all sampled collections (Table 2). A  $\chi^2$  test applied to examine deviation from the 1:1 ratio null hypothesis, expected for random-mating populations, revealed nonsignificant difference between the idiomorph frequencies in all studied collections and corresponding subcollections, except in the plant 1 subcollection, where the mating type proportions departed significantly ( $P = 0.03 < 0.05$ ) from the 1:1 ratio (Table 2). The two mating types were detected on all of the five plants and the four leaf layers studied, and found to co-occur together on the same leaf on 13 (81%) of the 16 wheat leaves from which at least two isolates were sampled (Fig. 1). The values of the multilocus standardized index of association ( $sI_A$ ) were overall very low and indicated no departure from gametic equilibrium in most of the sampled subcollections, except for plants 1 and 2, and leaf layers 3 and 4 subcollections (Table 2). Low but significant values of  $sI_A$  were also obtained at the whole collection level, at region, plant, and leaf layer scales. Additional analyses performed without haplotypes with private alleles resulted in nonsignificant values of  $sI_A$  in the collections and subcollections from both plant and leaf layer scales (data not shown). Extreme allele frequencies are known to provide misleading measures of

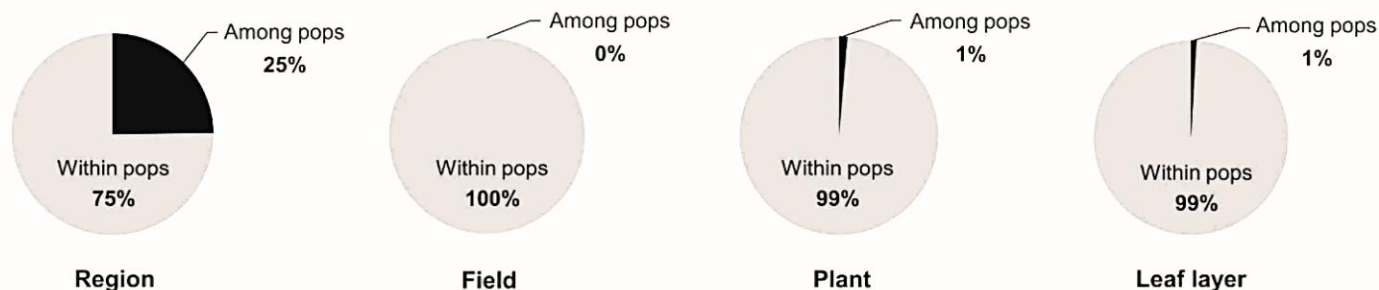


Fig. 2. Hierarchic analysis of molecular variance in *Zymoseptoria tritici* subcollections sampled in northern France (Hauts-de-France region) from different scales. Percentage of molecular variance is indicated in gray within collections (pops) and in black among collections.

TABLE 4. Population differentiation measured by  $F_{ST}$  (below the diagonal) and  $\Phi_{PT}$  ( $\Phi_{PT}$ ) (above the diagonal) among 12 *Zymoseptoria tritici* subcollections sampled in northern France (Hauts-de-France region) from different locations<sup>a</sup>

Location	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12
L1	...	0.02	<b>0.16</b>	<b>0.25</b>	<b>0.23</b>	<b>0.28</b>	<b>0.22</b>	<b>0.27</b>	<b>0.28</b>	<b>0.20</b>	<b>0.14</b>	<b>0.29</b>
L2	0.03	...	<b>0.09</b>	<b>0.24</b>	<b>0.26</b>	<b>0.30</b>	<b>0.21</b>	<b>0.24</b>	<b>0.23</b>	<b>0.21</b>	<b>0.13</b>	<b>0.26</b>
L3	<b>0.11</b>	<b>0.07</b>	...	<b>0.21</b>	<b>0.29</b>	<b>0.34</b>	<b>0.25</b>	<b>0.28</b>	<b>0.27</b>	<b>0.25</b>	<b>0.14</b>	<b>0.23</b>
L4	<b>0.16</b>	<b>0.16</b>	<b>0.14</b>	...	<b>0.27</b>	<b>0.32</b>	<b>0.26</b>	<b>0.32</b>	<b>0.32</b>	<b>0.26</b>	<b>0.20</b>	<b>0.27</b>
L5	<b>0.15</b>	<b>0.17</b>	<b>0.19</b>	<b>0.18</b>	...	<b>0.09</b>	<b>0.27</b>	<b>0.37</b>	<b>0.38</b>	<b>0.25</b>	<b>0.16</b>	<b>0.31</b>
L6	<b>0.19</b>	<b>0.20</b>	<b>0.23</b>	<b>0.21</b>	<b>0.07</b>	...	<b>0.31</b>	<b>0.37</b>	<b>0.37</b>	<b>0.33</b>	<b>0.18</b>	<b>0.25</b>
L7	<b>0.15</b>	<b>0.14</b>	<b>0.17</b>	<b>0.17</b>	<b>0.17</b>	<b>0.20</b>	...	<b>0.34</b>	<b>0.33</b>	<b>0.31</b>	<b>0.16</b>	<b>0.35</b>
L8	<b>0.18</b>	<b>0.16</b>	<b>0.19</b>	<b>0.21</b>	<b>0.25</b>	<b>0.25</b>	<b>0.23</b>	...	0.03	<b>0.25</b>	<b>0.18</b>	<b>0.25</b>
L9	<b>0.18</b>	<b>0.15</b>	<b>0.18</b>	<b>0.22</b>	<b>0.26</b>	<b>0.25</b>	<b>0.22</b>	0.04	...	<b>0.25</b>	<b>0.19</b>	<b>0.29</b>
L10	<b>0.13</b>	<b>0.14</b>	<b>0.16</b>	<b>0.17</b>	<b>0.17</b>	<b>0.22</b>	<b>0.21</b>	<b>0.17</b>	<b>0.17</b>	...	<b>0.10</b>	<b>0.23</b>
L11	<b>0.10</b>	<b>0.09</b>	<b>0.10</b>	<b>0.14</b>	<b>0.11</b>	<b>0.12</b>	<b>0.11</b>	<b>0.13</b>	<b>0.13</b>	<b>0.07</b>	...	<b>0.11</b>
L12	<b>0.19</b>	<b>0.17</b>	<b>0.15</b>	<b>0.18</b>	<b>0.20</b>	<b>0.17</b>	<b>0.23</b>	<b>0.17</b>	<b>0.20</b>	<b>0.15</b>	<b>0.08</b>	...

