



HAL
open science

Effet de la sélection fluctuante sur le pathogène du blé *Zymoseptoria tritici* par une approche d'évolution expérimentale

Arthur Jallet

► **To cite this version:**

Arthur Jallet. Effet de la sélection fluctuante sur le pathogène du blé *Zymoseptoria tritici* par une approche d'évolution expérimentale. Génétique des populations [q-bio.PE]. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS349 . tel-02598929

HAL Id: tel-02598929

<https://theses.hal.science/tel-02598929>

Submitted on 16 May 2020

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

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

Effet de la sélection fluctuante sur le pathogène du blé *Zymoseptoria tritici* par une approche d'évolution expérimentale

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

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

Thèse présentée et soutenue à Thiverval-Grignon, le 23/10/2019, par

Arthur Jallet

Composition du Jury :

Christine Dillmann Professeure, Université Paris-Sud, UMR 8120	Président
Juliette de Meaux Professeure, Université de Cologne, Botanical Institute	Rapporteur
Olivier Tenaillon Directeur de recherche, INSERM, UMR 1137	Rapporteur
Antoine Branca Maître de conférences, Université Paris-Sud, UMR 8079	Examineur
Anne Genissel Chargée de recherche, INRA, UMR 1290	Directeur de thèse
Arnaud Le Rouzic Chargé de recherche, CNRS, UMR 247	Invité



REMERCIEMENTS

Je remercie vivement l'ensemble des membres de mon jury de thèse – Mme Dillmann, Mme De Meaux, Mme Beldade, M. Tenaillon, M. Branca – d'avoir accepté d'examiner les travaux présentés dans ce manuscrit ainsi que pour l'intérêt qu'ils ont montré à l'égard du sujet de thèse. Leurs retours et leurs éclairages seront de manière certaine bénéfiques et je les en remercie par avance.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres, qu'ils soient permanents ou non, de Bioger. Merci au directeur Thierry et à tous ceux – et ils sont nombreux – qui ont une responsabilité dans la vie du laboratoire. Merci tout particulièrement à Cindy qui, tout au long de l'année, organise des moments conviviaux que tous attendent. Je remercie également tous les membres des services communs de l'Unité, et notamment : Martin, toujours prêt à dépanner en cas de soucis d'ordre technique, comme lors des (trop !) nombreux caprices de la machine à glace ; Bruno, pour avoir supporté le rythme très soutenu de turnover des Erlen de 1L lorsque j'en utilisais jusqu'à 12 par semaine ; et Isabelle, pour sa bonne humeur inaltérable et son efficacité à toutes épreuves. Je suis également très reconnaissant à Anaïs, qui m'a initié aux joies de l'ATMT et sans qui une importante partie des résultats obtenus n'aurait pas vu le jour ; à Bérangère pour sa pédagogie et l'entrain avec lequel elle m'a appris le fonctionnement des différents microscopes de l'Unité ; et à Henriette, qui a isolé – bien avant mon arrivée – les deux souches de *Z. tritici* qui allaient devenir mon quotidien (ou presque) pendant ces trois ans. Merci également à Philippe d'avoir fait en sorte que je puisse mener les analyses bio-informatiques sur un PC ... ce qui parfois relève de l'exploit !

Je tiens ensuite à remercier l'ensemble des membres et stagiaires de l'équipe EGIP que j'ai pu croiser au cours de mon doctorat (Nas, Axel, Masum et Frédérique). Merci particulièrement à Marc-Henri pour l'accueil qu'il a su me réserver à mon arrivée et pour avoir contribué, tout au long de ces trois années, à maintenir une ambiance de travail décontractée, entrecoupée de papillotes lors des périodes de fêtes et de calissons à ses retours du Sud de la France lors des périodes estivales. Je garde également de très bons souvenirs des repas intra-équipe à l'issue de nos réunions, que ces repas aient eus lieu au laboratoire ou à l'extérieur. Je remercie également Guillaume pour son soutien en bio-informatique et sa promptitude à identifier les quelques erreurs de code que j'avais pu faire dans mes scripts. Je remercie également Sandrine avec qui avons beaucoup échangé (et plaisanté). Enfin, je remercie Anne,

ma directrice de thèse, pour la liste suivante des aides qu'elle a pu m'apporter : préparation au concours de l'Ecole Doctorale, soutien en bio-informatique, écriture d'articles et correction du présent manuscrit. Merci également à elle pour l'ouverture scientifique qu'elle a su m'apporter par nos discussions régulières mais également en me permettant de « sortir du labo » pour aller écouter de nombreuses conférences.

L'ensemble des membres de mon comité de thèse – Arnaud, Christophe, Henrike, Jacqui et Violaine – m'ont également apporté de précieux conseils et je les en remercie. Ils ont su me suggérer des priorités lorsque j'envisageais d'explorer de trop nombreuses pistes ou alors lorsque je cherchais à trop contextualiser certains de mes résultats dans un cadre agro-socio-climatique.

Merci également aux membres de l'Unité EGCE du CNRS de Gif-sur-Yvette avec qui nous avons collaboré de manière régulière. Nos réunions à quatre avec Anne, Andréas et Arnaud étaient toujours très prolifiques et inspirantes (et ne se déroulaient jamais bien loin d'un tableau blanc sur lequel nous cherchions à convaincre – parfois nous même ! – de la pertinence des idées que nous avançons). Ces réunions ont été pour moi l'occasion de me confronter à la modélisation en biologie et cette expérience, bien que n'ayant pour l'heure pas débouché sur des travaux conjoints articulant résultats théoriques et empiriques, fut pour moi une expérience très enrichissante. Je suis également reconnaissant à David pour avoir mis à notre disposition le séquenceur MinION (et les *flow-cell*) dont dispose leur laboratoire à Gif-sur-Yvette.

Ce doctorat a également été l'occasion de rencontrer des enseignants-chercheurs ainsi que d'autres doctorants de la cadre de la mission d'enseignement que j'ai effectué deux années durant à l'Université Paris Sud. Merci à Florence H. d'avoir pris le temps de m'expliquer comment allait se dérouler ma toute première séance (qui n'était rien de moins qu'une séance de Travaux Pratiques demandant beaucoup d'organisation, bien que prenant souvent pour les étudiants l'apparence d'un jeu). Je remercie également Florence M. et Khaled pour tout le temps qu'ils consacraient à faire en sorte que l'organisation des séances se déroule pour le mieux, ce qui est loin d'être évident pour une UE avec plus d'une quinzaine de groupes à gérer au total. Merci enfin aux différents étudiants que j'ai été amené à rencontrer lors du monitorat ou à encadrer au laboratoire (et notamment à Julie, qui a un peu « essuyé les plâtres » lors de son stage alors que je venais à peine d'arriver au laboratoire et ne possédais pas encore toutes mes marques).

Je souhaite également vivement remercier les personnes qui ont partagé le bureau avec moi, et notamment la *dream team* initiale, composée de Jean-Félix, Johann, Marie-Pierre et Guillaume R. Merci également à Agathe, Gwilherm et Claire-Line pour les bons moments passés ensemble, que ce soit à éplucher les horoscopes ou dans les couloirs du laboratoire entre deux manip. Je garde aussi de très bons souvenirs avec Oriane, Romaric et Baptiste au début de l'année 2018 (lorsque la neige tombait à gros flocons) ou encore avec Jaafar, Clémentine et Yohann à l'occasion de sa mémorable soutenance de thèse. Enfin, merci à Alex, Colin, Elise, Guillaume F. et Safa pour les agréables moments passés ensemble lors du congrès des doctorants du département SPE à Nice, lors de ma 2^{ème} année.

Merci également aux différentes personnes avec qui j'ai habité au Pavillon 2A : Julie, Ophélie, Sixtine, Anne-Raphaëlle, Kevin, Valentin et Anaïs ... sans oublier Kicia ! J'ai rencontré au cours de mon séjour à la Côte à Soulas de merveilleuses personnes, qu'ils soient ex-doctorants grignonnais, habitants de la « Cité », ou simplement de passage. Avec eux, je garde le souvenir d'une époque formidablement bienveillante et emplie d'amitié. Merci à eux, et notamment à Julie et Ophélie, de m'avoir pleinement intégré à cette joyeuse troupe avec qui j'ai skié, bu du vin jurassien et écouté des concerts à La Courneuve. Ces personnes, j'aimerais les nommer toutes : Laurette, Gaspard, Clémence, Florence, Damien, Guillaume N, Marie, Anaïs et Olivier.

Merci enfin à ma famille (et à Kirikou) de m'avoir soutenu tout au long de ces trois ans de thèse, je leur suis très reconnaissant et sais tout ce que je leur dois. Merci également à Maï pour son accueil à deux reprises dans le Haut-Languedoc, à chaque fois sous une chaleur étouffante qui nous permettait de passer des après-midi endiablées à jouer au Scrabble. Enfin, un immense MERCI à Camille.

Table des matières

1.	INTRODUCTION GENERALE	1
1.1.	Zymoseptoria tritici, un champignon pathogène du blé	1
1.1.1.	Description du modèle fongique	1
1.1.2.	Enjeux agronomique et économique liés à la septoriose du blé et moyens de lutte	1
1.1.3.	Description du cycle biologique de <i>Z. tritici</i>	3
1.1.4.	Implication de certaines classes de molécules à différentes phases de l'infection du blé	7
1.1.5.	Histoire évolutive de <i>Z. tritici</i> et domestication jointe à celle de l'hôte	9
1.1.6.	Principales caractéristiques du génome de <i>Z. tritici</i>	12
1.1.7.	Déterminisme génétique de la virulence chez <i>Z. tritici</i>	16
1.1.8.	Diversité génétique chez <i>Z. tritici</i> et structure des populations	18
1.1.9.	Etudes en laboratoire et rôle d'un facteur abiotique : la température	20
1.2.	Conséquences évolutives des variations environnementales	24
1.2.1.	Les êtres vivants évoluent dans un environnement changeant	24
1.2.2.	Evolution et adaptation en conditions environnementales fluctuantes	26
1.3.	Plasticité phénotypique en réponse aux variations environnementales	32
1.3.1.	Définition de la plasticité phénotypique	32
1.3.2.	Evolution de la plasticité phénotypique	34
1.3.3.	Caractère adaptatif de la plasticité phénotypique	35
1.3.4.	Devenir de la plasticité phénotypique au cours des processus adaptatifs et rôle des fluctuations environnementales	39
1.3.5.	La plasticité phénotypique : un frein ou un moteur de l'évolution ?	44
1.4.	Des changements d'environnement comme moteurs de l'évolvabilité des systèmes biologiques	46
1.4.1.	Définition et apport des études d'évolution expérimentale menées sur des micro-organismes	46
1.4.2.	Evolvabilité et mécanismes d'accumulation de variation génétique cryptique	48
1.4.3.	Fluctuations environnementales et maintien d'un potentiel évolutif	50
1.4.4.	Les changements environnementaux comme révélateurs des effets de l'évolvabilité ?	52
1.5.	Evolution expérimentale des populations de micro-organismes en laboratoire	54
1.5.1.	Définition et présentation des avantages des approches d'évolution en conditions contrôlées	54
1.5.2.	Quelques exemples d'adaptations (et leur base génétique) lors d'expériences d'évolution expérimentale menées sur divers types d'organismes modèles	55

1.5.3.	Devenir des mutations apparues <i>de novo</i> au cours de l'évolution à partir d'une population clonale.....	57
1.5.4.	Interférence clonale et auto-stop génétique : deux phénomènes aux conséquences importantes lors de l'évolution de populations asexuées	59
1.6.	Une expérience d'évolution expérimentale réalisée au laboratoire sur <i>Zymoseptoria tritici</i>	63
1.7.	Objectifs	64
2.	CHAPITRE 1 : Evolution and plasticity of the transcriptome under temperature fluctuations in the fungal plant pathogen <i>Zymoseptoria tritici</i>	66
2.1.	Introduction	66
2.2.	Article : Evolution and plasticity of the transcriptome under temperature fluctuations in the fungal plant pathogen <i>Zymoseptoria tritici</i>	68
3.	CHAPITRE 2 : Estimation de la fitness relative des lignées évoluées soumises à différents régimes de température	139
3.1.	Introduction	139
3.2.	Matériels et méthodes	143
3.2.1.	Caractérisation préliminaire de la croissance des deux souches ancestrales.....	143
3.2.2.	Transformation par ATMT (<i>Agrobacterium tumefaciens</i> mediated transformation) .	143
3.2.3.	Mesure de la fitness relative par test de compétition	146
3.2.4.	Estimation de la taille des cellules.....	151
3.2.5.	Analyses statistiques	152
3.3.	Résultats	156
3.3.1.	Vérification préliminaire de la croissance exponentielle des deux souches ancestrales	156
3.3.2.	Effet de la densité initialement inoculée sur le nombre final de cellules	158
3.3.3.	Croissance des ancêtres à partir des données obtenues lors des tests de fitness	158
3.3.4.	Estimation de la fitness relative des différentes lignées.....	161
3.3.5.	Estimation de la fitness relative des différentes lignées sur l'ensemble des tests réalisés.....	167
3.3.6.	Evolution de la taille moyenne des cellules et lien avec les gains de fitness mesurés	170
3.3.7.	Mise en évidence d'un biais technique	172
3.4.	Discussion	175
4.	CHAPITRE 3 : Consequences of <i>in vitro</i> evolution on the virulence of the pathogen <i>Zymoseptoria tritici</i>	179
4.1.	Introduction	179
4.2.	Article : Consequences of <i>in vitro</i> evolution on the virulence of the pathogen <i>Zymoseptoria tritici</i>	183
5.	DISCUSSION GENERALE	209

5.1.	Discussion des principaux résultats	209
5.1.1.	Implication de certains gènes lors de l'adaptation aux fluctuations.....	209
5.1.2.	Répétabilité de l'évolution du niveau d'expression des gènes et mécanismes moléculaires sous-jacents au parallélisme observé entre réplicas d'évolution.....	210
5.1.3.	Aspects génétiques de l'adaptation de <i>Z. tritici</i> en conditions de laboratoire	211
5.1.4.	Plasticité du transcriptome en réponse aux changements de température	214
5.1.5.	Vers une intégration des données transcriptomiques et des données de fitness relative.....	216
5.2.	Perspectives	218
5.2.1.	Une caractérisation de la dynamique et de la répétabilité de l'évolution à poursuivre	218
5.2.2.	Stratégies envisagées pour décrypter le rôle des changements génétiques dans l'évolution du niveau d'expression	219
5.2.3.	Un rôle des processus épigénétiques qui reste à déterminer lors de notre expérience	220
5.2.4.	Caractérisation des gènes dont l'expression est plastique : des questions encore en suspens.....	221
5.2.5.	Vers une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents aux pertes de pathogénicité observées	221
5.2.6.	De l'intérêt de développer des approches de génomique en laboratoire chez <i>Z. tritici</i>	222
6.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	224
7.	ANNEXES	242

Liste des figures présentées en introduction générale

Figure I. 1 - Emplacement phylogénétique de quelques phytopathogènes au sein des Eumycètes et de <i>Z. tritici</i> au sein des Ascomycètes.....	2
Figure I. 2 - Cycle épidémiologique de <i>Z. tritici</i>	4
Figure I. 3 - Développement asexué de <i>Z. tritici</i> au cours de l'infection du blé.....	6
Figure I. 4 - Comparaison du nombre de gènes annotés comme codant des protéases ou des enzymes capables de dégrader les glucides de la paroi végétale dans le génome de <i>Z. tritici</i> avec ceux de quelques autres espèces de champignons.....	8
Figure I. 5 - Variation du niveau d'expression de molécules anti-stress oxydatif au cours de l'infection du blé par <i>Z. tritici</i>	10
Figure I. 6 - Estimation de la biomasse fongique au cours de l'infection de feuilles de blé par <i>Z. tritici</i>	11
Figure I. 7 - Représentation schématique des 21 chromosomes de la souche de référence IPO-323 de <i>Z. tritici</i>	13
Figure I. 8 - Caractéristiques génétiques et épigénétiques connues différenciant les chromosomes essentiels et les chromosomes accessoires de <i>Z. tritici</i>	15
Figure I. 9 - Dynamique des chromosomes accessoires chez les champignons phytopathogènes	17
Figure I. 10 - Deux scénarios de coévolution entre populations d'hôtes et de pathogènes.....	19
Figure I. 11 - Polymorphisme de présence-absence de gènes et pangénome de <i>Z. tritici</i> : apport des technologies de séquençage de 3 ^{ème} génération	22
Figure I. 12 - Structure génétique des populations de <i>Z. tritici</i> à l'échelle mondiale	23
Figure I. 13 - Conséquences phénotypiques de différents types de sélection sur la distribution des phénotypes au sein des populations.....	27
Figure I. 14 - Effets génétique, environnemental et de l'interaction génotype-par-environnement sur la variation d'un trait quantitatif.....	33
Figure I. 15 - Caractère adaptatif ou mal-adaptatif d'une réponse plastique.....	36
Figure I. 16 - Orientation du caractère adaptatif ou non d'une réponse plastique grâce à différents génotypes localement adaptés à leur environnement	38
Figure I. 17 - Effet Baldwin et assimilation génétique : des conséquences différentes sur le niveau de plasticité à l'issue de l'adaptation	40
Figure I. 18 - Réponse transcriptomique adaptative suite à un changement environnemental	43
Figure I. 19 - Plasticité adaptative lors d'un changement d'environnement et délai de survie	45
Figure I. 20 - Révélation de l'effet phénotypique de la variation génétique cryptique à l'issue d'un changement d'environnement : cas où cette variation est adaptative lors du passage vers un nouvel environnement.....	53
Figure I. 21 - Conséquence de la reproduction asexuée sur l'évolution des fréquences de mutations.....	61
Figure I. 22 - Représentation schématique de quelques mécanismes évolutifs classiquement observés lors d'expériences d'évolution de populations asexuées en laboratoire	62

Liste des figures et tableaux présentés au Chapitre 1

Figures

Figure 1 - Schema describing the Evolve-and-Resequence approach starting from two lab clones of <i>Z. tritici</i>	102
Figure 2 - Venn diagram displaying unique and shared DEGs due to the selection regimes, the temperature of assay and the ancestral genetic background	103
Figure 3 - Comparison of significant genes between the two replicates of evolution under fluctuation	104
Figure 4 - Comparison of gene expression evolution between the stable and fluctuating regimes, for the set of genes with repeated significance in fluctuating regime	105
Figure 5 - Whole genome distribution of significant genes for a selection regime effect	107
Figure 6 - Cumulative distribution of the gene connectivity for all genes included in the 8 selected modules revealed by WGCNA	108
Figure 7 - Evolution of plasticity for each selection regime	109

Tables

Table 1 - Distribution of transcribed genes among chromosomes (Deseq2 model (1))	110
Table 2 - Total percent variance of gene expression explained from DESeq2 Model (2) (ANOVA)....	111
Table 3 - Number of DEGs from the gene expression level in the ancestor, associated with the selection regime and the temperature of assay	112

Liste des fichiers supplémentaires associés au Chapitre 1

Additional File 1.....	113
Additional File 2.....	114
Additional File 3.....	117
Additional File 4.....	119
Additional File 5.....	120
Additional File 6.....	124
Additional File 7.....	125
Additional File 8.....	126
Additional File 9.....	133
Additional File 10.....	136
Additional File 11.....	138

Liste des figures et tableaux présentés au Chapitre 2

Figures

Figure II. 1 - Suivi de la dynamique de croissance des deux populations ancestrales sur six jours de culture à 23°C	157
Figure II. 2 - Densité finale atteinte par les populations ancestrales lors des tests de compétition en fonction de la quantité initialement inoculée.....	159
Figure II. 3 - Taux de croissance des deux clones ancestraux	160
Figure II. 4 - Fitness relative des lignées évoluées	162
Figure II. 5 - Densité de cellules à l'issue des tests de compétition	166
Figure II. 6 - Fitness relative des différentes lignées à partir de l'ensemble des conditions testées..	168

Figure II. 7 - Taille des spores produites par les différentes lignées	171
Figure II. 8 - Corrélation entre fitness relative et taille des spores	173
Figure II. 9 - Mise en évidence d'un biais technique lors de la procédure automatisée d'analyse d'images	174

Tableaux

Tableau 1 - Gains de fitness des lignées évoluées	162
Tableau 2 - Comparaisons des gains de fitness selon l'environnement thermique testé	164
Tableau 3 – Gains moyens de fitness présentés par les lignées ayant évolué dans les différents régimes	168
Tableau 4 - Différentiel de fitness relative selon le régime d'évolution expérimenté par les différentes lignées.....	169
Tableau 5 - Comparaisons deux à deux de la taille des spores produites par les lignées de même fond génétique.....	171

Liste des figures et tableaux présentés au Chapitre 3

Figures

Figure 1 - Experimental evolution design prior to in planta phenotyping	199
Figure 2 - Overall disease symptom distribution for the six bread wheat cultivars.....	200
Figure 3 - Symptoms for each wheat cultivar-fungal genotype interaction	201
Figure 4 - Whole genome sequencing confirms the presence of 21 chromosomes for all lineages .	202
Figure 5 - Number of variable SNPs and short insertion deletions in 10kb sliding windows, with an overlap of 100bp	203
Figure 6 - Number of mutations in genes annotated in <i>Z. tritici</i> secretome for the genetic background MGGP01 and MGGP44	206

Tables

Table 1 - Comparisons of symptom development between the lineages exposed to different selection regimes.....	207
Table 2 - Total number of small scale mutations identified per evolved lineage	208