<sup>a</sup> L1, Teteghem; L2, Vieille-Eglise; L3, Carly; L4, Campinieule-les-Grandes; L5, Campagne-les-Wardrecques; L6, Troisveaux; L7, Warlincourt-les-Pas; L8, Izel-les-Hameaux; L9, Carvin; L10, Bapaume; L11, Marcq-en-Ostrevent; and L12, Sautain. Significant values at  $P = 0.01$ , based on 1,000 permutations using GenAlEx version 6.501 software, are highlighted in bold.

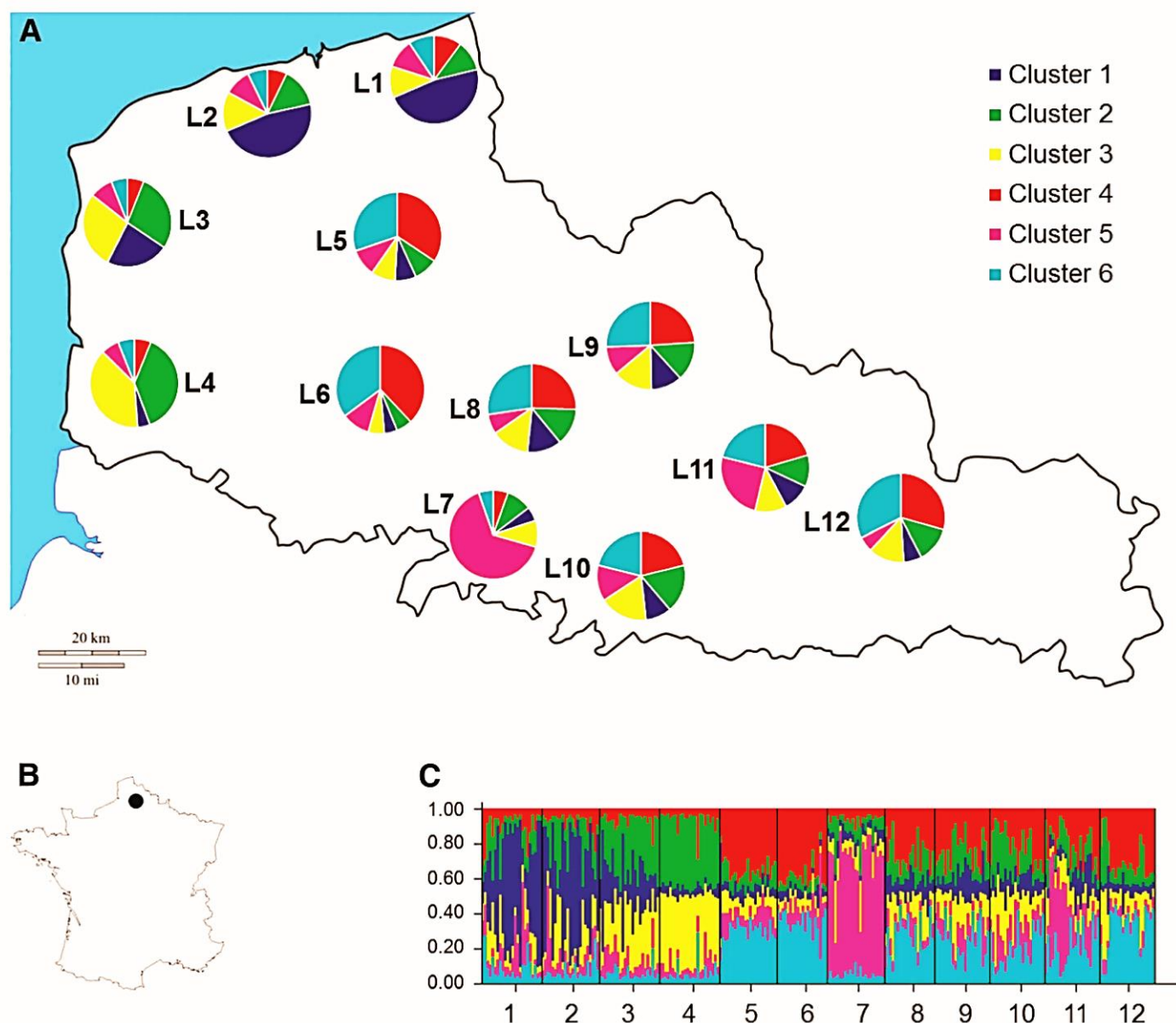
gametic disequilibrium (Asmussen and Basten 1994). However, the weak gametic disequilibrium observed in the whole region collection remained significant even when the haplotypes with private alleles were excluded from the analysis, likely because of larger sample size and lower frequency of private alleles in this collection (data not shown).