Liste des Annexes

Annexe 1 - Diversité génétique, densité d'éléments transposables et polymorphisme de présence-absence d'effecteurs le long du génome de <i>Z. tritici</i>	242
Annexe 2 - Diversité des populations de <i>Z. tritici</i> à l'échelle mondiale	243
Annexe 3 - Plasmide porté par la souche PYSKH4 d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> utilisée lors de la transformation par ATMT des souches de <i>Z. tritici</i>	244
Annexe 4 - Composition du milieu d'induction (MI) utilisé lors des transformations par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	245
Annexe 5 - Composition du milieu minimum (MM) utilisé lors des transformations par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	246
Annexe 6 - Noms des huit lignées évoluées caractérisées lors des tests de compétition et régimes d'évolution correspondants	247
Annexe 7 - Représentation schématique du protocole d'estimation de la fitness relative à l'issue des tests de compétition	248

Annexe 8 - Distribution du nombre de cellules par photographie au microscope à épifluorescence, à partir de l'ensemble des tests de fitness réalisés	249
Annexe 9 - Code du plugin ImageJ utilisé lors du traitement automatisé d'analyse d'images.....	250
Annexe 10 - Statistiques sur les gains de fitness des lignées évoluées.....	251
Annexe 11 - Statistiques sur les gains de fitness selon l'environnement thermique testé	252
Annexe 12 - Statistiques sur les densités de cellules atteintes par les différentes lignées à l'issue des tests de compétition, dans les différents environnements thermiques.....	253
Annexe 13 - Statistiques sur les gains moyens de fitness présentés par les lignées ayant évolué dans les différents régimes	254
Annexe 14 - Différentiel de fitness relative selon le régime d'évolution expérimenté par les différentes lignées.....	255
Annexe 15 - Evolution du niveau d'expression de certains gènes plastiques chez l'ancêtre par rapport à la direction de la plasticité ancestrale	256
Annexe 16 - Lien entre évolution du transcriptome dans les différents régimes et fitness relative des lignées de fond génétique MGGP01	257
Annexe 17 - Lien entre évolution du transcriptome dans les différents régimes et fitness relative des lignées de fond génétique MGGP44	258
Annexe 18 - Fitness relative des lignées en conditions de fluctuations thermiques et plasticité de leur transcriptome en réponse à un changement de température	259

Liste des abréviations

AC : *Accessory chromosome*

ASE : *Allele-specific expression*

CC : *Core chromosome*

DE : *Differentially expressed / différentiellement exprimé*

DPI : *Day post-inoculation*

EE : *Evolution expérimentale*

FDR : *False discovery rate*

FPKM : *Fragment per kilobase per million reads*

G-by-E : *Génotype-par-environnement*

GFP : *Green fluorescent protein*

GO : *Gene ontology*

GWAS : *Genome-wide association studies*

HSP : *Heat shock proteins*

LRT : *Likelihood ration test*

MI : *Milieu d'induction*

MM : *Milieu minimum*

NGS : *Next-generation sequencing*

PDA : *Potato Dextrose Amidon*

PDB : *Potato Dextrose Browth*

(e)QTL : *(expression) Quantitative trait locus*

RFLP : *Restriction fragment length polymorphism*

ROS : *Reactive oxygen species*

RPM : *Revolution per minute*

SNP : *Single nucleotide polymorphism*

STB : *Septoria tritici blotch*

TE : *Transposable element*

YPD : *Yeast poptato dextrose*

1. INTRODUCTION GENERALE

1.1. *Zymoseptoria tritici*, un champignon pathogène du blé

1.1.1. Description du modèle fongique

Zymoseptoria tritici (syn. *Mycosphaerella graminicola*, **Quaedvlieg et al. 2011**) est un champignon appartenant à la division des Ascomycètes, l'un des deux principaux phylums d'Eumycètes, avec les Basidiomycètes. Les Ascomycètes regroupent de nombreux phytopathogènes (**Dean et al. 2012**) Au sein de ce phylum, *Z. tritici* appartient à la classe des Dothideomycètes, classe comprenant de nombreux pathogènes de plantes cultivées tels que *Leptosphaeria maculans* (pathogène du colza) ou certaines espèces appartenant aux genres *Alternaria* et *Stagonospora*. La position phylogénétique des Dothideomycètes au sein des Eumycètes est représentée sur la **Figure I. 1**. *Z. tritici* est une espèce pathogène du blé capable d'infecter le blé tendre (*Triticum aestivum*) et le blé dur (*Triticum durum*) et est responsable d'une maladie foliaire appelée septoriose du blé. Ce terme est communément utilisé pour décrire les symptômes causés par un complexe d'autres espèces sur le blé (au premier rang desquelles *Parastagonospora nodorum*) (**Quaedvlieg et al. 2013**), mais nous considérerons ici qu'il y a équivalence entre septoriose du blé et infection par *Z. tritici*.

1.1.2. Enjeux agronomique et économique liés à la septoriose du blé et moyens de lutte

La culture du blé revêt une importance majeure faisant du contrôle des épidémies de septoriose un enjeu fondamental (**O'Driscoll et al. 2014 ; Fones & Gurr 2015**). Avec le maïs et le riz, le blé est en effet l'une des principales céréales cultivées au rang mondial (<https://www.passioncereales.fr/>), avec environ 750 millions de tonnes produites en 2016, volume représentant approximativement 150 milliards US\$ (<https://www.ers.usda.gov/>). Les principales régions productrices (Chine, Inde, Europe, Amérique du Nord, Australie, Moyen-Orient) sont toutes affectées par la septoriose. Les pertes de rendement causées par la maladie varient entre 5% et 20%, faisant de la septoriose l'une des principales maladies du blé (**Figuroa et al. 2018**). On note toutefois une plus forte sévérité des symptômes dans les régions tempérées où la pluviométrie peut être importante et principalement en Europe de l'ouest – France, Allemagne, Royaume-Uni – où des pertes atteignant jusqu'à 40-50% ont été enregistrées au plus fort des épidémies (**Fones & Gurr 2015**). Ainsi, en Europe, plus de 70%

des fongicides utilisés pour traiter les cultures de blé en 2014 visaient à contrôler les épidémies de septoriose et à maintenir les populations de *Z. tritici* à un faible niveau (Torriani et al. 2015).

Globalement, les deux principaux moyens de lutte contre les épidémies de septoriose sont la lutte chimique *via* l'utilisation de fongicides ainsi que la lutte agronomique (principalement par acquisition dans le blé de gènes conférant un niveau de résistance). Comme nous le verrons par la suite, les populations de *Z. tritici* sont extrêmement polymorphiques et possèdent donc un potentiel adaptatif très important rendant leur contrôle difficile. Ce potentiel est exprimé de manière d'autant plus efficace que dans nos agro-écosystèmes actuels les pressions de sélection, notamment imposées par la domination de seulement quelques cultivars possédant un fond génétique assez semblable, sont très uniformes (Stukenbrock & McDonald 2008 ; Möller & Stukenbrock 2017). Ainsi, certains cas de contournements de la résistance à la septoriose ont été identifiés sur deux cultivars résistants quelques années seulement après leur introduction aux Etats-Unis (Cowger et al. 2000 ; Krenz et al. 2008). Face à ces adaptations rapides, un consensus émerge quant aux moyens d'enrayer de façon plus durable les contournements de résistance : augmenter la variabilité génétique des blés cultivés (McDonald 2014 ; McDonald & Mundt 2016). Cette variabilité peut se manifester de manière spatiale avec par exemple des mélanges de différents cultivars (portant éventuellement différents gènes de résistance) au sein d'une même parcelle ou en y associant des variétés paysannes mais également de manière temporelle en prévoyant des rotations d'une saison à l'autre. De même, dans la mesure où de nombreux cas de résistance aux fongicides ont été rapportés chez *Z. tritici* (Brunner et al. 2008 ; Torriani et al. 2009 ; Cools et al. 2011 ; Estep et al. 2013 ; Estep et al. 2015 ; McDonald et al. 2019), exploiter la variabilité de modes d'action que présentent les diverses classes de fongicides disponibles sur le marché devrait permettre de ralentir l'apparition de telles résistances.

1.1.3. Description du cycle biologique de *Z. tritici*

Z. tritici est une espèce dimorphique, c'est-à-dire qu'au cours d'un cycle de développement le champignon alterne entre une forme filamenteuse caractérisée par la formation d'hyphes croissant aux extrémités et produisant de multiples ramifications et une forme qualifiée de « levure » avec formation de spores par mitoses successives et bourgeonnement (Steinberg 2015 ; Francisco et al. 2019). Le cycle épidémiologique de *Z. tritici* au cours d'une saison de culture du blé est représenté sur la **Figure 2**. A la différence de la plupart des champignons pénétrant à l'intérieur d'un tissu sain, *Z. tritici* pénètre à l'intérieur

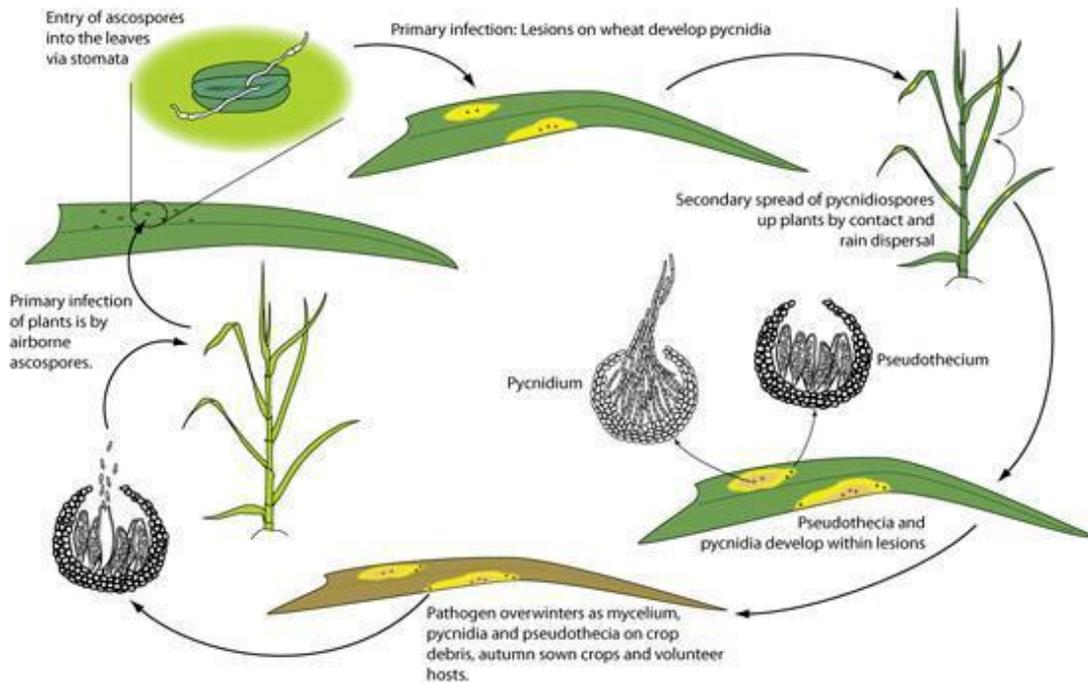


Figure I. 2 - Cycle épidémiologique de *Z. tritici*

Durant l'automne, des ascospores de *Z. tritici* sont produites par reproduction sexuée sur les résidus de la culture de blé précédente (feuille marron, représentée en bas). Ces ascospores, dispersées par le vent, sont déposées sur les feuilles de nouveaux plants de blé : les ascospores constituent l'inoculum primaire du champignon sur la plante hôte. Les ascospores s'allongent pour former des hyphes mycéliens, leur permettant de pénétrer à l'intérieur de la feuille. En quelques semaines, les premières lésions foliaires apparaissent et des quantités importantes de pycnidiospores sont produites par reproduction asexuée au niveau des pycnides. Ces pycnidiospores sont dispersées à faible distance au sein d'un même plant ou entre plants adjacents par éclaboussures. Ce type de spores est ainsi qualifié d'inoculum secondaire. Avant la fin de la saison de culture, quelques cycles de reproduction sexuée auront éventuellement le temps de se produire et les ascospores en résultant pourront aller coloniser des plants de blé parfois situés beaucoup plus loin (jusqu'à plusieurs km).

D'après **Ponomarenko et al. 2012**, Figure 17

des feuilles de blé directement par les ouvertures naturelles que représentent les stomates, sans avoir à recourir à la production de structures spécialisées (telles les appressoria, notamment utilisés lors de l'infection du riz *Oryza sativa* par le pathogène *Magnaporthe oryzae*). Des observations ont montré que la croissance mycélienne sur l'épiderme foliaire n'est pas totalement aléatoire (**Kema et al. 1996a**), mais les signaux guidant préférentiellement la croissance vers les stomates ne sont pas connus actuellement. Le pathogène reste ensuite dans l'apoplasme durant tout le reste de son cycle de développement sans jamais pénétrer à l'intérieur des cellules (**Steinberg 2015**). A l'intérieur de son hôte, *Z. tritici* est capable de faire à la fois de la reproduction sexuée et asexuée. La reproduction sexuée nécessite la rencontre de deux hyphes distincts au locus MAT-1 responsable du type sexuel (**Kema et al. 1996b**). Ce locus présente deux allèles auto-incompatibles appelés MAT-1-1 et MAT-1-2. A l'issue des étapes de plasmogamie et karyogamie entre extrémités d'hyphes au type sexuel opposé, le produit de fécondation subit immédiatement une méiose suivie d'une mitose, aboutissant à la formation de spores sexuées appelées ascospores. Les ascospores sont dispersées par le vent sur de longues distances (jusqu'à plusieurs dizaines de kilomètres, **Eyal et al. 1987**). En une année, on estime qu'il se produit au moins un cycle de reproduction sexuée dans les populations naturelles de *Z. tritici*, les ascospores permettant notamment le passage de la mauvaise saison au sein des résidus de culture (**Ponomarenko et al. 2011 ; Steinberg 2015**).

A la différence de la reproduction sexuée qui ne peut être induite et étudiée qu'en conditions semi-naturelles, le cycle de reproduction asexuée de *Z. tritici* (résumé sur la **Figure 3**) est bien connu et a été intensément étudié en conditions contrôlées. Une fois à l'intérieur de l'hôte, l'infection se fait en deux phases : une première phase dite biotrophe qui dure 9 à 14 jours suivant les conditions de laboratoire, suivie d'une deuxième phase dite nécrotrophe d'environ 10 jours. Un tel mode de vie au sein de l'hôte est qualifié d'hémibiotrophie, même si ce terme ne fait pas l'unanimité pour qualifier le mode de vie de *Z. tritici* (**Sánchez-Vallet et al. 2015** proposent de plutôt qualifier le cycle de *Z. tritici* de « nécrotrophe latent »). Dès le début de la phase nécrotrophe, les symptômes caractéristiques de la formation de spores par voie asexuée apparaissent au niveau des feuilles infectées. Ces symptômes, visibles à l'œil nu et souvent associés à d'autres symptômes non spécifiques (nécroses), sont appelés pycnides et se présentent sous la forme de structures très mélanisées émergeant de certains stomates. Ces pycnides correspondent à une importante prolifération de spores au niveau des chambres sous-stomatiques. Les spores contenues dans les pycnides sont qualifiées de pycnidiospores et se dispersent sur de courtes distances par rapport aux ascospores (**Steinberg 2015**). Les pycnidiospores sont en effet dispersées par éclaboussures lorsque des gouttes de pluie tombent

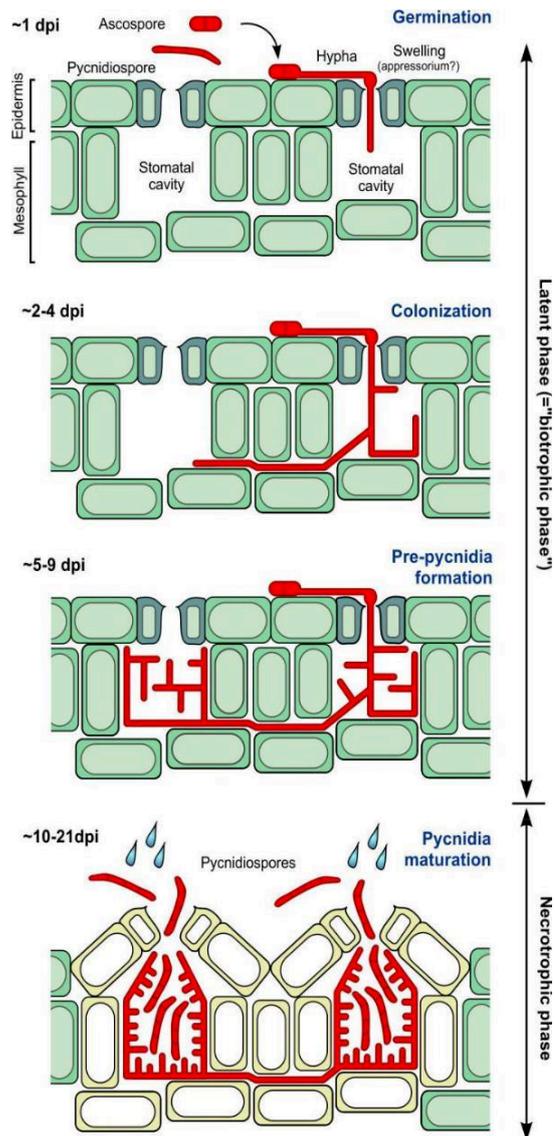


Figure I. 3 - Développement asexué de *Z. tritici* au cours de l'infection du blé

1 dpi (day post-inoculation) : Germination puis pénétration d'une spore (asco- ou pycnidio-, selon qu'elle soit respectivement issue de reproduction sexuée ou asexuée) qui traverse l'épiderme au niveau des stomates pour se loger à l'intérieur du mésophylle.

2-4 dpi : Les hyphes colonisent ensuite la chambre sous-stomatique à l'aplomb du stomate puis d'autres chambres sous-stomatiques au sein de la feuille.

5-9 dpi : Le début de la formation des pycnides marque le début de la phase nécrotrophe de l'infection.

10-21 dpi : Les mitoses s'accélèrent et un grand nombre de pycnidiospores est produit à l'intérieur des pycnides, devenus matures. Les pycnidiospores peuvent ensuite être dispersées localement par action de la pluie.

D'après **Steinberg 2015**, Figure 3

sur des feuilles recouvertes de pycnides : le champignon passe alors d'une feuille à l'autre mais également d'un étage foliaire à l'autre, contribuant finalement à la colonisation d'une partie importante de la plante infectée ainsi que des plantes voisines. En une saison de culture, environ quatre à six cycles de reproduction asexuée se produisent.

1.1.4. Implication de certaines classes de molécules à différentes phases de l'infection du blé

La phase biotrophe correspond à une phase de latence asymptomatique durant laquelle la biomasse du champignon est très faible (mais toutefois détectable par la présence de transcrits exprimés par le champignon au sein du tissu végétal). Lors de cette phase, le champignon s'établit dans la cavité sous-stomatique. Peu d'activités métaboliques liées à la dégradation de matière organique, telles les productions de lipases, protéases ou d'enzymes catabolisant les composés pariétaux, sont détectées à ce stade de l'infection (**Rudd et al. 2015**). D'ailleurs, le génome de *Z. tritici* est relativement appauvri en gènes codant des cellulases par rapport à d'autres champignons phytopathogènes ou saprophytes séquencés (**Goodwin et al. 2011**), comme cela est représenté sur la **Figure 4**. Il a été proposé que cette longue période de latence marquée par une faible activité métabolique soit une stratégie employée par le pathogène pour ne pas être détecté trop précocement par la plante. Certains auteurs ont par ailleurs émis l'hypothèse que cette furtivité puisse être le résultat de l'évolution de *Z. tritici* à partir d'un ancêtre endophytique (**Goodwin et al. 2011**). Des études de cinétique d'expression de gènes au cours de l'infection du blé par *Z. tritici* ont permis d'identifier certains gènes spécifiquement exprimés (ou surexprimés) lors de la phase de latence, suggérant qu'ils puissent avoir un rôle dans l'établissement et la survie du pathogène lors de cette phase. Ainsi, *Z. tritici* exprime des peroxydases aux stades précoces de l'infection (**Figure 5**), permettant très probablement de dégrader des espèces réactives de l'oxygène (ROS) – telles que des radicaux libres – dont la production au sein de la plante est connue pour être induite en cas d'agression (**Palma-Guerrero et al. 2016**). L'implication au cours de cette phase de latence d'une petite protéine appelée Zt3LysM (ou Mg3LysM) a été validée de manière fonctionnelle dans le cadre d'une interaction entre un génotype de *Z. tritici* et un certain génotype de blé tendre (**Marshall et al. 2011**). L'un des rôles de cette protéine est d'empêcher certains récepteurs de la plante de se lier et de reconnaître la chitine présente au niveau de la paroi fongique. A l'issue de la phase de latence biotrophe, la biomasse du pathogène au sein du tissu foliaire croît de manière très importante comme le montre la **Figure 6** représentant l'évolution du nombre de *reads*

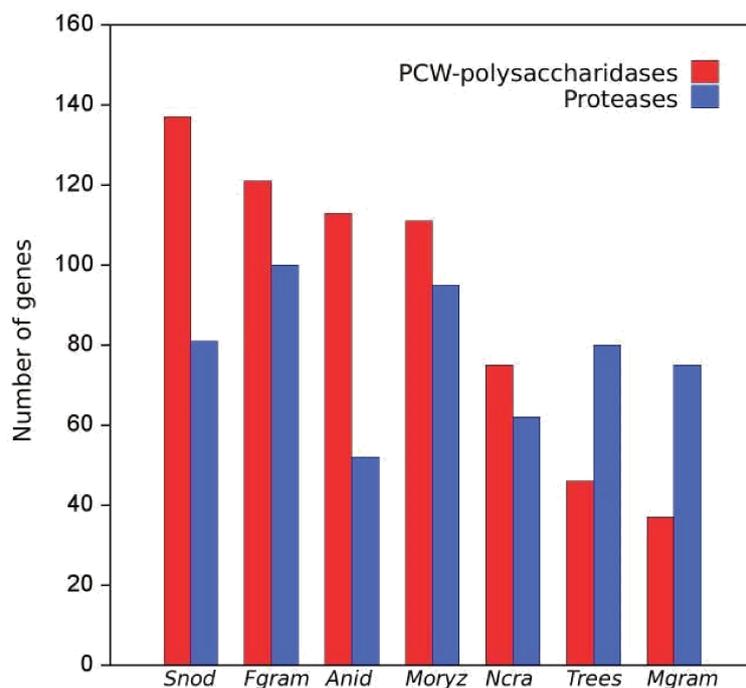


Figure I. 4 - Comparaison du nombre de gènes annotés comme codant des protéases ou des enzymes capables de dégrader les glucides de la paroi végétale dans le génome de *Z. tritici* avec ceux de quelques autres espèces de champignons

Parmi les sept espèces présentées, *Z. tritici* est celle dont le génome contient le moins de gènes codant des enzymes susceptibles de dégrader la paroi végétale (barres de couleur rouge). Les différences entre espèces sont beaucoup moins marquées en ce qui concerne le nombre de protéases (barres de couleur bleue).