## DISCUSSION

High levels of genetic diversity were scored for *Z. tritici* in northern France (Hauts-de-France region) at all investigated scales. Interestingly, we found similar patterns of both gene and genotype diversities in the biggest (region), the intermediate (field), and smallest (plant) spatial scales. High levels of genetic diversity were previously recorded in larger (country) or similar (region, field) geographical scales (Boukef et al. 2012; Drabešová et al. 2013; El

Chartouni et al. 2011; Gurung et al. 2011; Kabbage et al. 2009; Linde et al. 2002; Welch et al. 2017; Zhan et al. 2003). Nonetheless, lower, but still consequent, levels of genetic diversity were detected in very fine niches such as a single leaf and even a single lesion (El Chartouni et al. 2012; Linde et al. 2002). Our results complete these findings and report for the first time very high degree of genetic diversity for *Z. tritici* on a single plant. Taken together, these findings indicate that *Z. tritici* have substantial, and overall similar patterns, of both gene and genotype diversities at global, regional, field, and even at the single plant scale, as revealed in this study. The diversity then decreased at a single leaf and a single lesion, as a result of very locally confined asexual multiplication within clonal pycnidiospores.

To our knowledge, our work is the first study assessing fungal genetic diversity at a single cereal plant level by considering the different plant leaf layers. Surprisingly, we identified only five pairs



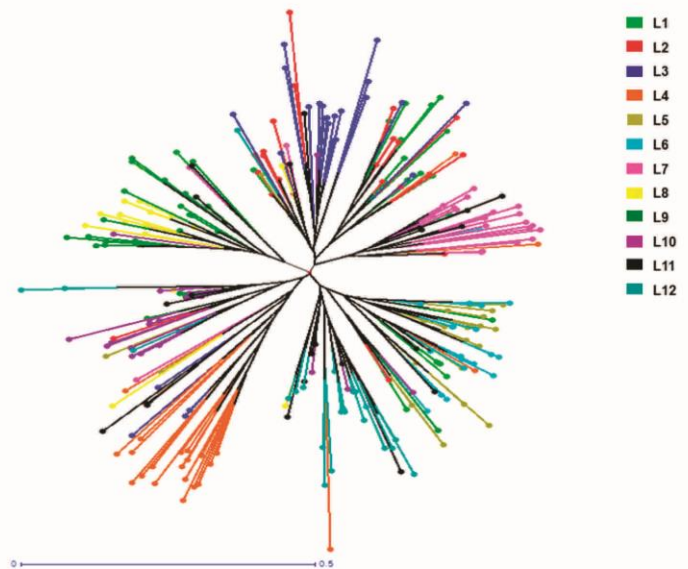
**Fig. 3.** Distribution of the six microsatellite-based genetic clusters highlighted using the Structure 2.3.4 software among the 12 locations (L1 to L12) sampled in 2009 in northern France (in Nord-Pas de Calais part of the Hauts-de-France region). **A**, Frequencies of the six clusters (represented by shades or colors) within each sampled location. **B**, Geographic localization of the Hauts-de-France region in France. **C**, Bar plot showing the distribution of individual assignments estimated for  $K = 6$  clusters, from Bayesian inference cluster analysis performed with the 269 *Zymoseptoria tritici* haplotypes sampled from the 12 locations (from 1 to 12). Each vertical line represents an individual and the length of each colored line corresponds to the membership coefficient (scale at the left of the bar plot) for each cluster. Individuals are grouped according to their sampling locations. Colors/shades of clusters are the same in A and B subfigures. L1, Teteghem; L2, Vieille-Eglise; L3, Carly; L4, Campinieule-les-Grandes; L5, Campagne-les-Wardrecques; L6, Troisveaux; L7, Warlincourt-les-Pas; L8, Izel-les-Hameaux; L9, Carvin; L10, Bapaume; L11, Marcq-en-Ostrevent; and L12, Sautain.

of clones originating from the same leaf but from different lesions, although significant numbers of both isolates (more than 100) and leaves (16 leaves with more than one isolate, with an average of 6.5 isolates per leaf, all taken from different lesions) were examined. This finding demonstrates that, at least in our conditions, lesions with common haplotypes are rare in wheat leaves infected by *Z. tritici*, and suggests that the different lesions observed in the field on a same leaf are mainly caused by pycnidiospores or ascospores originated from other leaves. On the other hand, we scored only two pairs of clones which occurred on different leaf layers; two clones on a same plant and two other clones on two different plants (Fig. 1). Such a rare occurrence of identical haplotypes on different leaf layers of the same plant or plants from the same microsurface is surprising and unpredicted, since *Z. tritici* is known to be dispersed locally extensively with clonal pycnidiospores, through rain splashing and physical contact between infected and healthy leaves (Eyal 1999). Significant contribution of windborn ascospores to the fungal epidemics has been suggested since the release of such spores all over the year was detected using spore-trapping or isolation experiments (Duvivier et al. 2013; Hunter et al. 1999; Suffert and Sache 2011). Our results support these findings and show that ascospores contribute much more than expected to *Z. tritici* epidemics, and therefore, should be considered not only as a primary source of inoculum, but also as a significant source of secondary inoculum strongly involved in wheat plant infection and disease progression. Interestingly, most of the clones we detected within the leaf layer collection occurred on leaf layer 1 (four clones), with an occurrence of three clones on two different leaves (Fig. 1). Despite the relatively small sample of isolates studied, such result could be a signature of more active asexual multiplication and pycnidiospore dispersal in upper leaves than in lower leaves within the canopy. Nevertheless, the relative importance of each type of spores (pycnidiospores versus ascospores) in the epidemiology of the pathogen deserves to be further deciphered using in-depth dedicated experiments.