Snod = *Stagonospora nodorum* ; Fgram = *Fusarium graminearum* ; Anid = *Aspergillus nidulans* ; Moryz = *Magnaporthe oryzae* ; Ncra = *Neurospora crassa* ; Tree = *Trichoderma reesei* ; Mgram = *Z. tritici* (syn. *Mycosphaerella graminicola*)

D'après **Goodwin et al. 2011**, Figure 6

RNA-seq s'alignant sur le génome de *Z. tritici* au cours de l'infection. Le champignon adopte alors un mode de développement nécrotrophe. C'est lors de cette transition de la biotrophie vers la nécrotrophie que les premiers symptômes apparaissent sur les feuilles infectées. De nombreux gènes s'expriment de manière spécifique au cours de cette transition, et notamment des petites protéines sécrétées riches en cystéine (**Palma-Guerrero et al. 2017**), protéines connues pour être impliquées dans la virulence de nombreux champignons phytopathogènes (**Koeck, et al. 2011**). Cependant, ni le rôle fonctionnel de ces protéines ni les molécules avec lesquelles elles interagissent chez la plante n'ont pour l'heure été pleinement identifiés (voir **Kettles & Kanyuka 2016** pour une revue de quelques molécules effectrices chez *Z. tritici*). Parmi les autres types de molécules majoritairement produites par *Z. tritici* au moment de cette phase de transition, il existe des enzymes capables de cataboliser des substrats variés, tels que des protéases, des lipases ainsi que enzymes dégradant les composés pariétaux (**Palma-Guerrero et al. 2017**). Ces dernières dégradent la paroi végétale, conduisant à la mort de nombreuses cellules. La croissance soutenue du champignon lors de la phase nécrotrophe est probablement supportée par la libération importante de nutriments qui en résulte autour de la zone nécrosée (**Rudd et al. 2015**). Enfin, certains gènes impliqués dans le métabolisme secondaire, tels que ceux codant pour des polyketides synthases, sont exprimés préférentiellement durant la phase nécrotrophe, en fin de cycle (**Palma-Guerrero et al. 2017**).

1.1.5. Histoire évolutive de *Z. tritici* et domestication jointe à celle de l'hôte

Z. tritici aurait coévolué avec le blé lors de sa domestication. Les populations de *Z. tritici* étudiées présentent en effet une diversité génétique plus importante au Moyen-Orient et en Europe qu'en Amérique ou en Australie, suggérant que l'histoire évolutive de *Z. tritici* est fortement associée à celle du blé et de son expansion géographique depuis le Croissant Fertile (**Banke et al. 2004**). La divergence entre des populations iraniennes adaptées au blé et des populations restées inféodées à des hôtes sauvages (auparavant appelées *Mycosphaerella graminicola SI*) a été estimée à 10500 ans et s'est très probablement fait dans un contexte de spéciation sympatrique (**Stukenbrock et al. 2007**). Cette spéciation a été facilitée par des populations d'hôtes denses et uniformes ayant suivi l'expansion de l'agriculture dans la région. A l'heure actuelle, les trois espèces les plus proches de *Z. tritici* – *Zymoseptoria pseudotritici*, *Zymoseptoria ardabiliae* et *Zymoseptoria brevis* – ont été identifiées à partir de critères morphologiques et phylogénétiques, sur cultures de blé ou sur des hôtes sauvages situés en Iran (**Stukenbrock et al. 2012 ; Grandaubert et al. 2015**). Ces trois espèces présentent des taux de

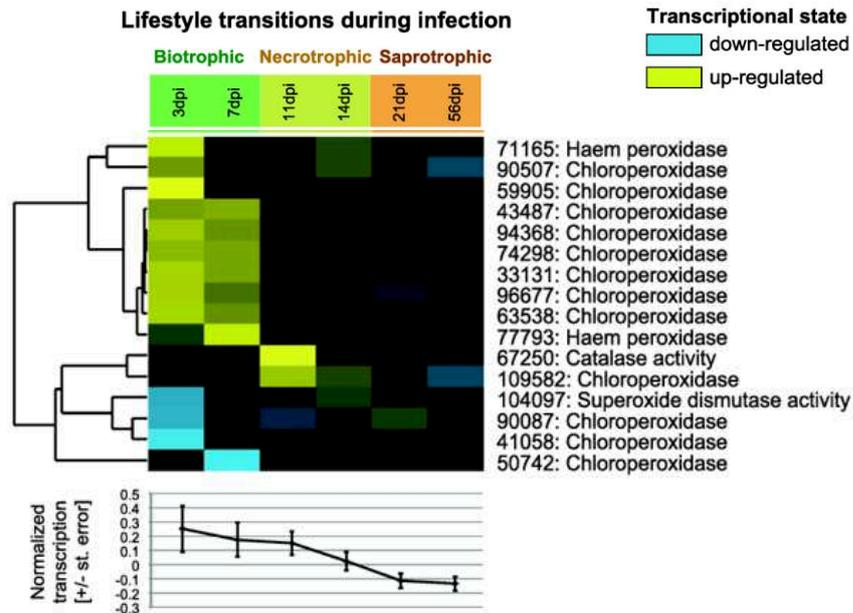


Figure I. 5 - Variation du niveau d’expression de molécules anti-stress oxydatif au cours de l’infection du blé par *Z. tritici*

L’expression de peroxydases et autres molécules jouant un rôle de défense face au stress oxydatif (dû à la présence de ROS) a été mesurée chez *Z. tritici* lors de l’infection, à six temps différents (entre 3 et 56 jours post-inoculation) par RNA-seq. Données issues de deux souches (ST99CH_3D7 et IPO-323) inoculées sur le cultivar de blé cv. Riband. On notera que les peroxydases sont surexprimées lors de la phase d’infection biotrophe de *Z. tritici* (mesures à 3 et 7 jours).

D’après **Palma-Guerrero et al. 2016**, Figure 3B

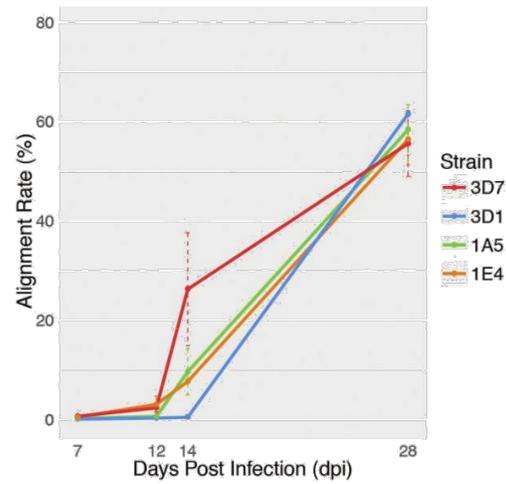


Figure I. 6 - Estimation de la biomasse fongique au cours de l'infection de feuilles de blé par *Z. tritici*

La biomasse de *Z. tritici* sein du tissu foliaire est estimée en proportion de reads RNA-seq de l'échantillon (feuille infectée) s'alignant sur le génome de référence de *Z. tritici* (Goodwin et al. 2011). Pour quatre souches d'origine suisse inoculées sur un même cultivar de blé (cv. Drifter), les niveaux d'expression donnés sont obtenus à quatre jours post-inoculation différents (7, 12, 14 et 21 dpi). D'après Palma-Guerrero et al. 2017, Figure 1

substitutions non synonymes par rapport aux substitutions synonymes moins élevés que chez *Z. tritici*, suggérant une intense sélection exercée sur ce dernier par le blé en cours de domestication (Stukenbrock et al. 2011).

1.1.6. Principales caractéristiques du génome de *Z. tritici*

Le génome de référence de *Z. tritici* a été publié en 2011 à partir d'une souche isolée sur blé tendre en 1984 au Pays-Bas (souche IPO-323). Le génome haploïde de *Z. tritici* a une taille de 39,7 Mb et possède environ 11 000 gènes annotés (Wittenberg et al. 2009 ; Goodwin et al. 2011). Il comporte 17% de régions répétées (voir Figure 7), dont plus de la moitié sont des rétrotransposons à LTR (Dhillon et al. 2014). Parmi ces derniers, ceux de type *Gypsy* sont les plus représentés et totalisent à eux seuls 4.5% du génome de la souche IPO-323. Cette dernière possède 21 chromosomes, parmi lesquels huit sont qualifiés de chromosomes accessoires. La richesse en éléments transposables n'est pas uniforme le long du génome, avec une plus forte densité au niveau des régions subtélomériques des chromosomes essentiels et dans les chromosomes accessoires (Dhillon et al. 2014 et Annexe 1).

Les chromosomes accessoires des champignons (uniquement découverts chez des espèces appartenant au groupe des Ascomycètes, Stukenbrock & Croll 2014) sont définis par le fait que leur présence au sein du génome n'est pas obligatoire à la survie et à la reproduction des individus. Une des particularités du génome de *Z. tritici* tient au nombre élevé de chromosomes accessoires qu'il possède par rapport aux autres espèces de champignons comportant des chromosomes accessoires. A titre d'exemple *L. maculans* n'en possède qu'un seul et *M. oryzae* jusqu'à quatre (Bertazzoni et al. 2018 ; Dutreux et al. 2018). Ces chromosomes présentent plusieurs particularités : marques épigénétiques généralement associées aux régions hétérochromatiniennes, richesse en éléments transposables, polymorphisme de présence-absence de gènes, faible densité de gènes et faible activité transcriptionnelle aussi bien *in vitro* qu'*in planta* (Kellner et al. 2014 ; Grandaubert et al. 2015 ; Schotanus et al. 2015). Les principales caractéristiques différenciant chromosomes essentiels et accessoires sont résumées sur la Figure 8. A la différence de la plupart des autres champignons phytopathogènes, aucun gène présent sur les chromosomes accessoires impliqué dans l'agressivité vis-à-vis de l'hôte n'a formellement été identifié chez *Z. tritici* (bien qu'il ait été montré que la perte de certains chromosomes accessoires par la souche IPO-323 puisse affecter son niveau de virulence sur certains cultivars (Habig et al. 2017)).

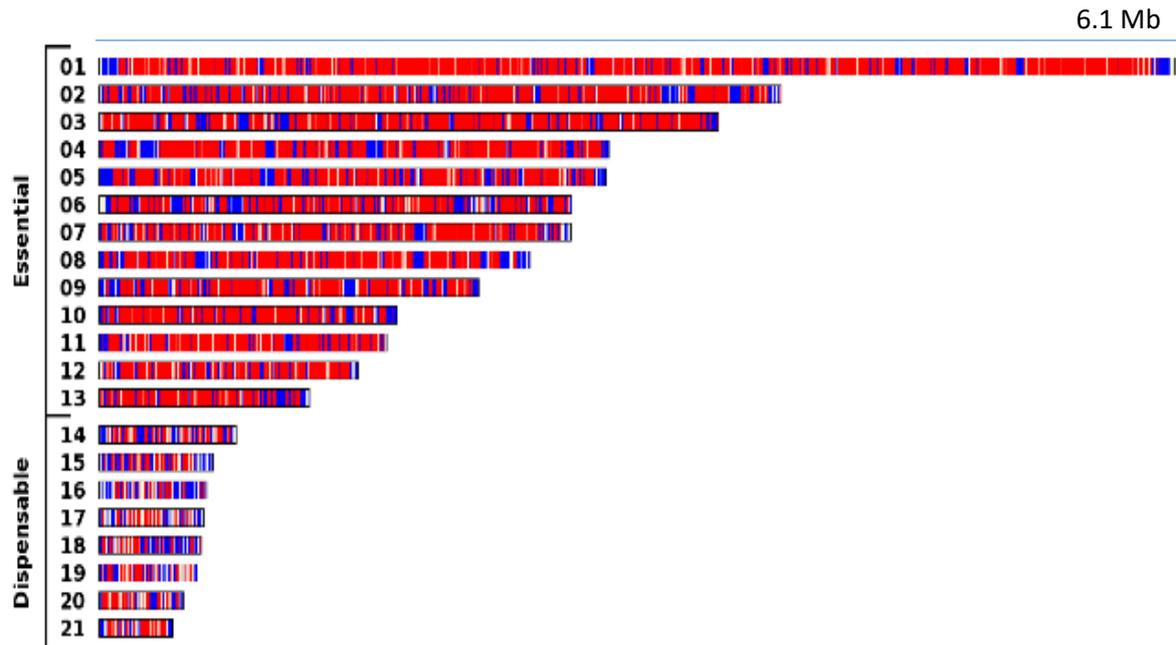


Figure I. 7 - Représentation schématique des 21 chromosomes de la souche de référence IPO-323 de *Z. tritici*

Les différents chromosomes sont représentés les uns par rapport aux autres proportionnellement à leur taille réelle. Les 13 premiers (*i.e.* plus longs) constituent les chromosomes essentiels du génome tandis que les huit plus petits sont qualifiés d'accessoires. Les séquences codantes uniques sont représentées en rouge tandis que les séquences répétées sont représentées en bleu. On notera, au niveau de chromosomes accessoires, la plus forte densité en séquences répétées et la plus faible densité en séquences codantes uniques par rapport aux chromosomes essentiels.

D'après **Goodwin et al. 2011**, Figure S2

Les chromosomes accessoires de *Z. tritici* sont très instables lors de la reproduction sexuée et il existe au sein des populations naturelles un fort polymorphisme de présence-absence de ces chromosomes. Des études menées en laboratoire ont en effet montré que la méiose entraîne un fort taux d'aneuploïdie (nombre anormal de chromosomes), et cela quasi-exclusivement au niveau des chromosomes accessoires (**Wittenberg et al. 2009 ; Goodwin et al. 2011 ; Fouché et al. 2018**). Il a été à la fois observé des pertes de chromosomes accessoires ainsi que des disomies (chromosome accessoire en double) dans la descendance issue de croisements entre souches naturelles, et ce à des taux relativement élevés de l'ordre de 5% en moyenne. Les descendants présentaient également un polymorphisme de longueur des chromosomes accessoires (**Fouché et al. 2018**). Chez *Z. tritici*, ces derniers sont en effet particulièrement sujets aux remaniements structuraux de par leur richesse en éléments transposables entraînant des recombinaisons non-homologues lors de la méiose. Certains des mécanismes moléculaires à l'œuvre lors d'événements d'insertions et de délétions au sein de ces chromosomes accessoires ont pu être mis en évidence (**Croll et al. 2013**) et sont représentés sur la **Figure 9**. Finalement, les 5 Mb représentées par les chromosomes accessoires de *Z. tritici* constituent, pour paraphraser François Jacob, un véritable point chaud de « bricolage évolutif ». Les régions particulièrement instables des organismes pathogènes – phytopathogènes inclus – ont d'ailleurs été qualifiées de berceau évolutif d'innovations adaptatives, avec l'idée sous-jacente qu'une partie des nombreux événements moléculaires s'y déroulant puissent être sélectionnés car favorisant l'adaptation (**Croll & McDonald 2012 ; Raffaele & Kamoun 2012**).

Le séquençage de la souche de référence a aussi mis en évidence le phénomène de RIP (pour *Repeat-Induced Point mutations*) au niveau des éléments transposables présents au sein du génome de *Z. tritici*, aussi bien pour ceux de classe I (rétrotransposons) que pour ceux de classe II (transposon à ADN). Le RIP, initialement identifié chez *Neurospora crassa* (**Idnurm & Howlett 2003**), est un mécanisme à l'œuvre lors de la méiose permettant aux champignons de rendre inactifs les éléments transposables, dont les insertions sont le plus souvent néfastes pour les individus. Les traces moléculaires laissées par le RIP sont détectables dans les génomes dans la mesure où il cible préférentiellement les dinucléotides CpA des éléments transposables qui deviennent alors TpA (transitions de type C→T et G→A). Le RIP peut également promouvoir l'évolution de gènes localisés dans des régions génomiques riches en éléments transposables, comme cela a été montré chez *L. maculans* (**Fudal et al. 2009 ; Daverdin et al. 2012**). Ceci s'explique par le fait que le RIP peut « déborder » au-delà des éléments transposables pour atteindre des séquences codantes uniques situées à proximité (phénomène appelé *RIP leakage*). En dépit de la forte occurrence de la reproduction sexuée

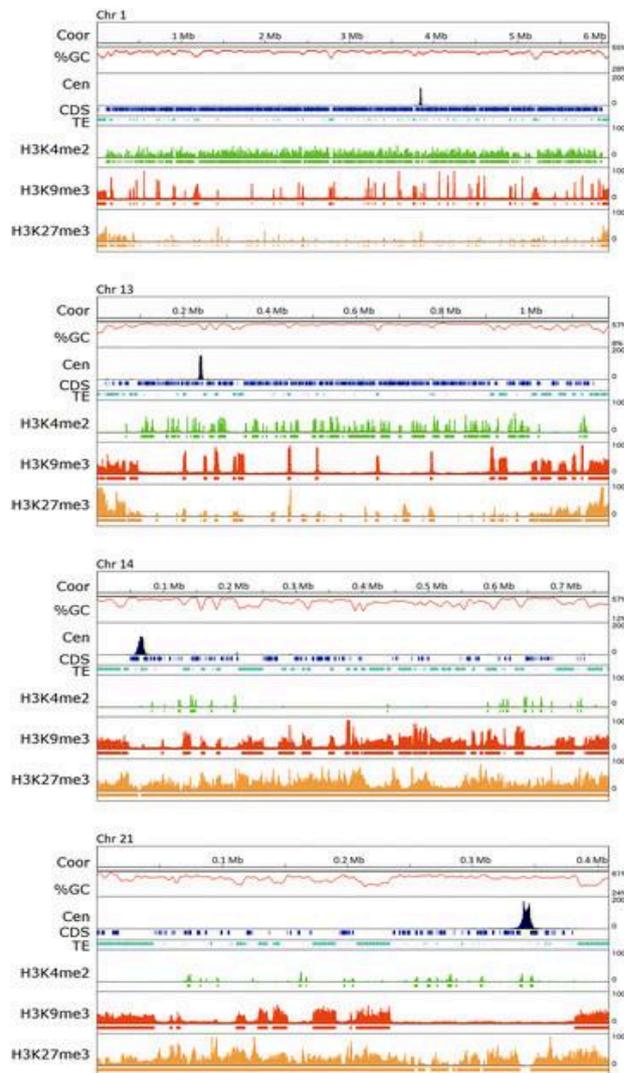


Figure I. 8 - Caractéristiques génétiques et épigénétiques connues différenciant les chromosomes essentiels et les chromosomes accessoires de *Z. tritici*

Certaines caractéristiques de deux chromosomes essentiels (le 1 et le 13, respectivement le plus grand et le plus petit) et de deux chromosomes accessoires (le 14 et le 21, respectivement le plus grand et le plus petit) sont présentées afin de pouvoir comparer les deux types de chromosomes. L'ensemble des analyses a été mené sur la souche de référence IPO-323 (Goodwin et al., 2011). Outre la position (en Mb) permettant de se repérer le long des chromosomes, les pistes suivantes indiquent, respectivement de haut en bas : le pourcentage en GC (ligne rouge), la position du centromère (histogramme noir), la localisation des séquences codantes (bleu foncé), la position des éléments transposables (bleu turquoise), la position de la marque épigénétique H3K4me2 classiquement associée aux zones riches en euchromatines (vert) et enfin les positions de deux marques épigénétiques classiquement associées aux régions hétérochromatiniennes (H3K9me3 en rouge et H3K27me3 en orange). On notera la plus forte proportion de marques épigénétiques répressives sur les chromosomes accessoires (dont les gènes sont peu exprimés) et la plus forte proportion de marques permissives sur les chromosomes essentiels (dont les gènes sont fortement exprimés).

D'après Schotanus et al. 2015, Figure 5

chez *Z. tritici*, le rôle du RIP dans l'évolution rapide de certaines séquences impliquées dans la pathogénie de *Z. tritici* n'a à ce jour pas été démontré formellement (**Dhillon et al. 2014**). *Z. tritici* présente au niveau du chromosome essentiel 7 une large région riche en AT avec la plupart des caractéristiques des chromosomes accessoires mentionnées ci-dessus (**Kellner et al. 2014 ; Schotanus et al. 2015 ; Rudd et al. 2015**). Cette région a été interprétée comme résultant d'un événement de fusion d'un chromosome accessoire avec un chromosome essentiel. De manière intéressante, cette région contient une petite protéine sécrétée, normalement reconnue spécifiquement par un gène de résistance chez le blé mais dont certains variants permettent une évvasion de reconnaissance (**Meile et al. 2018**).

Enfin, malgré les nombreux génomes et données RNA-seq accumulés chez *Z. tritici*, il n'existe pas à l'heure actuelle d'annotation de gènes qui fasse réellement consensus, plusieurs versions circulant au sein de la communauté scientifique travaillant sur ce champignon.

1.1.7. Déterminisme génétique de la virulence chez *Z. tritici*

Récemment, de manière concomitante au développement de données de séquençage haut débit sur *Z. tritici*, la question du déterminisme génétique de la virulence a été abordée grâce à des approches de *QTL mapping* (**Stewart et al. 2017**) mais également par génétique d'association à l'échelle du génome sur des populations naturelles (*Genome Wide Association Studies*, abrégé GWAS). Même si cette dernière approche est encore à ses débuts chez les pathogènes de plante et est rarement validée par des approches fonctionnelles permettant d'identifier les variants « causaux » (**Genissel et al. 2017**), les résultats sont encourageants. Globalement, les variants les plus significatifs identifiés jusqu'à aujourd'hui sont présents dans des effecteurs putatifs de type petites protéines sécrétées, qui semblent donc être au premier rang dans la dynamique de coévolution entre *Z. tritici* et le blé (**Hartmann et al. 2017 ; Zhong et al. 2017**).

Cette coévolution entre l'hôte et son pathogène conduit à la mise en place d'adaptations rapides dans les populations de pathogènes. Cette dernière est souvent décrite par deux scénarios accordant à la sélection directionnelle ou à la sélection balancée un rôle prédominant : « course aux armements » (*arms race*) dans le premier cas, « guerre des tranchées » (*trench warfare*) dans le second (**McDonald & Linde 2002 ; Jones and Dangl 2006 ; Tellier et al. 2014 ; Möller & Stukenbrock 2017**). Ces deux scénarios sont présentés sur la **Figure 10**.

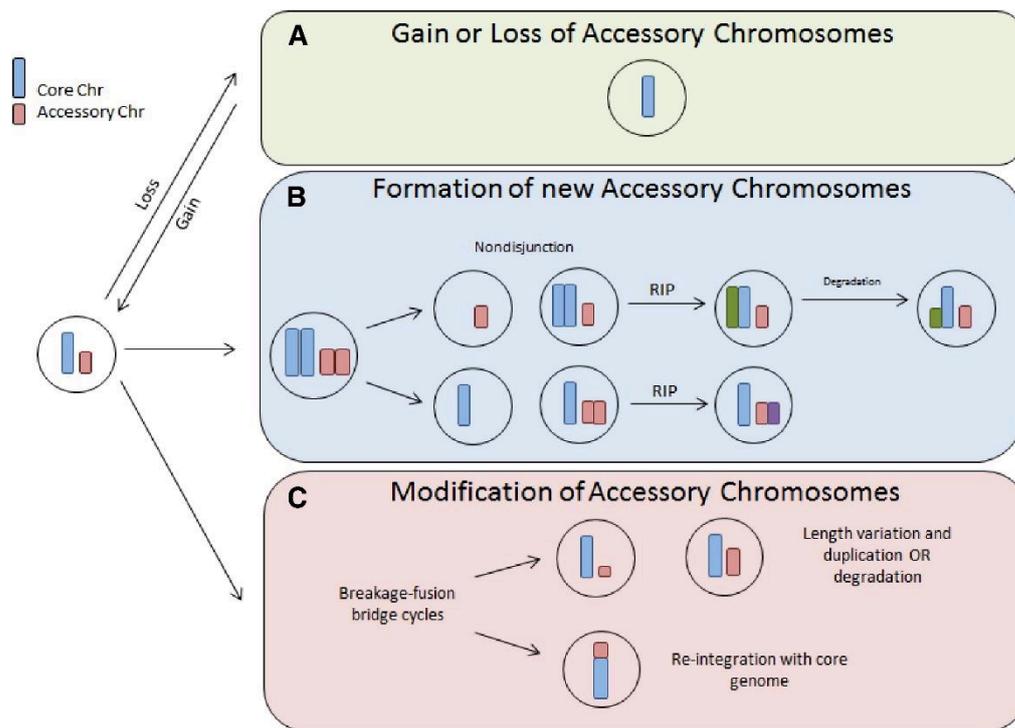


Figure I. 9 - Dynamique des chromosomes accessoires chez les champignons phytopathogènes

Panneau A, encadré vert : au cours des divisions méiotiques, certains chromosomes accessoires peuvent être gagnés ou perdus.

Panneau B, encadré bleu : certains chromosomes accessoires peuvent ne pas ségréger lors de la méiose (conduisant par exemple à des disomies, cas illustré en bas). Le chromosome surnuméraire est alors libre de dégénérer, notamment par accumulation de mutations par *Repeat Induced Point Mutations* (RIP). On notera que des cas de non-disjonction de chromosomes essentiels peuvent conduire les chromosomes surnuméraires à dégénérer et/ou à se raccourcir, et être à l'origine de la formation de futurs chromosomes accessoires (cas illustrés dans le scénario du haut).

Panneau C, encadré rouge : au cours de cycles appelés breakage-fusion bridge cycles (**Croll et al. 2013**), les chromosomes accessoires peuvent s'intégrer au génome « essentiel » en fusionnant avec un chromosome essentiel, ou subir des remaniements structuraux d'ampleur importante, tels que des duplications.

D'après **Bertazzoni et al. 2018**, Figure 1

1.1.8. Diversité génétique chez *Z. tritici* et structure des populations

L'étendue du polymorphisme chez *Z. tritici* a pu initialement être étudiée grâce à des marqueurs génétiques, que ce soit en exploitant des loci microsatellites ou du polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP) (McDonald & Martinez 1990 ; Gurung et al. 2011). Ces données ont révélé une diversité génétique élevée, aussi bien au sein des populations qu'entre populations. Ainsi il a été montré à partir d'un panel de 614 souches françaises génotypées sur 12 marqueurs microsatellites qu'environ 95% des génotypes étaient uniques (<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01531631>). Les quelques rares cas de faible diversité locale, notamment en Australie, ont été interprétés comme résultant d'un effet de fondation (Zhan et al. 2003). Depuis ces premières études, la très forte diversité génétique a pu être vérifiée et validée grâce aux données génomiques accumulées avec l'avènement des technologies de séquençage nouvelle génération (NGS) de type Illumina. Ainsi, deux études ont identifié avec confiance au moins 500 000 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) sur des panels de génomes représentant une centaine d'individus (Hartmann et al. 2017 ; Zhong et al. 2017). Peu d'études se sont penchées sur le taux de mutation au sein des populations naturelles de *Z. tritici* : une étude menée en 2004 a pu l'estimer à partir de données RFLP à environ 4.10^{-5} par génome et par division cellulaire (Zhan & McDonald 2004).

Depuis la publication du génome de la souche IPO-323, certains génomes ont été assemblés *de novo* par séquençage PacBio (Plissonneau et al. 2018). Ces données ont notamment permis d'avoir une idée de l'étendue du polymorphisme de présence-absence au sein des populations. Ainsi, le pangénome de l'espèce (ensemble de tous les gènes identifiés) croît à chaque fois qu'une nouvelle souche séquencée est ajoutée, atteignant plus de 15500 gènes avec seulement cinq génomes. A l'opposée, le nombre de gènes partagés par l'ensemble des souches tend à se stabiliser aux alentours de 9000. Ceci est représenté sur la **Figure 11**. A ce polymorphisme de présence-absence de gènes s'ajoute des gènes qui, bien que partagés entre souches, possèdent des niveaux d'expression souches-spécifiques ou encore dont la cinétique d'expression au cours de l'infection est variable selon les souches (Plissonneau et al. 2018). Ainsi, en dépit d'une partie du programme transcriptionnel commun à toutes les souches, chaque souche possède son propre profil d'expression pour certains gènes.

Les approches traditionnelles utilisant des marqueurs génétiques ont également permis d'étudier la structure génétique des populations naturelles de *Z. tritici*. Ces approches ont

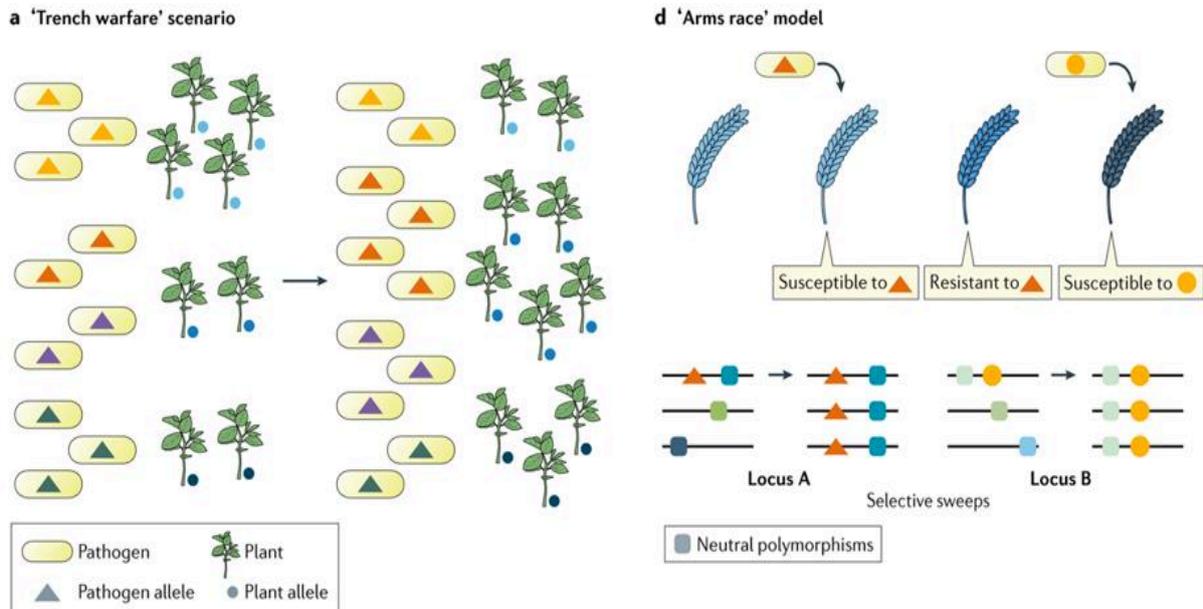


Figure I. 10 - Deux scénarios de coévolution entre populations d'hôtes et de pathogènes

Le scénario *trench warfare* explique le maintien d'une diversité génétique importante au sein des deux populations. Cette diversité, permise entre autres par des conditions environnementales et agronomiques hétérogènes conduisant notamment à de l'adaptation locale, se maintient de manière dynamique au cours du temps. Les versions alléliques des gènes de résistance au sein de la population d'hôtes sont nombreuses, tout comme le sont les effecteurs côté pathogène. Le scénario baptisé course aux armements (*arms race*) conduit à des vagues de coévolution hôte-pathogène décalées dans le temps, qui au niveau génétique peuvent se manifester par des balayages sélectifs successifs au loci sous sélection. L'apparition d'un nouveau variant avantageux d'une protéine effectrice (triangle orange) induit une pression de sélection sur l'hôte. Toute mutation nouvelle favorisant le niveau de résistance de l'hôte contre cet allèle devient alors avantageuse à son tour, rendant les porteurs résistants au génotype pathogène présent... jusqu'à ce qu'un génotype exprimant une nouvelle version de la protéine effectrice (rond jaune) permettant de contourner la résistance de l'hôte n'apparaisse et ne vienne envahir la population.

D'après Möller & Stukenbrock 2017, Figure 2

montré que les populations naturelles de *Z. tritici* provenant de diverses zones géographiques présentent une faible structure génétique, avec seulement quelques pourcents de la diversité génétique globale de l'espèce s'expliquant par sa distribution sur les différents continents (Linde et al. 2002 ; Zhan et al. 2003). Ceci reflète le caractère panmictique des populations, favorisé à la fois par le transport aérien d'ascospores sur de très longues distances mais également par le commerce de blé à l'échelle mondiale (paille ou grains infectés) (McDonald & Mundt 2016). Les études de génomiques plus récentes tendent cependant à montrer un certain niveau de structure à l'échelle mondiale : la **Figure 12** montre cette structure à partir d'un échantillon d'individus issus de sept populations (voir également **Annexe 2**). En ce qui concerne le taux de recombinaison chez *Z. tritici*, il a été d'abord estimé lors d'expériences de croisements en conditions semi-contrôlées (Croll et al. 2015). Les résultats se sont révélés variables selon le croisement mais les auteurs ont noté des taux de recombinaison de l'ordre de 60 cM/Mb à l'échelle des chromosomes, avec des différences importantes entre chromosomes essentiels et certains chromosomes accessoires, qui ne présentaient pas de traces d'événements de recombinaison. Un taux de recombinaison quasi-similaire (66 cM/Mb en moyenne le long du génome) a été récemment estimé à partir de données de génomiques des populations et a ainsi permis d'étendre aux populations naturelles le fait que les chromosomes accessoires recombinent à des taux moins élevés que les chromosomes essentiels (Stukenbrock & Dutheil 2018). Ces deux études ont révélé qu'au sein d'un même chromosome le taux de recombinaison est hétérogène, avec la présence de nombreux *hotspots*. Finalement, le taux élevé de recombinaison à l'œuvre dans les populations de *Z. tritici* peut être mis en lien avec le fait qu'au sein d'une même lésion foliaire de quelques cm², différents géotypes de *Z. tritici* – typiquement entre deux et six – sont retrouvés (Linde et al. 2002).

1.1.9. Etudes en laboratoire et rôle d'un facteur abiotique : la température

En condition de laboratoire, la température optimale de culture *in vitro* de *Z. tritici* se situe aux alentours de 20°C, avec une variation substantielle de plusieurs degrés (Boixel et al. 2019). Des données suggérant que les populations de *Z. tritici* puissent être localement adaptées à la température annuelle moyenne ont été obtenues en mesurant le taux de croissance à différentes températures à partir d'isolats provenant de régions à climats contrastés. Ainsi, une étude a montré que l'augmentation du taux de croissance observée entre une température de 15°C et une température de 22°C est plus importante pour des isolats israéliens ou australiens

que pour des isolats suisses ou du nord des Etats-Unis (**Zhan & McDonald 2011**). Concernant le déterminisme génétique de ces différences, une étude de *QTL mapping* a pu identifier certains loci impliqués dans la sensibilité à la température, dont un est connu pour être impliqué dans la tolérance au froid chez *Saccharomyces cerevisiae* (**Lendenmann et al. 2016**). D'une manière plus générale, la croissance *in vitro* est plastique vis-à-vis des changements de température et variable parmi les individus (**Boixel et al. 2019**). Ainsi, comme c'est le cas pour la plupart des traits quantitatifs étudiés chez *Z. tritici*, la réponse aux variations de température présente une diversité importante. Enfin, la corrélation entre la température moyenne de la localité à laquelle ont été isolées différentes souches et le niveau de virulence de ces dernières a pu être étudiée (**Chen et al. 2017**), avec toutefois des résultats contrastés et un faible nombre de souches, rendant l'interprétation difficile.

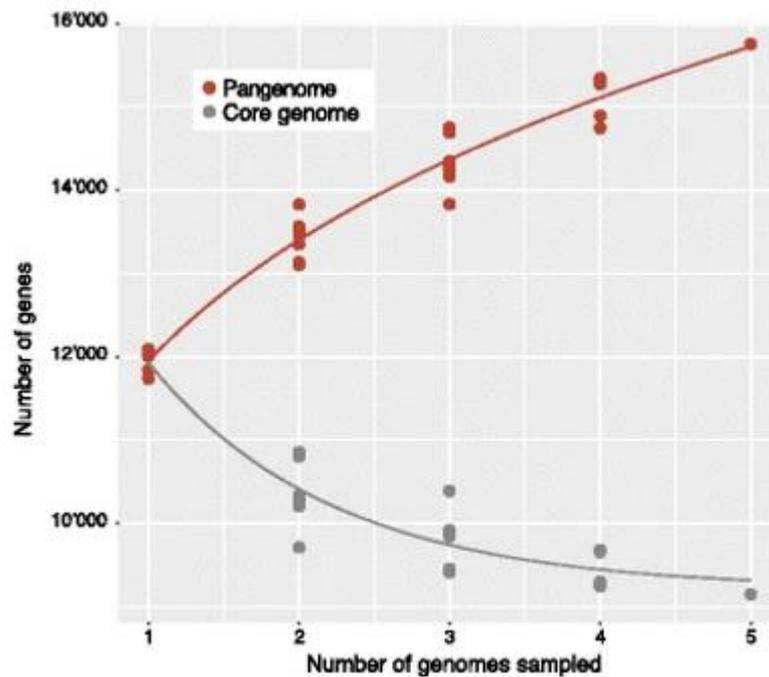


Figure I. 11 - Polymorphisme de présence-absence de gènes et pangéome de *Z. tritici* : apport des technologies de séquençage de 3^{ème} génération

Le pangéome (ensemble de tous les gènes identifiés) de *Z. tritici* estimé à partir d'isolats séquencés en PacBio est représenté en rouge. En gris, le nombre de gènes qui sont retrouvés en commun entre isolats (rassemblés ici sous le nom de *core genome*). Les courbes rouge et grise relient les moyennes de toutes les combinaisons de n isolats ($n=1$ à 5) possibles parmi les cinq isolats disponibles. On notera que plus le nombre de génomes inclus dans l'analyse est élevé, plus le nombre de nouveaux gènes découverts augmente et que la courbe rouge n'arrive pas à saturation avec cinq génomes. A l'inverse, la courbe grise tend à se stabiliser vers 9000 gènes, semblant indiquer une bonne exhaustivité en termes d'identification de *core genes* avec un nombre restreint d'isolats.

D'après **Plissonneau et al. 2018**, Figure 3

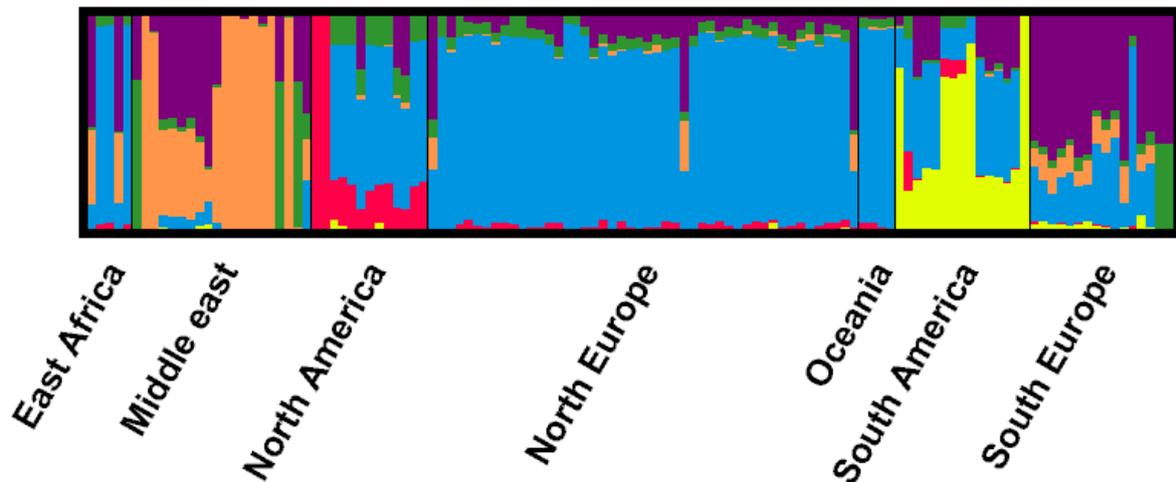


Figure I. 12 - Structure génétique des populations de *Z. tritici* à l'échelle mondiale

Des données de polymorphisme (SNPs) ont été obtenues sur un total de n=121 individus issus de sept populations. Pour les différentes populations, les nombres d'individus séquencés sont les suivants : *Middle East* (n=20), *North America* (n=13), *South America* (n=15), *North Europe* (n=46), *South Europe* (n=18), *East Africa* (n=5) and *Oceania* (n=4). 1000 SNPs bialléliques (*Minor Allele Frequency* > 5%) ont été choisis au hasard pour mener l'analyse de structure (Falush et al. 2003). Les paramètres utilisés sont les suivants: *burnin* : 10000 répétitions ; MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*): 10000 répétitions ; nombre de répétitions à K fixé: 20 ; K minimum: 2 ; K maximum: 23 (un test préalable de K allant de 2 à 40 avec 3 répétitions à K fixe a montré que K=13 était la valeur optimale).

Le nombre de clusters, estimé d'après *Evanno's delta K* (Evanno et al. 2005), est de 6. Les résultats sont visualisés grâce au logiciel en ligne Structure Harvester (Earl & VonHoldt, 2011).

D'après Gabriel, Genissel et al. en prep

1.2. Conséquences évolutives des variations environnementales

1.2.1. Les êtres vivants évoluent dans un environnement changeant

Depuis l'émergence de la vie il y a au moins trois milliards d'années, l'environnement dans lequel vivent et évoluent les êtres vivants n'a cessé de varier. Ce constat n'est pas remis en cause par l'existence d'une minorité de taxons appelés *pan-chroniques* (les plus connus étant les cœlacanthes, les brachiopodes, les dipneustes ou encore les nautilus) dont l'existence reflèterait une extraordinaire stabilité de leur milieu de vie. Cette interprétation écologique basée uniquement sur des données morphologiques est d'ailleurs de plus en plus remise en question (**Grandcolas et al. 2014**) L'environnement auquel les organismes sont soumis varie donc à la fois dans l'espace et dans le temps. Ces changements ont lieu à des échelles de temps très différentes, depuis celles mentionnées plus haut (*i.e.* liées à la géologie et à la macroévolution) aux variations quasi-instantanées, en passant par les variations saisonnières et journalières ou encore celles d'origines anthropiques plus ou moins récentes (changements des paysages avec l'apparition de l'agriculture ; activités liées à « l'ère industrielle », introduction d'espèces invasives ou encore surexploitation de certaines populations naturelles). Par la suite, nous nous restreindrons aux seuls changements des paramètres environnementaux abiotiques (c'est-à-dire uniquement aux paramètres climatiques et physico-chimiques du milieu).