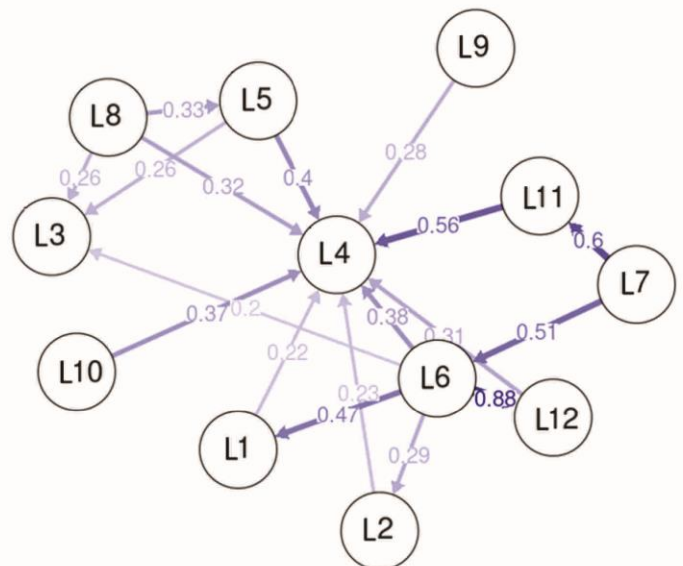
As expected, our analyses showed no genetic structuration for *Z. tritici* at small scales such as single field or single plant. An absence of genetic differentiation for *Z. tritici* at the field level (in experimental plots) has already been observed by using non-Bayesian statistical analyses (Linde et al. 2002). Our investigation performed using a large sample size (240 isolates), and using both non-Bayesian and Bayesian (i.e., analyzing genetic clustering in *Z. tritici* at the field scale. Likewise, we found nonsignificant fungal genetic differentiation at both plant and leaf layer scales. Such fine and local spatial scales, including the field one, are unlikely to be sites of genetic structuration, especially in pathogens with windborn spores. Frequent production of ascospores by the pathogen during the sexual stage certainly leads to permanent gene flow and allele pool homogenization in the field. Our detection of the two fungal mating types at equal frequencies at all assessed scales agrees with this hypothesis and point out regular cycles of sexual reproduction for *Z. tritici* in the Hauts-de-France Region, thus corroborating previous reports (Siah et al. 2010; Zhan et al. 2002). The frequent co-occurrence of the two idiomorphs we highlighted on the same leaf (81% of analyzed leaves) offers to the pathogen the opportunity for sexual contact, and then subsequent mating. Recurrent sexual recombination is likely the main process responsible for the strong genetic diversity observed in *Z. tritici* (El Chartouni et al. 2011; Siah et al. 2010; Zhan et al. 2003).

Interestingly, we observed a significant genetic structure at the region level among the different locations, as revealed by all calculated fixation indices as well as AMOVA (Table 3; Fig. 2), indicating that populations of *Z. tritici* in the Hauts-de-France Region are not part of a single panmictic population. Our work is the first report of significant population differentiation for *Z. tritici* at a relatively reduced spatial area (12,414 km<sup>2</sup>). Significant levels of genetic structure have recently been reported at largest scales among *Z. tritici* collections from different countries (Boukef

et al. 2012; Drabešová et al. 2013; Grandaubert et al. 2017), or among subcollections from a single country (Abrinbana et al. 2010; El Chartouni et al. 2011; Gurung et al. 2011). In Iran for instance, a strong genetic differentiation ( $G_{ST} = 0.39$ ) was scored among five



**Fig. 4.** Dendrogram showing genetic clustering of 269 *Zymoseptoria tritici* haplotypes sampled from 12 geographic locations (from L1 to L12) in northern France (Hauts-de-France region). The tree was constructed using the unweighted neighbor-joining method based on genetic dissimilarity among the haplotypes according to microsatellite markers. Each branch corresponds to a *Z. tritici* genotype and the colors of branches indicate locations from which the genotypes were sampled. L1, Teteghem; L2, Vieille-Eglise; L3, Carly; L4, Campinieule-les-Grandes; L5, Campagne-les-Wardrecques; L6, Troisveaux; L7, Warlincourt-les-Pas; L8, Izel-les-Hameaux; L9, Carvin; L10, Bapaume; L11, Marcq-en-Ostrevent; and L12, Sautain.



**Fig. 5.** Directional relative migration network among 12 *Zymoseptoria tritici* locations (L1 to L12) sampled in northern France (Hauts-de-France region). Arrows indicate the direction of gene flow based on Jost's *D* as measure and with a bootstrap value of 1,000 performed on divMigrate program. Arrow length, shading, and thickness are determined by the relative strength of gene flow. Numbers show the values of directional migration relative to the highest value (0.88) highlighted in the analysis (from L6 to L12). L1, Teteghem; L2, Vieille-Eglise; L3, Carly; L4, Campinieule-les-Grandes; L5, Campagne-les-Wardrecques; L6, Troisveaux; L7, Warlincourt-les-Pas; L8, Izel-les-Hameaux; L9, Carvin; L10, Bapaume; L11, Marcq-en-Ostrevent; and L12, Sautain.

major wheat-growing provinces, including two provinces only ~100 km apart from each other (Abrinbana et al. 2010), therefore agreeing with our results. Most of the observed genetic differentiation in *Z. tritici* populations has been suggested to be due to genetic drift, geographic barriers and local adaptation of the fungus to different climates, wheat cultivars, crop rotation patterns and cultural practices (Abrinbana et al. 2010; El Chartouni et al. 2011; Grandaubert et al. 2017; Gurung et al. 2011). Nevertheless, several earlier studies carried out using RFLP markers reported no or little genetic structure in *Z. tritici* populations at local, regional, as well as global scales, due to long distance gene flow (Linde et al. 2002; Zhan et al. 2003). Overall, the genetic structure of *Z. tritici* within the different studied populations varies depending on the sampled area and/or the type of marker used. For instance, microsatellites are highly polymorphic and have overall a faster rate of evolution compared with other markers such as RFLP. Therefore, microsatellites are expected to be more sensitive to recent phylogeographic and demographic events, making them as one of the choice markers for population genetic analyses (Linde et al. 2010).