L'une des options les plus évidentes permettant de faire face aux variations environnementales stressantes est, pour les taxons qui en sont capables, de se déplacer afin de faire en sorte de vivre dans un milieu qui leur soit davantage favorable (tout en restant compatible avec les contraintes liées à leur fonctionnement interne). C'est le cas, par exemple, des migrations saisonnières observées chez les oiseaux migrateurs (**Pulido 2007**). De plus, dans le contexte d'augmentation de la température moyenne causée par le réchauffement climatique, il a pu être mis en évidence un déplacement vers le Nord de populations d'organismes ectothermes, au premier rang desquelles certaines espèces d'insectes (**Chen et al. 2011 ; Boggs 2016**).

D'autres espèces et notamment celles qui sont sessiles ou pélagiques (et qui ne peuvent respectivement pas se déplacer ou le faire seulement de manière passive) se sont adaptées à la variabilité intrinsèque de leur environnement. Cette adaptation aux variations environnementales peut être mise en évidence à la fois par des approches *in situ* (sur le terrain) et en laboratoire. Ainsi, chez certaines espèces de coraux, les populations inféodées aux zones côtières sont soumises à de fortes variations thermiques (écarts importants dans la journée entre

les températures les plus faibles et les plus élevées) tandis que d'autres vivent en pleine mer, où l'environnement est relativement stable en comparaison. Dans l'espèce *Porites astreoides*, il a ainsi été montré par des expériences de transferts réciproques (consistant à introduire des individus d'une population dans l'environnement d'une autre population), que les populations de pleine mer et les populations côtières étaient chacune localement adaptée à leur environnement. Cela signifie notamment que les coraux côtiers étaient spécifiquement adaptés à la variabilité intrinsèque de leur environnement (**Kenkel et al. 2015a ; Kenkel et al. 2015b**). Quant aux expériences en laboratoire, une évolution en conditions contrôlées menée sur l'espèce pélagique de diatomée *Thalassiosira pseudonana* sur 300 générations a montré que les génomes des individus soumis à un environnement thermiquement variable avaient évolué rapidement et que certains des changements observés étaient probablement adaptatifs (**Schaum et al. 2018**).

Concernant les animaux terrestres ectothermes, ils présentent d'importantes différences latitudinales quant à leur capacité à tolérer des changements de température et ces différences pourraient être le reflet d'une adaptation aux variations saisonnières de leur environnement (**Amarasekare & Johnson 2017**). Enfin, comme c'est le cas pour tous les autres organismes, les changements environnementaux affectent également les pathogènes (**Chakraborty 2013**). Certains d'entre eux expérimentent d'ailleurs au sein même de leurs hôtes respectifs d'importantes variations physico-chimiques : pression partielle en CO₂ plus ou moins élevée dans la chambre sous-stomatique des végétaux; anoxie plus ou moins forte dans l'intestin des mammifères, etc.

Pour conclure et dans la mesure où les variations des conditions de milieu font partie intégrante de la vie de nombreuses espèces, il apparaît important de s'intéresser à la manière dont ces dernières peuvent s'adapter aux changements, et notamment à ceux survenant dans un contexte de changement climatique. Ceci apparaît d'autant plus nécessaire que de nombreux travaux tentent de comprendre comment se fait l'adaptation à des environnements stables ou dans lesquels ne s'exerce qu'une pression de sélection unidirectionnelle, telle une augmentation régulière de température (Etterson & Shaw 2001 ; Dahlhoff et al. 2008 ; Visser 2008 ; Van Doorslaer et al. 2009).

Les mécanismes associés à l'évolution en condition fluctuante sont relativement peu étudiés et nous allons donc par la suite approfondir l'étude des conséquences évolutives des fluctuations environnementales.

1.2.2. Evolution et adaptation en conditions environnementales fluctuantes

1.2.2.1. Caractéristiques des fluctuations à prendre en compte : prédictibilité et périodicité

Nous allons ici nous focaliser sur les fluctuations environnementales dont les « périodes » s'étendent sur plusieurs générations. Toutes les fluctuations ne sont pas semblables et il est nécessaire de dégager quelques paramètres clés permettant de les décrire et devant être pris en compte dans une perspective évolutive. L'objectif de cette partie est donc de présenter l'effet des principales caractéristiques que peuvent présenter les fluctuations temporelles de certains paramètres environnementaux ainsi que leurs conséquences évolutives.

Le schéma présenté sur la **Figure 13** rappelle les trois principaux types de sélection (directionnelle, stabilisante et disruptive) et leurs conséquences sur la distribution des phénotypes au sein des populations. La sélection fluctuante dans le temps n'y est pas représentée mais, en supposant que les optima à atteindre dans les différents environnements soient différents, celle-ci s'illustrerait par une relation phénotype-fitness différente selon les environnements expérimentés au cours des fluctuations.

Une caractéristique essentielle des fluctuations est leur prédictibilité. Cette dernière correspond à la fiabilité des inférences que l'on peut tirer quant à la valeur future du paramètre environnemental considéré, connaissant sa valeur actuelle. La prédictibilité dépend essentiellement de la régularité avec laquelle les fluctuations se répètent dans le temps : plus

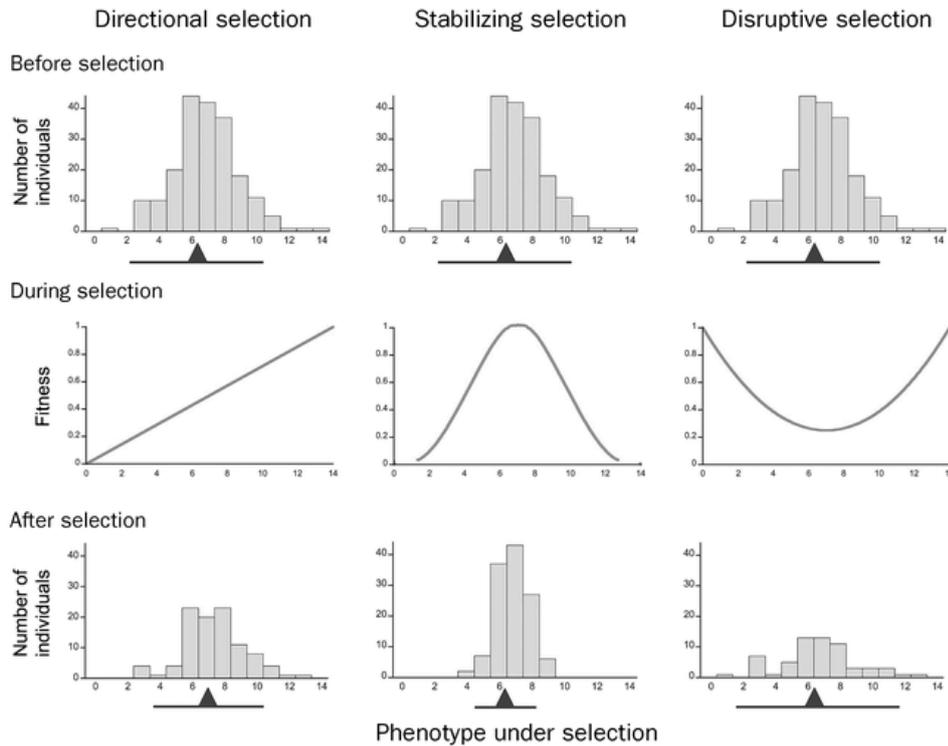


Figure I. 13 - Conséquences phénotypiques de différents types de sélection sur la distribution des phénotypes au sein des populations

De gauche à droite sont représentés les effets de la sélection directionnelle, de la sélection stabilisante et de la sélection disruptive. En haut, la distribution des phénotypes des individus appartenant à une population est représentée avant l'action de la sélection: la distribution est alors similaire entre les trois populations de départ. Au milieu, la fitness des individus de la population en fonction de la valeur du trait sous sélection est représentée. En bas sont représentées les distributions phénotypiques après sélection.

A gauche : Dans le cas de la sélection directionnelle, les individus présentant un phénotype de valeur élevée (*i.e.* tendant vers les valeurs à droite de la distribution) sont avantagés. Ceci est représenté sur le graphique du milieu, sur lequel l'augmentation de la fitness est linéaire avec la valeur du trait. A l'issue de la sélection, la valeur moyenne de la distribution des phénotypes dans la population a augmenté, comme l'illustre la petite flèche noire.

Au milieu : Dans le cas de la sélection stabilisante, les individus présentant un phénotype proche de la moyenne de la population sont avantagés. Ceci est illustré au centre par la gaussienne représentant la fitness des individus. A l'issue de la sélection, la valeur moyenne des phénotypes présentés par les individus de la population ne s'est pas modifiée (flèche noire). En revanche, la variance autour de cette moyenne s'est resserrée, comme l'illustre le graphique du bas.

A droite : Dans le cas de la sélection disruptive, les individus présentant des phénotypes extrêmes sont avantagés. Ceci est représenté par la courbe symétrique convexe au milieu. A l'issue de la sélection, la valeur moyenne des phénotypes présentés par les individus de la population ne s'est pas modifiée (flèche noire). En revanche, la variance autour de cette moyenne a augmenté, comme l'illustre le graphique du bas.

D'après **Kingsolver et al. 2007**, Figure 1

celle-ci est importante, plus la prédictibilité sera bonne. Les fluctuations prédictibles ne sont pas nécessairement déterministes mais présentent bien souvent une part plus ou moins importante d'aléas qui les rend non parfaitement prévisibles. La prédictibilité va alors dépendre du degré d'auto-corrélation temporelle que présentent les fluctuations. L'auto-corrélation se caractérise par le fait que la valeur du paramètre prise à l'instant $t+1$ reste dans le voisinage de celle au temps t . On peut alors se demander quelles sont les conséquences de ces différents niveaux de prédictibilité des fluctuations environnementales sur l'évolution des organismes.

De manière générale, le lien positif entre facilité d'adaptation et prédictibilité de l'environnement n'est pas si évident (Tufto 2015). Ce lien n'émerge en effet pas systématiquement lors d'études empiriques, même lorsque le plan expérimental de celles-ci cherche explicitement à maximiser la prédictibilité des changements de l'environnement (en les faisant, par exemple, précéder d'un signal annonciateur fiable, cf. Kubrak et al. 2017). Certaines expériences ne sont pas parvenues à mettre en évidence un effet de la prédictibilité des fluctuations sur l'évolution, telle l'expérience d'évolution expérimentale de Hughes et al. 2007a réalisée sur *E. coli* dans des environnements dont le pH alternait soit de manière déterministe au cours des générations soit de manière totalement aléatoire et dont l'analyse des résultats n'a pas révélé de différences de fitness entre ces deux régimes à l'issue de l'expérience. Au contraire, une étude menée sur *Caenorhabditis elegans* (Dey et al. 2016) a montré qu'au cours de l'adaptation à un environnement dont la pression partielle en dioxygène fluctuait de manière prévisible (à chaque génération) entre la valeur usuelle et une valeur plus faible entraînant une hypoxie, un effet maternel déterministe avait émergé et que ce dernier avait une valeur adaptative. Brièvement, les mères qui avaient expérimenté un environnement riche en O₂ accumulaient davantage de glycogène dans leurs ovocytes « en prévision » de l'environnement stressant (hypoxique) que leur progéniture allait expérimenter tandis que les mères vivant en hypoxie produisaient au contraire des ovocytes au contenu réduit en glycogène. Ainsi les mères qui avaient évolué dans un environnement où le stress survenait de manière prévisible ont développé une capacité d'anticipation maximisant la survie de leur progéniture. Si l'on considère désormais des fluctuations qui sont imprévisibles, l'une des stratégies dont l'émergence est attendue de manière théorique est le *bet-hedging* (en français, stratégie de répartition des risques, Tufto 2015). Celle-ci correspond à la production de descendants aux phénotypes variés, dont une fraction aura peut-être une probabilité non-nulle de survivre dans le nouvel environnement. Cependant, pour reprendre l'exemple précédent, les populations de *C. elegans* qui avaient évolué dans un environnement où la teneur en O₂ fluctuait de manière

véritablement aléatoire – et donc imprévisible – n’ont pas développé une stratégie de *bet-hedging* quant à la répartition de la teneur en glycogène des ovocytes qu’ils produisaient.

Enfin, évoluer dans des environnements qui fluctuent de manière plus ou moins prédictible peut affecter différemment la manière dont les individus vont tolérer un stress. Une évolution en condition de température fluctuante menée sur des virus à ARN a ainsi pu mettre en évidence que les fluctuations fortement auto-corrélées conduisaient à une moindre tolérance à un choc thermique que lorsque les fluctuations avaient été moins prévisibles (**Wieczynski et al. 2018**). Les auteurs interprètent cet effet par l’existence d’un compromis entre ajustement du taux de croissance à l’environnement et tolérance à un choc thermique. Ils concluent que, lors de l’évolution en environnement prédictible, l’adéquation entre environnement et croissance qui a pu se mettre en place se soit faite au détriment de la tolérance aux stress.

Une autre caractéristique des fluctuations qu’il est important de prendre en considération concerne la périodicité des fluctuations. Il a ainsi été prouvé que des fluctuations « rapides » (mais toujours supérieures au temps de génération de l’organisme considéré) sont davantage limitantes vis-à-vis de l’émergence d’un certain niveau de plasticité phénotypique que des fluctuations « lentes » (**Tufto 2015**). Il a par ailleurs été démontré l’existence d’une interaction entre périodicité des fluctuations et temps de génération et donc que le nombre de générations contenues entre deux fluctuations est un paramètre pouvant avoir d’importantes conséquences évolutives. Ainsi, **Venail et al. 2011** ont fait évoluer un clone de *Pseudomonas fluorescens* durant 100 générations sous quatre régimes de fréquence de fluctuation différents, allant d’une fluctuation toutes les 6,5 générations à un seul changement au milieu de l’expérience. En isolant des clones, ils ont alors mis en évidence que la diversité phénotypique était maximale lorsque l’évolution avait eu lieu dans les conditions où l’environnement alternait selon une fréquence intermédiaire (une fluctuation toutes les 26 générations). Concernant les apports théoriques relatifs à la question de l’effet des fréquences des fluctuations et leurs conséquences, certains modèles prévoient que la rapidité avec laquelle fluctue l’environnement joue un rôle sur le maintien plus ou moins important du polymorphisme à l’échelle moléculaire (**Dean et al. 2017**).

1.2.2.2. Sélection fluctuante, polymorphisme génétique, compromis adaptatifs et émergence de phénotypes généralistes

Outre les mutations, la migration et la recombinaison introduisant en permanence de la variation génétique au sein des populations, deux autres sources principales de maintien du

polymorphisme génétique existent : les effets fréquence-dépendants et les variations de la valeur sélective au cours du temps. Il a été démontré de manière théorique que le polymorphisme peut être maintenu en condition de fluctuations environnementales pour des populations d'organismes haploïdes, et ceci même en absence de sélection fréquence-dépendante négative et d'interférence entre clones (**Dean et al. 2017**).

Le devenir d'une mutation en condition de fluctuations est encore peu compris, et a essentiellement été étudié d'un point de vue théorique. Quand un allèle est avantageux dans deux environnements, alors sa probabilité de fixation est simplement décrite par le gain de fitness qu'il apporte en moyenne (arithmétique) dans ces deux environnements (**Saakian et al. 2019**). Mais lorsque l'allèle considéré est tantôt bénéfique tantôt défavorable selon l'environnement dans lequel il se trouve placé (sélection balancée) et à condition que les fluctuations ne soient pas trop rapides, alors ce résultat n'est plus valable (**Cvijović et al. 2015**). Ainsi, même lorsqu'en moyenne sur l'ensemble des fluctuations le gain de fitness qu'un allèle procure vaut zéro, l'allèle peut être maintenu et fixé. De manière formelle, c'est en fait la moyenne *géométrique* qui, en cas de sélection balancée, intervient pour décrire la probabilité de fixation d'un allèle (**Ketola et al. 2014**). Les effets des fluctuations environnementales sur l'évolution des fréquences alléliques ont pu être mis en évidence par des approches empiriques. Il a par exemple été récemment montré, au sein d'une même population de la plante annuelle *Mimulus guttatus* suivie sur trois années, que la fréquence d'allèles à certains loci (ceux qui ont un effet pléiotrope antagoniste sur la taille de la plante et sa précocité de reproduction) variait de manière concertée avec le *pattern* annuel des précipitations (**Troth et al. 2018**). Cette étude illustre le fait que la sélection balancée peut intervenir dans le maintien du polymorphisme sur des échelles extrêmement brèves (ici, d'une génération à l'autre).

L'idée selon laquelle les fluctuations environnementales ralentiraient l'évolution moléculaire – dans la mesure où elles freineraient la fixation de mutations bénéfiques par rapport à une sélection unidirectionnelle – est très discutée par les modèles théoriques. Ces derniers tendent à montrer que ce n'est pas nécessairement le cas, et qu'il est même possible que ce soit l'inverse qui se produise. En effet, les fluctuations auraient ainsi plutôt tendance à augmenter la probabilité de fixation (**Cvijović et al. 2015 ; Huerta-Sanchez et al. 2018**). De ce point de vue, certains auteurs suggèrent que les fluctuations puissent promouvoir la divergence au sein d'une population (grâce à l'accumulation de variants qui se fixent) (**Huerta-Sanchez et al. 2018**). Cela nous amène finalement à nous demander si les individus adaptés aux fluctuations de leur environnement sont devenus « généralistes » – c'est-à-dire performants

sur toute la gamme des valeurs que décrit le paramètre fluctuant – ou s'ils sont plutôt devenus spécialisés pour ces fluctuations.

Le lien entre adaptation à un environnement fluctuant et à un environnement stable a principalement été étudié chez les micro-organismes et notamment chez la bactérie *Escherichia coli*. Concernant l'adaptation d'*E. coli* à des pH fluctuants, il a été montré que les populations qui avaient évolué en environnements stables étaient devenues spécialistes pour ces environnements tandis que les populations qui avaient été soumises à des niveaux d'acidité fluctuants étaient certes adaptées aux fluctuations mais également performantes dans des environnements stables (**Hughes et al. 2007a**). Les populations fluctuantes étaient donc devenues généralistes. Ce résultat indique en outre une absence de compromis adaptatif entre le fait de s'adapter à des conditions d'acidité fluctuantes et la tolérance aux environnements présentant des pH stables. Toujours chez *E. coli*, mais cette fois concernant les fluctuations de température, les résultats obtenus restent contrastés et appellent des études supplémentaires. Ainsi Richard Lenski et ses collaborateurs ont mis en évidence une évolution vers un phénotype généraliste après évolution en fluctuations dans certaines de leurs expériences (**Leroi et al. 1994 ; Bennett & Lenski 1996**) mais pas dans d'autres (**Bennett et al. 1992**).

Enfin, la mise en place d'adaptations à des conditions fluctuantes ne s'accompagne pas nécessairement d'un coût de fitness lorsque la pression de sélection qui s'exerçait de manière intermittente est relâchée. Ainsi, une expérience d'évolution en laboratoire a été conduite afin de comprendre comment des bactéries résistantes à des antibiotiques pouvaient rester performantes et ne pas être pénalisées en l'absence d'antibiotique dans leur environnement (**Melnyk et al. 2017**). Pour ce faire, les chercheurs ont exposé soit de manière intermittente soit de manière continue la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à la ciprofloxacine et ils sont parvenus à montrer que la résistance qui en émergeait s'accompagnait effectivement d'un coût, mais uniquement lorsque la pression de sélection avait été maintenue constante : les bactéries ayant évoluées en conditions fluctuantes pour la présence de l'antibiotique avaient au contraire évolué vers une *cost-free resistance*. L'alternance d'exposition avait conduit à favoriser de manière secondaire (après développement de la résistance) un set de mutations qui compensait le coût associé à celles initialement fixées lors de la mise en place de cette résistance.

1.3. Plasticité phénotypique en réponse aux variations environnementales

1.3.1. Définition de la plasticité phénotypique

La plasticité phénotypique est définie comme la capacité d'un génotype donné à produire différents phénotypes selon l'environnement (biotique ou abiotique) dans lequel il se trouve (**Pigliucci 2006**). Ainsi, la plasticité se définit au niveau d'un individu ou d'un groupe d'individus génétiquement semblables. Ce terme a d'ailleurs été forgé par Woltereck lorsqu'il étudiait des populations clonales de daphnies et qu'il a mis en évidence l'effet de la présence de prédateurs sur la forme et la structure du corps de ces petits crustacés (**Woltereck 1913**). La plasticité a beaucoup été étudiée chez les plantes (**Schlichting 1986**) ainsi que sur certains animaux modèles (tels que *Drosophila melanogaster*, **Waddington 1942 ; Waddington 1953**). Bien que les premières études s'intéressant à la relation entre environnement et phénotype aient porté sur des traits morphologiques, la définition de la plasticité peut s'appliquer à tous types de traits, qu'ils soient « macroscopiques » ou moléculaires.

Pour décrire les phénotypes plastiques au sein d'un échantillon, on représente classiquement une norme de réaction, qui décrit la variation du trait considéré présentée par un certain génotype en fonction de l'environnement (**Falconer & Mackay 1996 ; Hufford et al. 2006**). La norme de réaction permet de visualiser graphiquement le niveau de plasticité du génotype en question. Dans le cas d'une norme de réaction linéaire, la pente de la norme de réaction renseigne ainsi sur le degré avec lequel un trait est affecté par l'environnement : plus celle-ci est élevée, plus le trait est sujet à des modifications en fonction de l'environnement et donc plus sa plasticité est importante. Considérons schématiquement trois cas pour lesquels il y a un effet génétique, mais pour lesquels l'environnement n'a soit pas d'effet, soit un effet similaire pour tous les génotypes, soit différent selon les génotypes (voir **Figure 14**). Si pour les génotypes comparés le niveau du trait est invariable selon l'environnement, alors le déterminisme du trait est uniquement de nature génétique et il n'y a pas de plasticité : les normes de réaction sont horizontales et non superposées (cas **A**). Si l'environnement influe de la même manière le niveau du trait quels que soient les génotypes considérés, alors par définition ces génotypes sont identiquement plastiques : les normes de réactions sont non superposées et de pentes identiques non nulles (**B**). Enfin, dans le cas où les génotypes considérés sont plastiques mais ne sont pas affectés de la même manière par l'environnement (*i.e.* existence d'un effet d'interaction génotype-par-environnement), alors les pentes des normes de réactions seront non identiques (**C**).

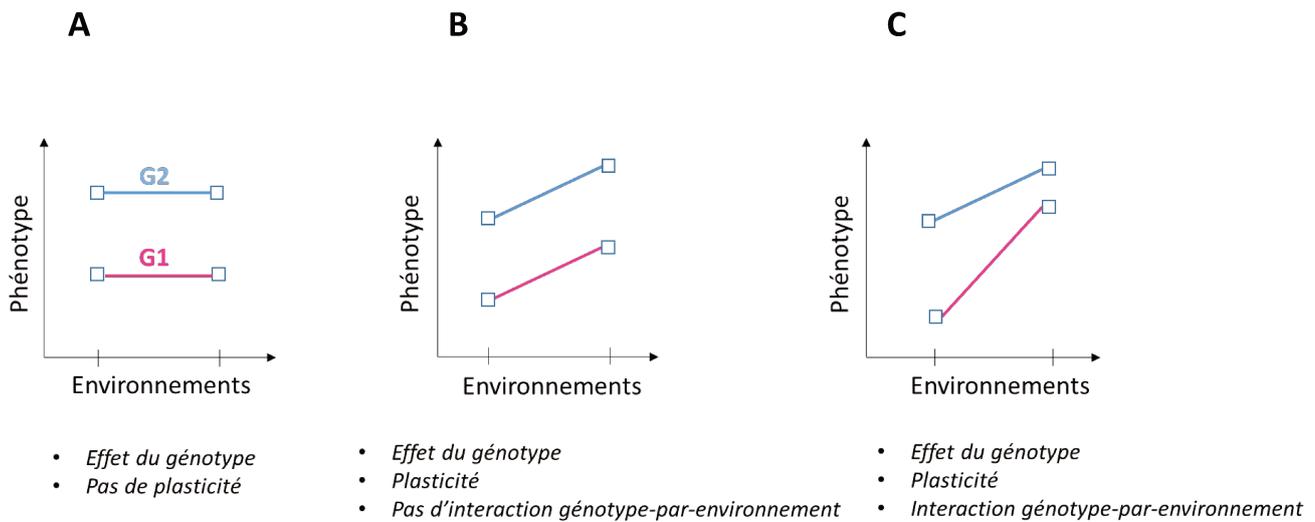


Figure I. 14 - Effets génétique, environnemental et de l'interaction génotype-par-environnement sur la variation d'un trait quantitatif

La valeur prise par un trait quantitatif est représentée en ordonnées. Le phénotype est mesuré chez deux individus, dans deux conditions environnementales différentes (abscisses). Dans les trois cas illustrés, le génotype G2 (bleu) exprime toujours, en moyenne sur les deux environnements testés, le phénotype à un niveau plus élevé que le génotype G1 (rose). Il y a donc un déterminisme génétique pour le trait considéré.

A : illustration du cas où aucun des deux génotypes n'est plastique : leurs normes de réactions sont plates, indiquant que l'environnement dans lequel les individus sont placés n'affecte pas le niveau du trait.

B : illustration du cas où les deux génotypes sont identiquement plastiques. Le parallélisme des normes de réaction traduit le fait que le changement d'environnement induit des variations phénotypiques similaires pour les deux génotypes : il n'y a pas d'effet génotype-par-environnement.

C : illustration du cas où les deux génotypes sont plastiques, mais de manière non-similaire. L'effet du changement d'environnement affecte les deux génotypes de manière significativement différente : on parle d'effet d'interaction génotype-par-environnement. Ici, le génotype G1 est davantage plastique que le génotype G2. Notons que la diversité des réponses plastiques à un même changement environnemental entre individus au sein d'une même population est un prérequis à l'évolution du niveau de plasticité phénotypique.

Récemment de nombreux efforts ont été entrepris pour intégrer la plasticité phénotypique dans le cadre de la théorie synthétique de l'évolution, qui met davantage l'accent sur les mutations comme cause proximale d'adaptation et considère l'environnement quasi-uniquement comme un filtre et non comme source de variabilité en soi (**West-Eberhard 2003**). Dans ce cadre, de nombreux auteurs rappellent que la sélection agit avant tout sur les phénotypes et donc que tous les phénomènes pouvant modifier la distribution des phénotypes au sein d'une population – au premier rang desquels la plasticité phénotypique – possède un rôle évolutif primordial (**West-Eberhard 2003 ; Pigliucci et al. 2006**).

1.3.2. Evolution de la plasticité phénotypique

Pour que la sélection puisse opérer sur le niveau de plasticité phénotypique, il est nécessaire – comme pour tout trait – que cette dernière présente de la variabilité génétique au sein des populations. Or, un tel effet d'interaction entre génotype et environnement est observé sur la plupart des traits étudiés (**Pigliucci 2005 ; Gibson 2008**). L'héritabilité de certaines réponses plastiques a par ailleurs pu être étudiée dans certains cas (**Relyea 2005**) et est en général légèrement plus faible que celle estimée lors de la transmission de traits intra-environnement (**Scheiner 1993 ; Van Kleunen & Fischer 2005**). De nombreuses études, menées sur des organismes aussi divers que *Saccharomyces cerevisiae* (**Yadav et al. 2016**), l'orge sauvage *Hordeum spontaneum* (**Van Kleunen & Fischer 2005**) ou *D. melanogaster* (**Lafuente et al. 2018**) ont trouvé des QTL de plasticité pour les traits qui étaient étudiés (taux de croissance, croissance et taille, respectivement).

Ainsi, malgré l'existence de coûts associés à la plasticité phénotypique (**Dewitt et al. 1998 ; Auld et al. 2010**), celle-ci peut évoluer au sein des populations. Cela nous amène par la suite à considérer le caractère adaptatif ou non que peuvent prendre les réponses plastiques en réponse à divers changements : n'y a-t-il pas des réponses plastiques qui puissent être mal-adaptatives et nuire aux individus plutôt que les avantager ?

1.3.3. Caractère adaptatif de la plasticité phénotypique

Au cours d'une réponse plastique, le changement phénotypique peut être adaptatif ou mal-adaptatif, c'est-à-dire dans ce cas éloigner les individus de l'optimum à atteindre lorsqu'ils sont placés dans un environnement nouveau (**Ghalambor et al. 2007**). Ces différentes possibilités sont représentées schématiquement sur la **Figure 15**.

Nous nous intéresserons ici essentiellement à la plasticité qui se met en place à l'échelle moléculaire.

La modification de nombreux paramètres abiotiques (température, pH, osmolarité, pression partielle en dioxygène, etc ...) peut altérer la vitesse des réactions enzymatiques. Plus généralement, les modifications de température peuvent avoir des conséquences importantes, dont la plupart ne traduisent aucun phénomène actif mais simplement des conséquences subies et passives des lois de la thermodynamique (aussi bien en ce qui concerne la vitesse des réactions que le repliement des molécules ou encore la fluidité membranaire). Les réponses plastiques à un changement d'environnement seront qualifiées de passives lorsqu'elles résultent d'une simple susceptibilité à l'environnement : les variations environnementales ne sont alors pas perçues comme un signal, faute de machinerie dédiée à leur perception, et aucune réponse de nature régulatrice n'est mise en place (**Whitman & Agrawal 2009**). A l'inverse, la perception active des changements environnementaux et la mise en place d'une réponse plastique « appropriée » font toujours intervenir des mécanismes moléculaires responsables de la nouvelle valeur du phénotype (**Nicotra et al. 2010**).

Les réponses moléculaires aux changements d'environnement ne sont cependant pas toutes subies. Certaines d'entre elles sont essentielles à la mise en place d'une réponse permettant d'ajuster le phénotype à l'environnement (ou du moins d'en tamponner les effets délétères). C'est le cas par exemple de l'intense transcription et traduction des *Heat Shock Proteins* (HSP) lors d'un stress thermique, processus permettant de stabiliser les protéines les plus instables aux températures élevées (**Whitman & Agrawal 2009**). De même, certaines plantes sont capables de produire des anthocyanes en cas d'excès de lumière, ces derniers assurant une protection de la machinerie photosynthétique (**Nicotra et al. 2010**). Chez les micro-organismes, l'exemple le plus connu de régulation du niveau d'expression des gènes lié à l'environnement et ayant clairement une valeur adaptative concerne le mode de fonctionnement de l'opéron lactose chez *E. coli*, élucidé par Jacob et Monod (**Jacob & Monod 1961**). Bien que rarement abordé sous le

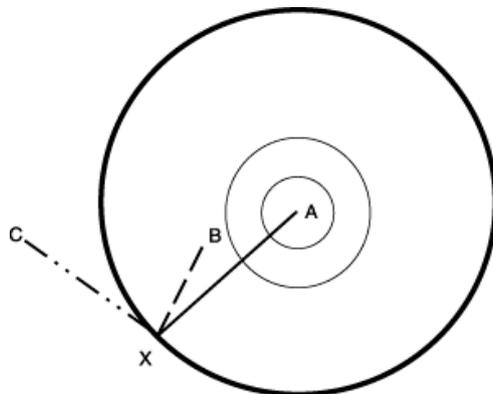


Figure I. 15 - Caractère adaptatif ou mal-adaptatif d'une réponse plastique

La position du symbole « X » sur le cercle le plus extérieur de la figure représente le phénotype exprimé par l'individu dans son environnement natif. Le centre des cercles concentriques représente l'optimum phénotypique à atteindre dans un nouvel environnement. Trois cas sont présentés :

« A » : Plasticité parfaite lors du changement d'environnement : le phénotype de l'individu placé dans le nouvel environnement coïncide exactement avec la position de l'optimum à atteindre.

« B » : Plasticité adaptative lors du changement d'environnement : le phénotype de l'individu placé dans le nouvel environnement se rapproche de l'optimum à atteindre.

« C » : Plasticité mal-adaptative lors du changement d'environnement : le phénotype de l'individu placé dans le nouvel environnement s'éloigne de l'optimum à atteindre.

D'après **Ghalambor et al. 2007**, Figure 2

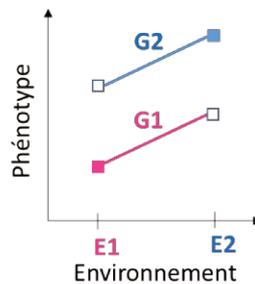
prisme de la plasticité phénotypique, ce dernier répond pourtant à la définition : le phénotype (la capacité à utiliser le lactose comme ressource) dépend de l'environnement et ne s'exprime que dans certaines conditions environnementales (absence de glucose et présence de lactose). Concernant plus spécifiquement la valeur adaptative des changements d'expression des gènes en fonction de l'environnement, les résultats sont par ailleurs assez contrastés. Une étude transcriptomique menée à partir de deux populations d'huitres *Crassostrea gigas* a montré une corrélation positive entre le sens des divergences de niveau d'expression et la direction de l'évolution du niveau de plasticité (Li et al. 2018). Ces résultats ont été interprétés comme suggérant le caractère adaptatif de la plasticité mise en place en réponse au stress thermique testé. Cette approche qui consiste à étudier comment le niveau d'un trait plastique est affecté par l'environnement en le comparant au niveau qu'expriment les individus natifs des environnements considérés – et qui sont supposés y être localement adaptés – est souvent utilisée en écologie comme critère informatif de la valeur adaptative de la plasticité. Ainsi, la plasticité sera qualifiée d'adaptative si le phénotype des individus placés dans un nouvel environnement converge vers celui des individus adaptés à cet environnement et mal-adaptatif s'il s'en éloigne. Ces deux scénarios sont présentés sur la **Figure 16**. Un tel type de raisonnement peut également être mis à profit sur des données issues d'évolution expérimentale, et notamment sur les données transcriptomiques qui ont l'avantage de permettre l'étude de plusieurs milliers de traits simultanément, facilitant la généralisation. Ainsi une méta-analyse de données transcriptomiques issues d'évolutions expérimentales menées sur divers organismes (*E. coli*, *S. cerevisiae*, guppy *Poecilia reticulata*) a révélé que la plasticité du niveau d'expression que présentent initialement des individus vis-à-vis d'un environnement auquel ils n'ont jamais été exposés va très majoritairement en sens inverse de l'adaptation qui s'ensuit (Ho & Zhang 2018). Les résultats de cette étude vont donc dans le sens d'une réponse mal-adaptative du transcriptome à un nouvel environnement, à l'inverse de ceux trouvés chez *C. gigas*.

Enfin, rappelons tout de même que les organismes peuvent présenter de la plasticité phénotypique à d'autres échelles que l'échelle moléculaire : modifications morphologiques, développementales ou encore métaboliques. Ces modifications plastiques résultent de la transformation d'un signal environnemental en une réponse phénotypique complexe (Beldade et al. 2011). Ces réponses ont généralement un caractère adaptatif même s'il n'est pas toujours aisé de partitionner ce qui, dans l'établissement du nouveau phénotype, relève d'une

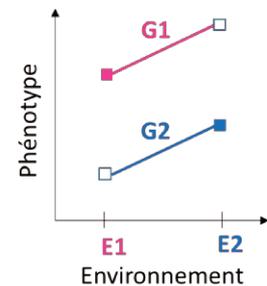
- Phénotype dans l'environnement natif (considéré comme optimal)
- Phénotype dans l'environnement non-natif

G1 localement adapté à l'environnement E1

G2 localement adapté à l'environnement E2



Plasticité adaptative chez G1 et G2



Plasticité mal-adaptative chez G1 et G2

Figure I. 16 - Orientation du caractère adaptatif ou non d'une réponse plastique grâce à différents génotypes localement adaptés à leur environnement

La valeur prise par un trait quantitatif est représentée en ordonnées. Le phénotype pour le trait considéré est mesuré chez deux individus aux génotypes distincts, dans deux conditions environnementales différentes (abscisses). Nous supposons ici que le génotype G1 (rose) est localement adapté à l'environnement E1 (adaptation illustrée par le carré plein rose). De manière similaire, le génotype G2 (bleu) est supposé localement adapté à l'environnement E2 (carré plein bleu). De plus, le niveau phénotypique présenté par les individus dans les environnements auxquels ils sont respectivement adaptés – E1 pour G1 et E2 pour G2 – est considéré comme optimal (ou proche de l'optimum). Lorsque la réponse plastique présentée par un génotype lorsqu'il est confronté à un nouvel environnement tend à le faire se rapprocher de l'optimum à atteindre dans cet environnement, alors la plasticité est adaptative (*cas représenté à gauche*). Inversement, si la réponse au changement d'environnement tend à faire s'éloigner de la valeur phénotypique optimale les individus plastiques, alors la plasticité est mal-adaptative (*cas représenté à droite*).

Inspiré de **Ghalambor et al. 2007**, Figure 1

conséquence passive ou d'une véritable réponse active au nouvel environnement rencontré (Van Kleunen & Fischer 2005).

1.3.4. Devenir de la plasticité phénotypique au cours des processus adaptatifs et rôle des fluctuations environnementales

1.3.4.1. Effet Baldwin et assimilation génétique

Lorsque l'on s'intéresse au devenir d'un trait plastique soumis à sélection, il est important de distinguer deux phénomènes qui nécessitent d'être bien définis car souvent confondus (Pigliucci 2006) : (1) l'effet Baldwin (encore appelé accommodation génétique par West-Eberhard 2003) et (2) l'assimilation génétique. L'effet Baldwin résulte du fait que des individus plastiques soient dans un premier temps favorisés par leur niveau de plasticité dans la mesure où cela leur accorde un « délai de survie » dans leur nouvel environnement, ce qui dans un second temps permet à la sélection d'agir en renforçant le trait dans la direction de la plasticité initiale (Loison 2019). Ainsi, l'effet Baldwin décrit simplement la mise en place d'une adaptation dans un nouvel environnement qui vient renforcer une réponse adaptative plastique. L'effet Baldwin est définie indépendamment du devenir de la plasticité initiale une fois l'adaptation mise en place (Ehrenreich & Pfennig 2016). Ceci est la différence fondamentale avec l'assimilation génétique qui, comme l'effet Baldwin conduit par sélection à un changement adaptatif dans la même direction que la plasticité initiale, mais suppose en plus une perte de cette plasticité : le trait initialement plastique reste au même niveau, que ce soit dans l'environnement ancestral ou dans le nouvel environnement auquel l'individu est désormais adapté. Les différentes conséquences de ces deux effets en termes de plasticité à l'issue de l'adaptation sont illustrées sur la **Figure 17**. Concernant l'effet Baldwin, l'exemple des lézards *Uta stansburiana* permet très bien de l'illustrer (Corl et al. 2018). La plasticité phénotypique de la coloration cutanée chez cette espèce de lézards en fonction du substrat rocheux leur a permis de s'établir sur une coulée de lave puis des changements génétiques sont venus par la suite renforcer ce trait dans la direction de la plasticité initiale. Ainsi, sans pour autant perdre leur plasticité, les lézards vivant sur la coulée ont évolué vers une coloration encore plus foncée (modification du phénotype par élévation de la norme de réaction), permettant un meilleur camouflage des individus. En ce qui concerne la perte de plasticité associée à l'assimilation génétique, il a été proposé qu'elle soit sélectionnée lorsque la plasticité initiale se révèle être coûteuse (Gomez-Mestre & Jovani 2013).

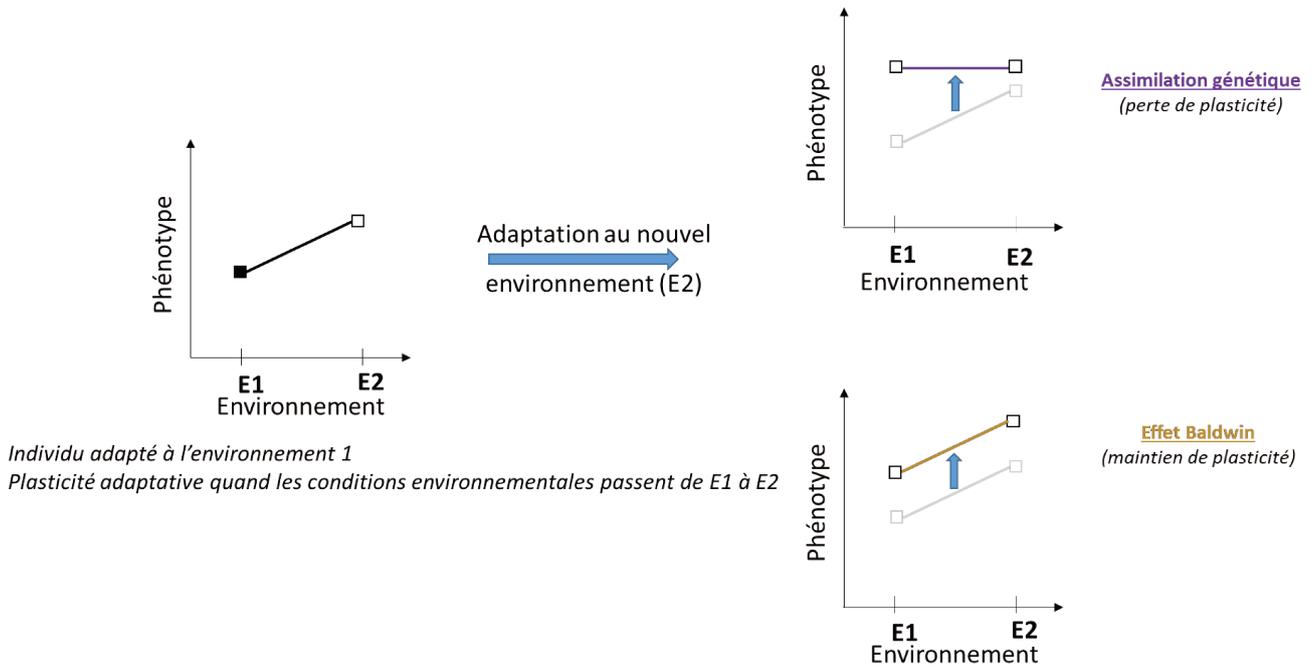


Figure I. 17 - Effet Baldwin et assimilation génétique : des conséquences différentes sur le niveau de plasticité à l'issue de l'adaptation

Considérons une population d'individus localement adaptés à l'environnement E1 et présentant une réponse plastique adaptative lors du changement d'environnement E1 → E2 : le phénotype des individus plastiques se rapproche de l'optimum dans le nouvel environnement E2 (correspondant ici à une valeur plus élevée que l'optimum dans l'environnement E1). Le délai de survie accordé par cette plasticité autorise la mise en place d'une adaptation à l'environnement E2. Dans le cas schématisé en haut à droite (accommodation génétique), cette adaptation s'accompagne d'une perte de plasticité. A l'inverse, dans le cas schématisé en bas à droite (effet Baldwin), la plasticité phénotypique est maintenue après adaptation au nouvel environnement.

Concernant les variations génétiques sélectionnées lors de la phase d'adaptation lors des processus d'effet Baldwin ou d'assimilation, la plupart des auteurs s'accordent à dire que celles-ci existaient avant le changement d'environnement mais qu'elles étaient à l'état cryptique et que c'est justement le changement d'environnement qui a pu les « révéler » et permettre à la sélection d'agir sur elles (**Levis & Pfennig 2016**). Notons enfin que ce qui est interprété comme de l'assimilation génétique pourrait simplement résulter du fait que le seuil à partir duquel la plasticité se met en place ait évolué vers une valeur plus élevée pour la variable environnementale considérée (**Sikkink et al. 2014**).