Additional analyses using both Bayesian and unweighted neighbor-joining methods detected six genetically differentiated clusters in the Hauts-de-France *Z. tritici* collection, occurring overall according to the geographical locations from which the isolates were sampled (Figs. 3 and 4). A clustering of the whole French population of *Z. tritici* into three genetic groups, explained by a potential adaptation of the fungus to local conditions, has previously been obtained at the country scale (El Chartouni et al. 2011). In our case, the reasons leading to the structuration of the regional collection were not elucidated since no clear main direction of gene flow among the sampled locations (according to the direction from west to east prevailing winds for instance) (Figs. 3 and 5), and no significant isolation by distance ( $P = 0.49 > 0.05$ ), were observed. The forces causing the differentiation are thus not known. Genetic drift is unlikely because the pathogen populations possess very large effective sizes, especially in the studied region, where *Z. tritici* pressure is strong and frequent. By contrast, selection at one or more of the targeted (or closely linked) microsatellite loci can be a plausible hypothesis to explain the observed clustering, as well as the slight gametic disequilibrium noticed in the whole collection, although this later could also be caused by linkage among loci or physical admixture of samples that differ in allele frequencies. The hypothesis that the structuration is caused by selection and adaptation to habitat heterogeneity could be supported by a recent study, which showed that 44% of substitutions in the proteome of *Z. tritici* are adaptive, and that the rate of adaptation is positively correlated with recombination rate (Grandaubert et al. 2017). The most likely mechanisms that can drive selection in our case are adaptations to temperature, wind intensity, relative humidity, and/or frost degree since variations in the amplitude and magnitude of such factors can occur among several sampled locations (e.g., locations situated on the Channel coast versus those located inland) (Fig. 3). The involvements of temperature in short-term selection (over the cropping season) and in the evolution of *Z. tritici* populations were recently reported (Chen et al. 2017; Suffert et al. 2015). Moreover, it was demonstrated that local temperature interacts with host resistance in influencing the evolution of *Z. tritici*, leading to the conclusion that the evolution of the pathogen in resistant cultivars is less influenced by the environment than in susceptible cultivars (Chen et al. 2017). Therefore, a potential effect of wheat cultivars on our observed structuration cannot be excluded since some locations with a proper cultivar (e.g., location 7, Table 2) diverged genetically from the other locations (Fig. 4). Nonetheless, such factor can explain only partially the structuration since some locations with a same cultivar (e.g., locations 4, 5, and 10, Table 2) showed distinct genetic patterns (Figs. 3 and 4). Another hypothesis to explain the observed clustering is the effect of rainfall that can limit the dispersion of ascospores across the region, since the studied region is characterized by a

strong rainfall frequency during the growing season. However, it is likely that the obtained differentiation could be the result of the effect of multiple abiotic and/or biotic factors. Further assays by comparing for instance fitness traits of isolates representative of the six detected clusters could allow identifying the processes responsible for the observed structuration.

Our study gives new insights into the genetic structure of *Z. tritici*. Our findings indicate that *Z. tritici* is a highly diverse even at a single plant level, sexually active and demographically dynamic fungus. With an obtained average of ~20 (97/5) haplotypes/plant, and considering an average density of 250 plants/m<sup>2</sup>, we can estimate to, at least, 5,000 haplotypes per square meter, i.e., 50 million different *Z. tritici* genotypes that can occur per hectare, in conditions of strong disease pressure. We can state that such a large effective population size, coupled with the substantial highlighted allele diversity, ranks *Z. tritici* among the most diverse agronomically and economically important plant pathogens. We also revealed that the population of *Z. tritici* in northern France is not part of a single panmictic population, but instead, it is structured into different geographically distributed groups. The reasons of this structuration were not elucidated with our complementary analyses; further investigations are thus required to identify the factors responsible for such differentiation.

#### LITERATURE CITED

- Abrinbana, M., Mozafari, J., Shams-bakhsh, M., and Mehrabi, R. 2010. Genetic structure of *Mycosphaerella graminicola* populations in Iran. *Plant Pathol.* 59:829-838.
- Anon, A. 1996. The Evaluation of Forensic DNA Evidence. National Academy Press, Washington, DC.
- Asmussen, M. A., and Basten, J. C. 1994. Sampling theory for cyto-nuclear disequilibria. *Genetics* 138:1351-1363.
- Banke, S., and McDonald, B. A. 2005. Migration patterns among global populations of the pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Mol. Ecol.* 14:1881-1896.
- Boukef, S., McDonald, B. A., Yahyaoui, A., Rezgui, S., and Brunner, P. C. 2012. Frequency of mutations associated with fungicide resistance and population structure of *Mycosphaerella graminicola* in Tunisia. *Eur. J. Plant Pathol.* 132:111-122.
- Chen, F., Duan, G.-H., Li, D. L., and Zhan, J. 2017. Host resistance and temperature-dependent evolution of aggressiveness in the plant pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Front. Microbiol.* 8:1217.
- Cheval, P., Siah, A., Bomble, M., Popper, A. D., Reignault, Ph., and Halama, P. 2017. Evolution of QoI resistance of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in Northern France. *Crop Prot.* 92:131-133.
- Czembor, P. C., and Arseniuk, E. 1999. Study of variability among monopycnidial monopycnidiospore isolates derived from single pycnidia of *Stagonospora* ssp. and *Septoria tritici* with the use of RAPD-PCR, MP-PCR and rep-PCR techniques. *J. Phytopathol.* 147:539-546.
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., and Foster, G. D. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13:414-430.
- Drabešová, J., Ryšánek, P., Brunner, P., McDonald, B. A., and Croll, D. 2013. Population genetic structure of *Mycosphaerella graminicola* and quinone outside inhibitor (QoI) resistance in the Czech Republic. *Eur. J. Plant Pathol.* 135:211-224.
- Duvivier, M., Dedeurwaerder, G., De Proft, M., Moreau, J. M., and Legrève, A. 2013. Real-time PCR quantification and spatio-temporal distribution of airborne inoculum of *Mycosphaerella graminicola* in Belgium. *Eur. J. Plant Pathol.* 137:325-341.
- Earl, D. A., and vonHoldt, B. M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4:359-361.
- El Chartouni, L., Tisserant, B., Siah, A., Duyme, F., Durand, R., Halama, P., and Reignault, Ph. 2012. Evolution of *Mycosphaerella graminicola* at the wheat leaf and field levels. *Phytopathol. Meditr.* 51:332-339.
- El Chartouni, L., Tisserant, B., Siah, A., Duyme, F., Leducq, J. B., Deweer, C., Fichter-Roisin, C., Sanssené, J., Durand, R., Halama, P., and Reignault, P. 2011. Genetic diversity and population structure in French populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Mycologia* 103:764-774.
- Evanno, G., Regnaut, S., and Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Mol. Ecol.* 14:2611-2620.