1.3.4.2. Evoluer dans un environnement fluctuant favorise-t-il l'évolution de la plasticité phénotypique: focus sur la plasticité du niveau d'expression

Nous allons ici discuter spécifiquement de l'effet de l'évolution en conditions fluctuantes sur la plasticité du niveau d'expression des gènes. De tels effets peuvent aussi bien être étudiés par des expériences en milieu naturel que par des expériences d'évolution expérimentale réalisées en milieu contrôlé.

Concernant ce dernier type d'approche, une étude a été menée sur des populations de *D. melanogaster* qui avaient évolué durant 300 générations en laboratoire dans deux conditions différentes vis-à-vis de l'éthanol : soit l'ensemble de la population était supplémenté en éthanol, soit seule une moitié de la population l'était et ceci alternativement d'une génération à l'autre (**Yampolsky et al. 2012**). A l'issue de l'expérience, la comparaison de la réponse du transcriptome vis-à-vis de la présence d'éthanol ne s'est pas révélée significative, indiquant que les individus ayant évolué en conditions fluctuantes n'étaient pas devenus davantage plastiques que ceux de la population contrôle. A l'inverse, toujours chez *D. melanogaster*, une autre étude a montré que l'alternance temporelle de la composition de leurs régimes alimentaires tendait, au moins dans une certaine mesure, à favoriser une forme adaptative de plasticité du niveau d'expression (**Huang & Agrawal 2016**). Les auteurs de cette étude ont en effet pu prédire, en orientant l'optimum d'expression des gènes dans deux environnements (présence de sel ; présence de cadmium) grâce à des populations « ancestrales » qui y étaient adaptées, quels gènes allaient développer de la plasticité d'expression. Et de manière intéressante, les analyses ont révélé que les drosophiles qui avaient évolué dans un environnement qui alternait entre présence de sel et de cadmium présentaient une plasticité adaptative plus forte que celles ayant

évolué en environnements stables. Enfin, chez *S. cerevisiae*, une évolution réalisée au cours de 300 générations sur des populations qui étaient soit soumises de manière continue à un stress oxydatif seul ou à un stress osmotique seul, soit soumise à un régime au cours duquel ces deux types de stress alternaient cycliquement toutes les 10 générations, a pu mettre en évidence un certain degré de plasticité adaptative spécifiquement développé par les populations ayant évoluées en conditions fluctuantes (**Dhar et al. 2013**). Plus précisément, les levures ayant évolué en environnement fluctuant se sont révélées capables, en fonction de leur environnement immédiat, d'exprimer de manière anticipatrice certains de leurs gènes à des niveaux qui étaient protecteurs vis-à-vis du prochain type de stress (oxydatif, ou osmotique) qu'elles allaient être amenées à expérimenter.

Concernant désormais les expériences en conditions naturelles, l'étude mentionnée plus haut sur l'espèce d'huitre *C. gigas* a montré que la convergence du niveau d'expression vers un état supposé optimal lors d'un changement d'environnement était d'autant plus forte que les populations étaient natives d'un environnement fortement variable (**Li et al. 2018**). Ce résultat suggère que le fait d'être localement adapté à un environnement dont variabilité et hétérogénéité sont élevées permet un plus haut degré de plasticité adaptative. Des résultats très similaires ont été trouvés lors de l'expérience menée sur les coraux *P. astreoides* : ceux issus de milieux côtiers, dont la variabilité de l'habitat est plus forte que ceux issus de pleine mer, présentaient une plasticité transcriptomique qui était davantage adaptative que ceux de pleine mer (**Kenkel & Matz 2017**). Ce dernier résultat est illustré sur la **Figure 18**.

Pour conclure, il est effectivement possible que des individus adaptés à des fluctuations environnementales développent une plasticité de niveau d'expression importante et le fait que celle-ci soit puisse être adaptative pourrait résulter d'une sélection permettant de faire face aux variations environnementales auxquelles ils sont soumis.

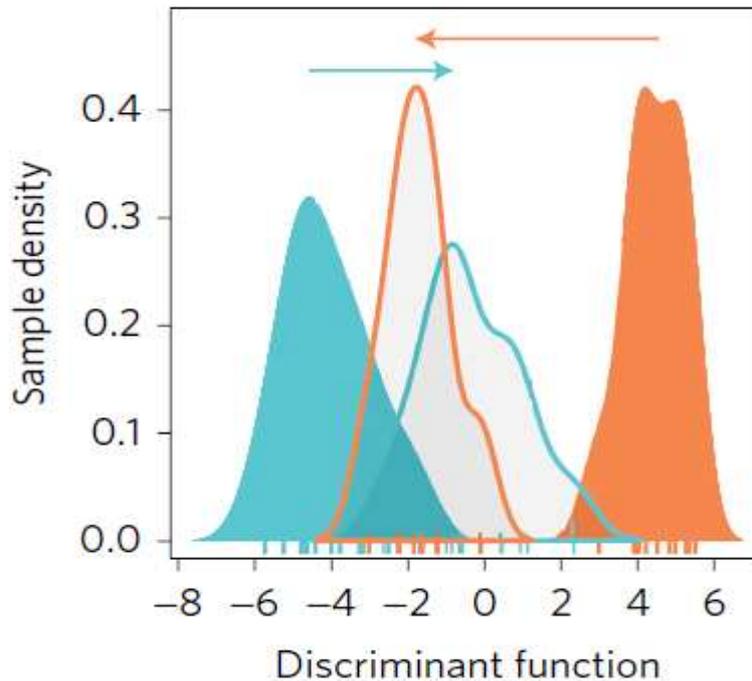


Figure I. 18 - Réponse transcriptomique adaptative suite à un changement environnemental

L'axe des abscisses représente l'axe selon lequel la différence des transcriptomes entre des individus issus de populations de coraux de haute-mer (bleu) et de rivage (orange) est maximale. En traits pleins sont représentées les deux populations de coraux lorsqu'elles sont dans leur environnement natif respectif. En transparent sont représentés les transcriptomes obtenus lorsque les populations sont transplantées de manière réciproque dans l'autre environnement: coraux de rivage, en orange, transplantés en haute-mer; coraux de haute-mer, en bleu, transplantés sur les rivages. Les deux populations, lorsqu'elles sont transplantées, convergent vers l'état transcriptomique des coraux natifs adaptés à cet environnement (*cf.* sens des flèches, se rapprochant des courbes pleines). La plasticité du transcriptome est donc de nature adaptative. On notera que cette convergence transcriptomique – permise par plasticité – vers l'état considéré comme optimal dans le nouvel environnement, est plus forte pour la population de coraux issus de l'environnement où l'hétérogénéité environnementale est forte (coraux de rivage, en orange).

D'après **Kenkel & Matz 2017**, Figure 1

1.3.5. La plasticité phénotypique : un frein ou un moteur de l'évolution ?

West-Eberhard 2003 accorde à la plasticité phénotypique, et notamment celle développementale ou comportementale, un rôle moteur dans l'évolution des populations. Cependant, son rôle évolutif fait l'objet d'un débat et certains s'accordent pour dire qu'elle est plutôt un frein à l'évolution (**Huey et al. 2003**). Il apparaît en réalité que la plasticité du trait dans une direction adaptative ou mal-adaptative est déterminante (**Ghalambor et al. 2007**). Lorsque la plasticité est adaptative, les populations plastiques se rapprochent de l'optimum à atteindre dans le nouvel environnement sans qu'aucun changement génétique ne soit requis, ce qui a pour effet de ralentir l'accumulation de mutations adaptatives au sein de la population (**Price et al. 2003**). Ceci est représenté sur la **Figure 19**. Cependant, la plasticité n'entraînant jamais une parfaite adéquation avec l'environnement, cela laisse toujours la possibilité à la sélection d'agir en sélectionnant des variants qui se trouveront être les plus proches de l'optimum (**Price et al. 2003 ; Ghalambor et al. 2007**). A l'opposé, une plasticité mal-adaptative aura plutôt tendance à accélérer l'évolution du trait considéré, comme cela a été montré chez les guppies *P. reticulata* quant à l'évolution du niveau d'expression de leurs gènes (**Ghalambor et al. 2015**). Les auteurs ont ainsi démontré, à travers une approche d'évolution expérimentale, que 89% des gènes dont l'expression avait rapidement évolué en faveur d'une adaptation étaient des gènes qui chez l'ancêtre présentaient une plasticité mal-adaptative. A l'opposé, les gènes qui présentaient une plasticité ancestrale adaptative de leurs niveaux étaient ceux qui avaient le moins divergé au cours de l'expérience.

Après avoir discuté des effets des changements environnementaux sur l'évolution de la plasticité, intéressons-nous désormais aux rôles que peuvent avoir ces changements en soi quant à la dynamique évolutive des populations qui y sont soumises. Autrement dit, comment les changements environnementaux peuvent-ils affecter l'évolvabilité des systèmes biologiques ?

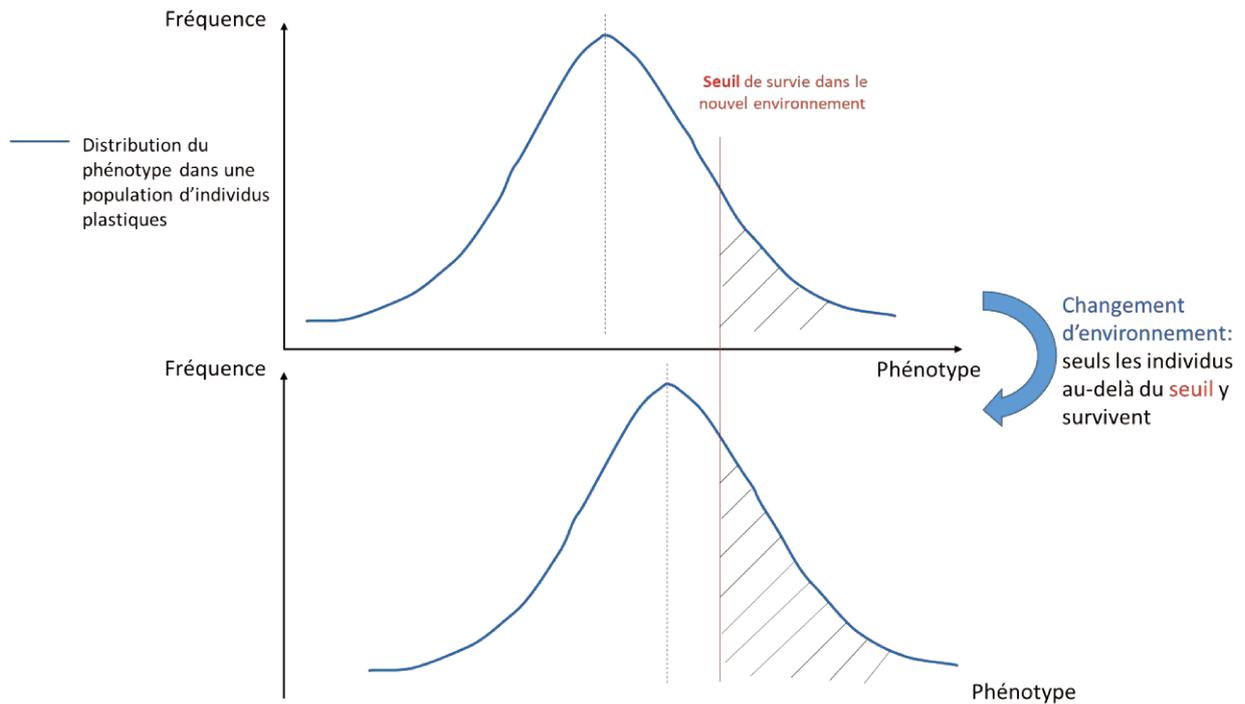


Figure I. 19 - Plasticité adaptative lors d'un changement d'environnement et délai de survie

La distribution des phénotypes d'une population d'individus dans leur environnement natif (auquel ils sont supposés être localement adaptés) est représentée en haut. Lors d'un changement d'environnement, seuls les individus dont le phénotype dépasse une certaine valeur seuil (matérialisée par la ligne verticale rouge) parviennent à survivre au changement. Le graphique du bas illustre le fait que, dans une population composée d'individus présentant une réponse plastique adaptative à ce changement d'environnement, une plus forte proportion des individus survit (par rapport au cas où les individus ne seraient pas plastiques). Dans ce cas, la plasticité accorde donc un délai de survie aux individus, leur permettant éventuellement de survivre suffisamment longtemps pour qu'ait le temps de se mettre en place de l'adaptation aux nouvelles conditions environnementales.

1.4.Des changements d'environnement comme moteurs de l'évolvabilité des systèmes biologiques

1.4.1. Définition et apport des études d'évolution expérimentale menées sur des micro-organismes

L'évolvabilité d'un organisme peut être définie comme sa capacité à générer de la variation héritable (**Kirschner & Gerhart 1998**). Les études d'évolution expérimentale peuvent aider à comprendre comment varie l'évolvabilité à mesure que les individus se rapprochent d'un optimum local et quels rôles jouent les mutations lors de ce processus (**Barrick & Lenski 2013**). Etudier des populations microbiennes asexuées qui évoluent à partir d'un clone par accumulation de mutations *de novo* présente un avantage pratique certain dans l'étude de la dynamique des processus adaptatifs. Au cours de telles expériences, on remarque souvent que l'adaptation ralentit dans la mesure où, lissés sur plusieurs centaines de générations, les gains de fitness par unité de temps diminuent (**Lenski & Travisano 1994 ; Couce & Tenailon 2015**). En émettant l'hypothèse que le taux de mutation reste constant, cela signifie que l'effet bénéfique des mutations devient de plus en plus faible. Ceci s'explique par les interactions épistatiques qu'entretiennent entre eux les loci au sein d'un génome, et qui correspondent à l'écart à l'additivité dans l'effet phénotypique des mutations. Un type particulier d'épistasie, l'épistasie à effet cumulatif décroissant (*diminishing return epistasis* en anglais), conduit ainsi à réduire le gain de fitness que procure une mutation bénéfique lorsqu'elle survient dans un contexte génétique particulier. Ainsi les premières mutations procurent des gains de fitness importants, puis l'effet des mutations suivantes est généralement « tamponné » par *diminishing return epistasis* du fait des mutations déjà accumulées dans le génome de l'organisme. L'essentielle des interactions épistatiques observées lors des expériences d'évolution à long terme fait intervenir de la *diminishing return epistasis*, expliquant le ralentissement de l'adaptation classiquement observé (**Lenski & Travisano 1994 ; Chou et al. 2011**). Dans les populations à reproduction asexuée, d'autres phénomènes peuvent ralentir l'adaptation comme l'accumulation d'un fardeau génétique par « cliquet de Müller » ou l'interférence clonale (compétition entre clones portant chacun des mutations bénéfiques différentes) (**Lang et al. 2013**).

En dépit de ces phénomènes « ralentisseurs », la dynamique adaptative des populations bactériennes évoluant en laboratoire peut parfois accélérer de façon brusque, comme cela a été

mis en évidence lorsqu'une population d'*E. coli* cultivée en présence de glucose a évolué la capacité à utiliser le citrate présent dans le milieu comme substrat énergétique. L'étude du mécanisme moléculaire de cette adaptation au citrate a révélé qu'il s'agit d'un phénomène contingent impliquant de l'épistasie dans la mesure où ce phénotype n'a pu apparaître qu'après qu'un certain nombre de mutations « potentiatrices » aient été préalablement fixées dans la population. Ces mutations ont permis de rendre l'effet phénotypique de l'événement moléculaire à la base de la capacité à utiliser le citrate (capture d'un promoteur en amont du gène codant pour le transporteur de citrate) effectif et donc sélectionnable (**Blount et al. 2008 ; Blount et al. 2012 ; Barrick & Lenski 2013**). Cette séquence d'événements contingents a finalement permis d'explorer un nouveau pan du paysage adaptatif par apparition d'une innovation métabolique.

L'évolvabilité peut également augmenter par apparition de phénotypes hyper-mutateurs (**Sniegowski et al. 1997**), qui résultent de défauts dans les mécanismes de réparation de l'ADN et conduisent typiquement à des taux de mutation de l'ordre de 100 fois supérieur par rapport aux individus non-mutateurs (**Barrick & Lenski 2013**). Bien que le spectre d'effets des mutations soit enrichi en mutations défavorables (**Eyre-Walker & Keightley 2007**), des phénotypes hyper-mutateurs peuvent cependant apparaître car présentent un coût de fitness relativement faible, peuvent résulter de l'altération d'un nombre important de loci mais surtout car ils augmentent la probabilité de générer la prochaine mutation bénéfique qui se fixera et qui par auto-stop génique conduira à la fixation de la mutation responsable du phénotype hyper-mutateur. (**Desai & Fisher 2011 ; Barrick & Lenski 2013**). Au moins dans un premier temps, la plus forte évolvabilité permise par les forts taux de mutations des lignées hyper-mutatrices peut leur accorder un avantage en termes de fitness (**Wiser et al. 2013**).

Pour conclure, l'évolvabilité peut augmenter à la suite d'une innovation métabolique (cas du citrate) ou d'une augmentation du taux de mutation (cas des lignées hyper-mutatrices). Cependant ces événements sont rares et parfois contingents et la règle semble une diminution de l'accroissement de la fitness au fur et à mesure de l'adaptation à un environnement stable. Mais arrive-t-on vraiment à un cul-de-sac évolutif ? Autrement dit, lorsque l'évolution adaptative ne semble se faire plus qu'au ralenti, qu'en est-il de l'évolvabilité ?

1.4.2. Evolvabilité et mécanismes d'accumulation de variation génétique cryptique

1.4.2.1. Définition du concept de variation génétique cryptique

Nous avons discuté plus haut du fait que la variation génétique cryptique peut favoriser la sélection naturelle à la suite d'un changement d'environnement. La variation génétique cryptique est définie comme de la variabilité qui n'est normalement pas exprimée mais dont l'effet phénotypique peut se révéler lors de changements du contexte environnemental et/ou génétique auxquels les individus qui la portent sont soumis (**Gibson & Dworkin 2004**). Il s'agit donc des variations présentes au sein d'un génome qui peuvent *potentiellement* affecter le phénotype (**Le Rouzic & Carlborg 2008**). Par définition, cette variation génétique cryptique résulte d'effets d'interaction entre génotype et environnement, et aussi d'interactions épistatiques entre mutations. Certaines études suggèrent qu'elle ait un rôle dans des processus aussi divers que la sélection artificielle, la résistance à certaines maladies génétiques (en diminuant le pénétrance des mutations causales) ou encore lors de certains épisodes macro-évolutifs (**Gibson & Dworkin 2004**). Avant d'examiner son rôle dans l'évolvabilité des organismes, examinons quels mécanismes sont susceptibles de favoriser l'accumulation de variation génétique cryptique au sein des génomes.

1.4.2.2. La robustesse aux mutations comme principal mécanisme d'accumulation de variation génétique cryptique

Depuis les travaux de **Rutherford & Lindquist 1998** montrant que la protéine HSP 90 joue un rôle canalisateur dans le développement de la drosophile, les processus capables de tamponner les effets phénotypiques de variations d'origines diverses sont de plus en plus étudiés. Depuis longtemps il est connu que le développement est un processus canalisé (**Waddington 1959**) et que certains mécanismes ont dû probablement se mettre en place au cours de l'évolution afin de d'assurer cette stabilité développementale. La canalisation développementale – telle que définie par Conrad Waddington – assure aux organismes un développement correct en dépit des changements environnementaux et/ou génétiques qui pourraient l'altérer. Depuis peu, cependant, cette notion de canalisation est sortie du champ de l'unique biologie du développement pour s'intégrer à la biologie évolutive et notamment à la

notion d'évolvabilité (**Draghi & Wagner 2009**), et l'on parle désormais plutôt de robustesse (**Siegal & Bergman 2002**). La robustesse dans un réseau d'entités biologiques interagissant entre elles et appelé(e)s « nœuds » – pouvant être des enzymes ou des facteurs de transcription, entre autres – permet au réseau de fonctionner correctement en dépit des perturbations auxquelles il peut être soumis.

Un type particulier de robustesse est la robustesse aux mutations, parfois également appelée canalisation génétique en référence aux travaux de Waddington. De nombreuses études accordent une place importante à la robustesse mutationnelle en tant que cause de l'évolvabilité des organismes (**Feder 2007 ; Payne & Wagner 2019**) : par robustesse, des mutations peuvent s'accumuler dans un génome avec peu ou pas d'effet sur le phénotype et pourront, dans certains contextes génétiques et/ou environnementaux ultérieurs bien particuliers, s'avérer bénéfiques. Certaines propriétés des réseaux biologiques peuvent assurer la robustesse aux mutations, telles la redondance fonctionnelle entre certains nœuds ou leur structure modulaire (certains sous-ensembles de nœuds fortement connectés entre eux, mais peu au reste du réseau). La redondance fonctionnelle permet par exemple, dans le cas de gènes issus d'un événement de duplication, que la fonction ancestrale soit assurée par une des deux copies, alors que l'autre accumule des mutations. Quant à la modularité, elle permet de limiter l'effet d'une mutation à un petit nombre de processus au lieu qu'elle n'impacte l'ensemble du réseau. Enfin, l'épistasie joue là encore un rôle important en termes d'évolvabilité puisque les différents environnements génétiques créés par accumulation de variation génétique cryptique au sein d'une population offrent autant d'environnements capables de potentialiser l'effet d'une future mutation (**Payne & Wagner 2019**). De nombreux modèles théoriques, et notamment ceux impliquant des réseaux de régulation, prévoient que la robustesse et donc l'évolvabilité puissent émerger de façon spontanée lors de l'évolution de tels réseaux (**Siegal & Bergman 2002 ; Draghi & Wagner 2009 ; Le Cunff & Pakdaman 2012**).

Outre la robustesse aux mutations permettant l'accumulation de variation génétique cryptique, il existe d'autres mécanismes susceptibles de favoriser l'évolvabilité, que nous allons évoquer brièvement ci-dessous.