- Excoffier, L., and Lischer, H. E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10:564-567.
- Eyal, Z. 1999. The *Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum* blotch diseases of wheat. *Eur. J. Plant Pathol.* 105:629-641.
- Falush, D., Stephens, M., and Pritchard, J. K. 2003. Inference of population structure: Extensions to linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164:1567-1587.
- Goodwin, S. B., Ben M'Barek, S., Dhillion, B., Wittenberg, A. H. J., Crane, C. F., Hane, J. K., Foster, A. J., Van der Lee, T. A. J., Grimwood, J., Aerts, A., Antoniw, J., Bailey, A., Bluhm, B., Bowler, J., Bristow, J., van der Burgt, A., Canto-Canche, B., Churchill, A. C. L., Conde-Ferràez, L., Cools, H. J., Coutinho, P. M., Csukai, M., Dehal, P., De Wit, P., Donzelli, B., van de Geest, H. C., van Ham, R. C. H. J., Hammond-Kosack, K. E., Henrissat, B., Kilian, A., Kobayashi, A. K., Koopmann, E., Kourmpetis, Y., Kuzniar, A., Lindquist, E., Lombard, V., Maliepaard, C., Martins, N., Mehrabi, R., Nap, J. P. H., Ponomarenko, A., Rudd, J. J., Salamov, A., Schmutz, J., Schouten, H. J., Shapiro, H., Stergiopoulos, I., Torriani, S. F. F., Tu, H., de Vries, R. P., Waalwijk, C., Ware, S. B., Wiebenga, A., Zwiers, L.-H., Oliver, R. P., Grigoriev, I. V., and Kema, G. H. J. 2011. Finished genome of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* reveals dispensome structure, chromosome plasticity and stealth pathogenesis. *PLoS Genet.* 7: e1002070.
- Goodwin, S. B., van der Lee, T. A., Cavaletto, J. R., Te Lintel Hekkert, B., Crane, C. F., and Kema, J. G. H. 2007. Identification and genetic mapping of highly polymorphic microsatellite loci from an EST database of the *Septoria tritici* blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genet. Biol.* 44:398-414.
- Grandaubert, J., Duthéil, J. Y., and Stukenbrock, E. H. 2017. The genomic rate of adaptation in the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *bioRxiv* 176727.
- Gurug, S., Goodwin, S. B., Kabbage, M., Bockus, W. W., and Adhikari, T. B. 2011. Genetic differentiation at microsatellite loci among populations of *Mycosphaerella graminicola* from California, Indiana, Kansas, and North Dakota. *Phytopathology* 101:1251-1259.
- Haubold, H., and Hudson, R. R. 2000. LIAN 3.0: Detecting linkage disequilibrium in multilocus data. *Bioinformatics* 16:847-848.
- Hunter, R., Coker, R. R., and Royle, D. J. 1999. The teleomorph stage, *Mycosphaerella graminicola*, in epidemics of *Septoria tritici* blotch on winter wheat in UK. *Plant Pathol.* 48:51-57.
- Jost, L. 2008.  $G_{ST}$  and its relatives do not measure differentiation. *Mol. Ecol.* 17:4015-4026.
- Kabbage, M., Leslie, J. F., Hulbert, S. H., and Bockus, W. W. 2009. Comparison of natural populations of *Mycosphaerella graminicola* from single fields in Kansas and California. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 74:55-59.
- Kema, G. H. J., van der Lee, T. A., Mendes, O., Verstappen, E. C., Lankhorst, R. K., Sandbrink, H., van der Burgt, A., Zwiers, L. H., Csukai, M., and Waalwijk, C. 2008. Large-scale gene discovery in the *Septoria tritici* blotch fungus *Mycosphaerella graminicola* with a focus on in planta expression. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21:1249-1260.
- Kema, G. H. J., Verstappen, E. C. P., Todorova, M., and Waalwijk, C. 1996. Successful crosses and molecular tetrad and progeny analyses demonstrate heterothallism in *Mycosphaerella graminicola*. *Curr. Genet.* 30:251-258.
- Linde, C. 2010. Population genetic analyses of plant pathogens: New challenges and opportunities. *Australas. Plant Pathol.* 39:23-28.
- Linde, C., Zhan, J., and McDonald, B. A. 2002. Population structure of *Mycosphaerella graminicola*: From lesions to continents. *Phytopathology* 92:946-955.
- McDonald, B. A., and Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40: 349-379.
- McDonald, B. A., and Mundt, C. C. 2016. How knowledge of pathogen population biology informs management of *Septoria tritici* blotch. *Phytopathology* 106:948-955.
- Meirmans, P. G. 2006. Using the AMOVA framework to estimate a standardized genetic differentiation measure. *Evolution* 60:2399-2402.
- Meirmans, P. G., and Hedrick, P. W. 2011. Assessing population structure:  $F_{ST}$  and related measures. *Mol. Ecol. Resour.* 11:5-18.
- Milgroom, M. G. 2015. *Population Biology of Plant Pathogens: Genetics, Ecology and Evolution*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:3321-3323.
- O'Driscoll, A., Kildea, S., Doohan, F., Spink, J., and Mullins, E. 2014. The wheat-*Septoria* conflict: A new front opening up? *Trends Plant Sci.* 19: 602-610.
- Owen, P. G., Pei, M., Karp, A., Royle, D. J., and Edwards, K. J. 1998. Isolation and characterization of microsatellite loci in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Mol. Ecol.* 7:1611-1612.
- Peakall, R., and Smouse, P. E. 2012. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - An update. *Bioinformatics* 28:2537-2539.
- Perrier, X., and Jacquemoud-Collet, J. P. 2006. DARwin software. <http://darwin.cirad.fr>
- Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Siah, A., Elbekali, A. Y., Ramdani, A., Reignault, P., Torriani, S. F. F., Brunner, P. C., and Halama, P. 2014. QoI resistance and mitochondrial genetic structure of *Zymoseptoria tritici* in Morocco. *Plant Dis.* 98: 1138-1144.
- Siah, A., Tissirant, B., El Chartouni, L., Duyme, F., Deweer, C., Fichter, C., Sanssené, J., Durand, R., Reignault, Ph., and Halama, P. 2010. Mating type idiomorphs from a French population of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*: Widespread equal distribution and low but distinct levels of molecular polymorphism. *Fungal Biol.* 114:980-990.
- Stukenbrock, E. H., and McDonald, B. A. 2008. The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46:75-100.
- Suffert, F., Ravigné, V., and Sache, I. 2015. Seasonal changes drive short-term selection for fitness traits in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:6367-6379.
- Suffert, F., and Sache, I. 2011. Relative importance of different types 679 of inoculum to the establishment of *Mycosphaerella graminicola* in wheat crops in north-west Europe. *Plant Pathol.* 60:878-889.
- Sundqvist, L., Keenan, K., Zackrisson, M., Prodöhl, P., and Kleinhans, D. 2016. Directional genetic differentiation and relative migration. *Ecol. Evol.* 6:3461-3475.
- Torriani, S. F. F., Brunner, P. C., and McDonald, B. A. 2011. Evolutionary history of the mitochondrial genome in *Mycosphaerella* populations infecting bread wheat, durum wheat and wild grasses. *Mol. Phylogenet. Evol.* 58: 192-197.
- Waalwijk, C., Mendes, O., Verstappen, E. C. P., Waard, M. A., and Kema, G. H. J. 2002. Isolation and characterisation of the mating type idiomorphs from the wheat *Septoria* leaf blotch fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genet. Biol.* 35:277-286.
- Welch, T., Feechan, A., and Kildea, S. 2017. Effect of host resistance on genetic structure of core and accessory chromosomes in Irish *Zymoseptoria tritici*. *Eur. J. Plant Pathol.* 150:139-148.
- Whitlock, M. C. 2011.  $G'_{ST}$  and D do not replace  $F_{ST}$ . *Mol. Ecol.* 20: 1083-1091.
- Yeh, F. C., Yang, R., and Boyle, T. 2000. Popgene 1.32. The user-friendly software for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, and CIFOR, Canada. <https://sites.ualberta.ca/~fyeh/index.html>
- Zhan, J., Kema, G. H. J., Waalwijk, C., and McDonald, B. A. 2002. Distribution of mating type alleles in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* over special scales from lesions to continents. *Fungal Genet. Biol.* 36:128-136.
- Zhan, J., Pettway, R. E., and McDonald, B. A. 2003. The global genetic structure of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* is characterized by high nuclear diversity, low mitochondrial diversity, regular recombination, and gene flow. *Fungal Genet. Biol.* 38:286-297.
- Zhong, Z., Marcel, T. C., Hartmann, F. E., Ma, X., Plissonneau, C., Zala, M., Ducasse, A., Confais, J., Compain, J., Lapalu, N., Amselem, J., McDonald, B. A., Croll, D., and Palma-Guerrero, J. 2017. A small secreted protein in *Zymoseptoria tritici* is responsible for avirulence on wheat cultivars carrying the *Sib6* resistance gene. *New Phytol.* 214:619-631.



## ANNEXE 4 : VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE

### Posters

- **Poster - 69ème International Symposium on Crop Protection (ISCP), Gand (2017)**  
Genetic diversity of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* at fine scales. M. Bomble, A. Siah, T. Cadalen, J-L. Hilbert, Ph. Reignault and P. Halama  
 *Prix poster*
- **Poster - Colloque international SFP-EFPP, Dunkerque (2017)**  
Investigation of the *fitness* of *Zymoseptoria tritici* in relationship with fungicide tolerance. M. Bomble, A. Siah, C. Tuffet, Ph. Reignault and P. Halama
- **Poster - Journées SFR Condorcet, Lille (2017)**  
Composantes du *fitness* de *Zymoseptoria tritici* en lien avec la résistance aux fongicides. M. Bomble, A. Siah, C. Tuffet, T. Cadalen, JL. Hilbert, Ph. Reignault et P. Halama
- **Poster - Journées SFR Condorcet, Calais (2018)**  
Relation entre le génotype et le phénotype pour la résistance aux inhibiteurs de la 14-alpha déméthylase chez *Zymoseptoria tritici* dans les Hauts de France. M. Bomble, A. Siah, M. Holvoet, C. Tuffet, C. Payet, J-L. Hilbert, Ph. Reignault, P. Halama
- **Poster - International Symposium on Cereal Leaf Blights 2019, Dublin (2019)**  
Status of *Zymoseptoria tritici* resistance to demethylation inhibitors in northern France. M. Bomble, M. Holvoet, C. Tuffet, C. Payet, A. Farce, J-L. Hilbert, P. Brunner, P. Halama, A. Siah
- **Poster - 14TH IUPAC International Congress of Crop Protection Chemistry - 71ème International Symposium on Crop Protection (ISCP), Gand (2019)**  
Effect of temperature on the expression of fungicide resistance in *Zymoseptoria tritici*  
C. Ugazio, M. Bomble, A. Siah, C. Payet, C. Tuffet, and P. Halama





## Communications orales

- **Communication orale - Journées Jeunes Chercheurs SFR Condorcet, Amiens (2018)**  
Etat des lieux de la résistance de *Zymoseptoria tritici* aux inhibiteurs de la 14-alpha déméthylase dans le Nord de la France.

M. Bomble, A. Siah, C. Tuffet, C. Payet, A. Farce, Ph. Reignault et P. Halama



*Prix meilleure communication orale*

- **Communication orale - 70ème International Symposium on Crop Protection (ISCP), Gand (2018)**  
Evolution of *Zymoseptoria tritici* resistance to 14 alpha-demethylase inhibitor in the Northern France : a update.

M. Bomble, A. Siah, C. Tuffet, C. Payet, A. Farce, Ph. Reignault and P. Halama



## Expériences pédagogiques

- Monitrice des travaux pratiques de biologie moléculaire « criblage de gène de résistance à la septoriose et à la rouille sur différentes variétés de blé » pour les ingénieurs de 4<sup>ème</sup> année (spécialité) et ingénieur en alternance (INGALT) d'Yncrea Hauts-de-France (avril 2016- avril 2019)
- TD sur les outils de marquages moléculaire chez les plantes pour les ingénieurs en alternance (INGALT) d'Yncrea Hauts-de-France (avril 2018)
- Vacataires en biologie végétale pour les ADIMAKER 1ère année (parcours transversal) à Yncrea Hauts-de-France : cours et TD sur la cellule végétale et les applications de la culture *in vitro* puis travaux pratiques sur la culture *in vitro* de l'endive (janvier-juin 2019)

## Résumé de la thèse

*Zymoseptoria tritici*, causant la septoriose, est aujourd'hui l'agent pathogène le plus fréquent et le plus nuisible sur les cultures de blé, en particulier en France et dans le nord-ouest de l'Europe. La lutte contre *Z. tritici* repose essentiellement sur l'utilisation des fongicides, mais le champignon développe régulièrement des résistances à ces derniers, dont les inhibiteurs de la 14- $\alpha$ -déméthylase (IDM), l'une des familles les plus utilisées au champ. Toutefois, aucune étude approfondie n'a jusqu'ici été réalisée sur *Z. tritici* pour caractériser ses résistances aux IDM dans le nord de la France, où le blé est soumis à de fortes pressions de traitements. Ainsi, 100 souches monospores de *Z. tritici* ont été isolées dans cette région, et préalablement identifiées comme différents génotypes à l'aide de marqueurs microsatellites, ont été caractérisés pour leur statut de résistance aux IDM. Le séquençage du gène *cyp51* a mis en évidence 18 altérations (dont cinq nouvelles) au niveau la protéine CYP51, la cible des IDM, distribuées en 23 haplotypes (combinaisons). Une modélisation *in silico* suggère que, parmi les cinq nouvelles altérations identifiées, seules deux d'entre elles (F218L et L385M) peuvent réduire l'affinité des IDM au site catalytique de la CYP51 et donc potentiellement impacter la résistance. Un criblage moléculaire a permis de détecter, dans la population étudiée, 22 souches présentant des mécanismes de résistance additionnels (15 souches surexprimant le gène *cyp51* et 7 souches multidrug resistant, MDR). Les souches possédant des mécanismes de résistance additionnels ont présenté *in vitro* des niveaux de résistance plus élevés à cinq IDM (époxiconazole, prothioconazole, metconazole, tébuconazole et prochloraz). De façon intéressante, les altérations sur la CYP51 est le mécanisme qui contribue le plus au niveau de résistance aux IDM (de 62 à 99 % du niveau de résistance totale observé, en fonction de la matière active considérée), suivi du caractère MDR (1 à 24 %) et de la surexpression du gène *cyp51* (0 à 14 %). En revanche, aucune corrélation claire entre les altérations détectées et les niveaux de résistance phénotypiques ( $CI_{50}$ ) n'a été décelée, mais la présence d'autres mécanismes non-connus impliqués dans la résistance est suggérée, suite à l'observation d'une grande variabilité de  $CI_{50}$  pour des souches ayant le même profil moléculaire pour les trois mécanismes étudiés. Pour évaluer la *fitness* des souches hautement résistantes, en particulier MDR, 50 souches ont été évaluées pour leurs adaptations aux contraintes environnementales comme le stress thermique mais aussi pour des traits du pouvoir pathogène (taux de symptômes, sporulation et taille des pycnidiospores) et de compétition. En conditions *in vitro* et en présence d'IDM, les souches MDR possèdent une meilleure croissance pour toutes les températures testées (5, 10, 15, 20, 25 et 30 °C), suggérant que les variabilités thermiques saisonnières et les changements climatiques n'impacteraient pas l'expression du caractère MDR chez *Z. tritici*. En conditions *in planta*, sur deux cultivars de blé et en absence de fongicides, aucun

coût de *fitness* concernant le pouvoir pathogène n'a été observé pour les souches présentant des mécanismes de résistance additionnels. Toutefois, des co-inoculations de souches MDR vs non-MDR ont montré que les souches MDR présentent une plus faible compétitivité comparativement aux souches non-MDR. L'ensemble de ces résultats fournis de nouvelles données sur le *fitness* des souches MDR de *Z. tritici* et met en lumière de nouvelles pistes d'études pour mieux comprendre leurs propagations.

**Mot clé de la thèse :** Blé, *Zymoseptoria tritici*, IDM, *fitness*, fongicide, température