1.4.2.3. Implications d'autres mécanismes susceptibles de promouvoir l'évolvabilité

L'étendue de la stochasticité du niveau d'expression des gènes a pu récemment être étudiée à l'échelle du génome entier par *single-cell RNA-seq*. Cette stochasticité peut résulter en une hétérogénéité phénotypique et il a été proposé que cette dernière puisse avoir un rôle dans la tolérance à certains environnements et, plus globalement, dans l'adaptation en favorisant une sous-population de cellules données (**Payne & Wagner 2019**). Il semble que la structure des promoteurs – et notamment la présence d'une boîte TATA – affecte la stochasticité avec laquelle un gène est exprimé et que ce niveau de stochasticité soit corrélée positivement avec la divergence du niveau d'expression observé entre espèces (**López-Maury et al. 2008 ; Hagai et al. 2018**). Cette corrélation positive va dans le sens d'un possible rôle joué par la stochasticité du niveau d'expression quant à la potentialité évolutive de ce dernier.

De manière générale, les enzymes peuvent catalyser des réactions annexes faisant intervenir des substrats dont la structure moléculaire est proche de celle du substrat majoritairement métabolisé. Il a été proposé que cet effet pléiotrope *a priori* sans intérêt présenté par certaines activités enzymatiques dans leur environnement natif puissent se révéler source d'adaptations lors du passage vers un nouvel environnement (**Aharoni et al. 2005 ; Tokuriki & Tawfik 2009 ; Bódi et al. 2017**).

Pour conclure, accumuler de la variation génétique cryptique (par robustesse) n'est pas la seule façon de promouvoir l'évolvabilité des systèmes biologiques : tout processus augmentant la diversité phénotypique au sein d'un environnement donné contribue au maintien d'un réservoir de potentialités adaptatives.

1.4.3. Fluctuations environnementales et maintien d'un potentiel évolutif

Nous allons enfin discuter de l'effet des fluctuations environnementales sur l'évolvabilité : promeuvent-elles ou non le potentiel évolutif des organismes qui y sont soumis ?

Les principaux résultats théoriques obtenus par modélisation portent sur l'évolution de la robustesse des réseaux biologiques (génétiques ou métaboliques), au cours de nombreuses générations. Concernant les réseaux métaboliques, il a pu être montré que les fluctuations

environnementales permettent à ces réseaux de devenir davantage robustes – en comparaison des environnements stables – aux mutations qui pourraient les affecter, et tout particulièrement aux délétions de certaines enzymes (**Soyer & Pfeiffer 2010**). Il a également été mis en évidence que la robustesse des réseaux de gènes vis-à-vis des mutations évolue plus rapidement lorsque les fluctuations sont davantage auto-corrélées dans le temps, c'est-à-dire lorsqu'elles sont davantage prédictibles (**Steiner 2012**). Il est toutefois possible que le lien entre évolution en conditions fluctuantes et émergence de robustesse mutationnelle dans les réseaux de gènes dépende des caractéristiques des fluctuations, et notamment de l'ampleur de l'écart entre les optima à atteindre dans les deux environnements, comme cela a pu être montré par ailleurs de manière théorique (**Kawecki 2000**). Quoiqu'il en soit, la plus forte robustesse aux mutations développée par les organismes évoluant en conditions fluctuantes permettrait l'accumulation de variation génétique cryptique en quantité importante dans leurs génomes, ce qui à terme pourrait favoriser leur évolvabilité.

Peu d'études empiriques permettent de tester spécifiquement le lien entre adaptation aux fluctuations environnementales et évolvabilité, notamment car cela nécessite d'estimer la fitness dans des environnements qui peuvent être très différents de ceux dans lesquels les populations ont évolué. Une telle étude a été entreprise sur la bactérie « libre » *Serratia marcescens*, qui peut devenir pathogène (de manière opportuniste) vis-à-vis d'un spectre d'hôtes très large. Après environ 1000 générations d'évolution *in vitro* soit dans des environnements où la température fluctuait, soit dans des environnements où elle était maintenue constante, les chercheurs ont comparé le taux de croissance des lignées correspondantes dans des environnements différents de celui dans lequel l'évolution avait eu lieu (**Ketola et al. 2013**) : toujours *in vitro* mais en présence dans le milieu de composés modifiant la balance redox (DTT, H₂O₂), d'un prédateur ou d'un bactériophage ; et au sein d'un hôte (*D. melanogaster*). Dans tous ces environnements, les auteurs ont observé que les bactéries qui avaient évolué en condition de fluctuations thermiques présentaient un taux de croissance plus élevé que celles issues des régimes stables, indiquant une meilleure évolvabilité (les auteurs parlent de « pré-adaptation »). Concernant le niveau d'expression des gènes, il a pu être montré que sous certaines conditions de fluctuations une population clonale peut être favorisée lorsqu'elle présente une forte stochasticité du niveau d'expression (**Thattai & van Oudenaarden 2004 ; Wolf et al. 2015**). Ceci peut contribuer à augmenter l'évolvabilité des lignées clonales lorsqu'elles évoluent dans des environnements fluctuants. Enfin notons que des changements environnementaux peuvent déclencher l'activation voire la prolifération

rapide d'éléments transposables au sein du génome et qu'il a été proposé que ce mécanisme puisse augmenter le répertoire des futures adaptations susceptibles de se mettre en place (Startek et al. 2013).

1.4.4. Les changements environnementaux comme révélateurs des effets de l'évolvabilité ?

L'idée sous-jacente au concept d'évolvabilité est celle d'une potentialité à pouvoir s'adapter et nous avons vu que cette potentialité est permise par des processus aussi divers qu'un fort taux de mutation, l'accumulation de variation génétique cryptique ou encore une capacité à produire du « bruit de fond » (stochasticité du niveau d'expression, enzymes impliquées de manière annexe dans des réactions parallèles, etc.). Mais en quelles occasions cette potentialité peut-elle être révélée et aboutir à des adaptations ? Dans un modèle contrastant les ressources utilisables par les individus avec celles dont ils disposent dans leur environnement, **Wagner 2017** propose que puisque les individus sont évolvables à *condition de trouver un environnement auquel cette évolvabilité puisse les adapter*, l'évolution soit davantage limitée par l'environnement que par la génétique et la dynamique d'apparition des mutations. Dit plus simplement et pour citer Wagner : « *if this hypothesis is true, evolutionary innovation becomes primarily a problem for ecology rather than for genetics* ». Cette hypothèse permet d'insister sur le rôle des changements environnementaux dans la « décanalisation » (ou révélation) des variations cryptiques qu'ont pu accumuler les organismes au cours du temps et permet ainsi d'envisager des alternatives à l'adaptation à de nouveaux environnements par les seuls changements génétiques (**Meyers & Bull 2002**) Un tel exemple de révélation de variation génétique cryptique lors d'un changement d'environnement est représenté en **Figure 20**. Ce modèle ne remet cependant pas en cause le rôle fondamental que jouent les mutations dans les phénomènes adaptatifs, dans la mesure où elles sont nécessaires à l'accumulation de variation génétique cryptique.

En définitive, il est nécessaire d'envisager que les changements environnementaux puissent se révéler bénéfiques en soi, en permettant de révéler des adaptations jusqu'alors latentes.

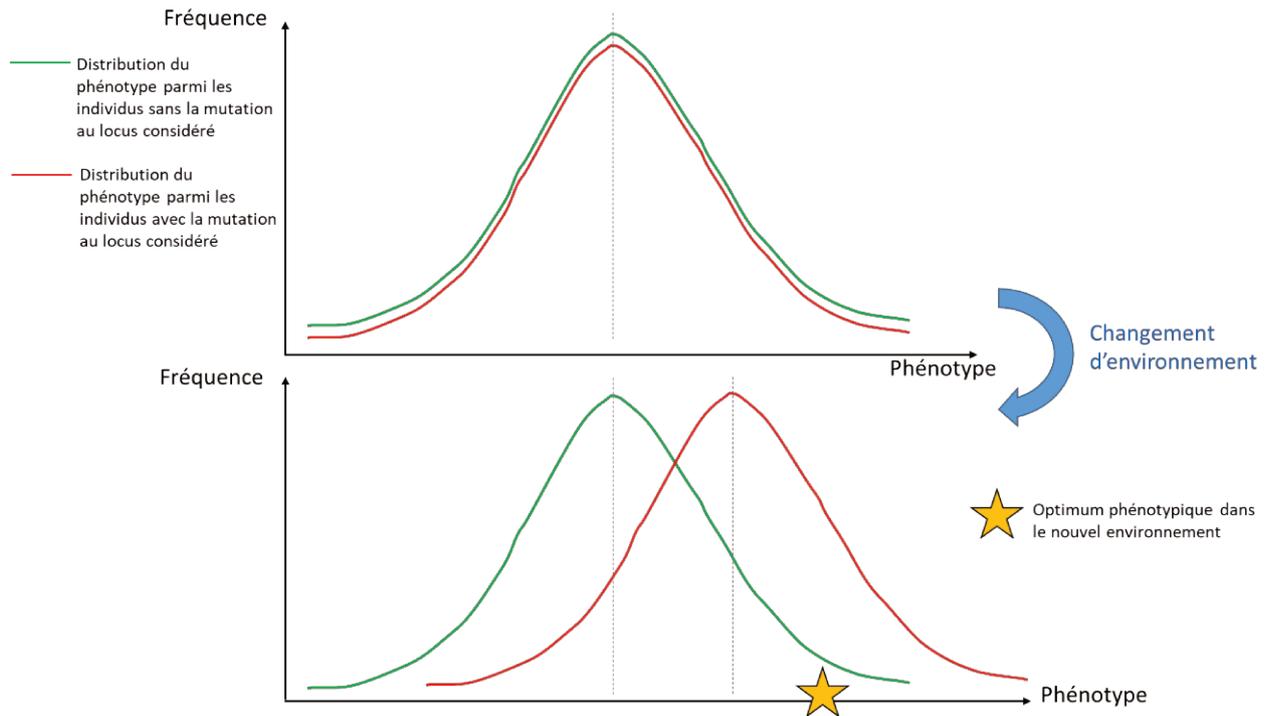


Figure I. 20 - Révélation de l'effet phénotypique de la variation génétique cryptique à l'issue d'un changement d'environnement : cas où cette variation est adaptative lors du passage vers un nouvel environnement

Considérons deux sous-populations d'individus qui diffèrent par la présence d'une mutation à un locus considéré. Dans l'environnement natif, cette mutation n'a pas d'effet phénotypique (distributions superposées pour les deux sous-populations, *en haut*). En revanche, cette mutation va pouvoir procurer un avantage aux individus porteurs (en rouge) – par rapport aux autres individus (en vert) – dans un nouvel environnement (les nouveaux variants se rapprochent de l'optimum phénotypique à atteindre dans ce nouvel environnement, symbolisé par une étoile, *en bas*). Ici, le seul effet du changement environnemental, en révélant de la variation cryptique accumulée et pré-existante au sein de la population, a permis une adaptation. Nous pourrions également imaginer que cela conduise à une innovation biologique importante permettant de tolérer puis de coloniser un nouvel environnement (*cas non représenté*).

1.5. Evolution expérimentale des populations de micro-organismes en laboratoire

1.5.1. Définition et présentation des avantages des approches d'évolution en conditions contrôlées

Dans sa stricte acceptation l'évolution expérimentale consiste en expériences réalisées en conditions contrôlées de laboratoire et qui durent au moins quelques générations pour s'affranchir d'éventuels effets maternels (**Garland & Rose 2012**). Dans ce domaine, deux grands types d'expériences existent : *i*). les expériences de sélection artificielle lors desquelles l'expérimentateur intervient volontairement en ne laissant se reproduire que les individus présentant un certain phénotype (ou niveau de phénotype si quantitatif) ; *ii*). les expériences qui, une fois les conditions expérimentales définies par l'expérimentateur, laissent l'évolution se dérouler et les organismes se reproduire librement. Les approches d'évolution expérimentale, pour permettre de différencier ce qui relève du hasard ou de l'adaptation, doivent en plus inclure des répliques (**Kawecki et al. 2012**) ayant évolué en parallèle dans des conditions identiques (**Travisano et al. 1995 ; Garland & Rose 2012**). En présence de variation génétique pré-existante (*standing genetic variation*) au démarrage de l'expérience, la sélection pourra agir en réalisant un tri parmi les individus, à l'inverse de ce qui se passe pour une population fondatrice clonale dont l'évolution requiert l'apparition de mutations *de novo*. Ces mutations, qui apparaissent également lors de l'évolution des populations initialement polymorphes, sont par la suite soumises à sélection naturelle et/ou à dérive génétique. Un des avantages de l'évolution expérimentale repose précisément sur la possibilité d'examiner les bases génétiques, qu'elles soient apparues *de novo* ou préexistantes, des processus adaptatifs à l'œuvre (**Barrick et al. 2009 ; Barrett & Hoekstra 2011**). Ceci est très difficile à réaliser pour les populations naturelles dont l'histoire évolutive n'est généralement pas connue et complexe.

Les approches d'évolution en laboratoire permettent en outre de tester un grand nombre d'hypothèses évolutives (**Kawecki et al. 2012**) telles que l'importance des compromis adaptatifs et le rôle de la pléiotropie antagoniste, l'existence de contraintes évolutives, le gradualisme ou non de l'évolution, le rôle de l'adaptation à différents milieux dans la mise en place de phénomènes d'isolement reproducteur, l'importance des interactions épistatiques ou encore le rôle de la co-évolution dans l'adaptation. L'examen empirique de ces hypothèses repose essentiellement sur le fait que les variations environnementales non désirées sont

strictement limitées au cours des expériences d'évolution expérimentale, permettant de s'affranchir de potentiels effets confondants indésirables (**Barrett & Hoekstra 2011**).

Cependant, cet avantage est également en soi une limite, dans la mesure où l'évolution en conditions contrôlées ne reflète pas la complexité qu'expérimentent les populations dans la nature, notamment les nombreuses interactions écologiques qu'elles entretiennent entre elles ou avec d'autres communautés d'espèces. De plus, les durées des expériences d'évolution en laboratoire, même celles menées sur le long terme, restent faibles par rapport à l'échelle des temps évolutifs. Enfin, il existe d'autres limites à l'évolution expérimentale (**Kawecki et al. 2012**), telles que l'utilisation de seulement quelques espèces modèles (représentant possiblement un biais) – et parmi elles bien souvent d'individus déjà adaptés à des conditions de laboratoire – ou encore la faible taille efficace des populations dans le cas d'organismes de grande taille.

1.5.2. Quelques exemples d'adaptations (et leur base génétique) lors d'expériences d'évolution expérimentale menées sur divers types d'organismes modèles

Les approches d'évolution expérimentale ne sont pas restreintes aux seuls micro-organismes se reproduisant rapidement. Bien que le temps nécessaire pour atteindre un même nombre de générations avec certains organismes soit plus long et qu'en conséquence dépasser un millier de générations semble difficile, les résultats issus d'expériences menées chez des Métazoaires modèles apportent des informations sur les bases génétiques de l'adaptation. Les approches de génomique sont en effet réalisables sur de telles espèces, possédant généralement un génome de référence bien assemblé et dont l'annotation et la caractérisation fonctionnelle de ses éléments sont de bonne qualité. Ainsi des approches de type *evolve-and-resequence* ont été menées chez *D. melanogaster* et ont pu éclairer les liens entre adaptation et changements génétiques, au sein de populations élevées en laboratoire (revus dans **Schlötterer et al. 2015**). En particulier, une expérience de sélection quant à la rapidité du développement des drosophiles a été menée sur plus de 30 ans, soit environ 600 générations, conduisant à une maturité sexuelle de 20% plus précoce que celle observée dans les populations contrôles (**Burke et al. 2010**). Cette expérience a notamment permis de confirmer que chez les organismes à reproduction sexuée obligatoire, la sélection agit principalement sur la *standing genetic variation* au sein de la population fondatrice, conduisant à une évolution parallèle : la différenciation entre chacune des populations sélectionnées et la population contrôle fait intervenir les mêmes allèles et leur

évolution en fréquence a été similaire (**Burke et al. 2010 ; Graves et al. 2017**). De manière attendue, les substitutions non-synonymes candidates pour expliquer la différenciation génétique entre populations sélectionnées et contrôles se situaient préférentiellement au sein de gènes connus pour réguler le développement chez *D. melanogaster*. Finalement cette expérience a pu montrer que la sélection n'a pas « épuisé » la *standing-genetic variation* initialement présente dans la population fondatrice, de manière concordante avec ce qui est attendu en cas de *soft-sweep* (baisse locale du polymorphisme autour des loci sous sélection, mais qui n'atteint pas zéro comme dans le cas des *hard sweeps*): aucun allèle n'a été fixée.

La drosophile n'est pas le seul modèle animal à reproduction sexuée couramment utilisé pour réaliser des expériences d'évolution en laboratoire. Ainsi, chez le nématode *C. elegans*, des populations issues de croisements peuvent maintenir un niveau élevé d'hétérozygotie sur de nombreuses générations en dépit de leur hermaphrodisme et dans ces cas les résultats obtenus ont été similaires à ceux présentés ci-dessus pour *D. melanogaster* (*i.e.* sélection agissant sur la *standing genetic variation* et conduisant à une évolution parallèle des fréquences au loci sous sélection) (**Teotónio et al. 2017**).

Les micro-organismes, quant à eux, présentent classiquement de nombreux avantages en termes d'évolution expérimentale, tels que leurs faibles temps de générations autorisant l'étude des phénomènes évolutifs sur le long-terme, la facilité avec laquelle ils peuvent être maintenus en culture ou encore la possibilité pour certains d'entre eux de survivre à la congélation (**Bennett & Hughes 2009**). De plus, la taille généralement petite de leur génome rend d'autant plus facile le séquençage de nombreux répliquas issus d'évolution en laboratoire (**Barrett & Hoekstra 2011**). A partir d'une population polymorphe de *S. cerevisiae* diploïdes chez qui la recombinaison a été induite de manière hebdomadaire durant 18 semaines d'évolution (soit ~ 540 divisions cellulaires), il a été montré que la sélection s'effectue là encore plutôt sur la variation génétique initialement présente et non pas sur les mutations *de novo* (malgré le nombre important de générations et les grandes tailles efficaces des populations) (**Burke et al. 2014**). De même que chez *D. melanogaster*, cela a conduit à une évolution de fréquences qui était parallèle entre les 12 répliquas étudiés pour les SNPs les plus significatifs (*i.e.* ceux dont la fréquence avait le plus varié par rapport à la population ancestrale).

Ainsi, que ce soit chez les micro-organismes ou les animaux pluricellulaires, les observations montrent que l'évolution moléculaire repose avant tout sur la variation génétique préexistante. A l'inverse, chez les organismes se reproduisant de manière asexuée à partir d'une population clonale, l'évolution repose uniquement sur l'accumulation de mutations apparues

de novo. Le hasard rend donc peu probable l'occurrence de mutations similaires (à l'échelle du nucléotide) entre répliquas mais un parallélisme au niveau des gènes mutés est en revanche possible et même fréquent entre répliquas. Ce niveau de parallélisme renseigne bien souvent sur l'importance des gènes sous sélection lors du processus adaptatif, notamment si ce parallélisme implique des mutations non-synonymes (**Tenaillon et al. 2016**). Notons enfin que l'existence d'interactions épistatiques entre mutations peut à l'inverse conduire à une diversité de chemins qui soient tous adaptatifs et entraînant les populations vers une convergence phénotypique (**Tenaillon et al. 2012**).

Nous allons par la suite nous intéresser plus spécifiquement à l'évolution moléculaire au sein de populations de micro-organismes se reproduisant de manière asexuée à partir d'une population ancestrale clonale.

1.5.3. Devenir des mutations apparues *de novo* au cours de l'évolution à partir d'une population clonale

L'évolution à partir d'un clone repose uniquement sur l'accumulation de mutations apparues *de novo*, ces dernières pouvant être fixées par sélection, dérive ou autostop génétique selon leurs effets sur la valeur sélective des individus porteurs (**Barrick & Lenski 2013**). Selon le modèle mutation-dérive développé par Motoo Kimura, la fixation aléatoire d'un allèle se fera d'autant plus lentement que la taille efficace N_e de la population est importante: une mutation neutre mettra en moyenne N_e générations à se fixer (**Kimura 1983**) et, par exemple, $0.1 \times N_e$ générations à atteindre une fréquence de 10% (**Good et al. 2017**). Même en sous-estimant et en considérant des tailles efficaces de l'ordre de 10^6 individus dans les expériences d'évolution expérimentale menées sur des micro-organismes se reproduisant rapidement (*E. coli*, *S. cerevisiae*), la durée de telles expériences ne permet ainsi généralement pas d'espérer qu'une mutation puisse se fixer par dérive seule (*i.e* sans être associée à une mutation bénéfique) (**Good et al. 2017**). En considérant un taux de mutation de l'ordre de 10^{-10} par cycle cellulaire et par paire de bases (**Lynch et al. 2008 ; Wielgoss et al. 2011 ; Zhu et al. 2014**), l'importante taille efficace présentée par les populations microbiennes permet en revanche à des mutations bénéfiques d'atteindre aisément une fréquence détectable au sein de populations issues d'évolution en laboratoire, et ceci en un nombre relativement restreint (quelques centaines) de générations (**Kawecki et al. 2012 ; Maddamsetti et al. 2015**). Il est important de noter qu'une mutation procurant un bénéfice « s » ne sera détectable que lorsqu'elle aura déjà atteint une fréquence bien supérieure au seuil $f = 1/(N_e s)$ à partir duquel son devenir échappe à la dérive

génétique (**Good et al. 2017**). La fréquence d'une mutation qui vient d'apparaître est en effet extrêmement faible (initialement $1/N_e$), rendant la probabilité qu'elle soit perdue au cours des générations suivant immédiatement son apparition très forte. Ainsi les mutations détectables par les approches de séquençages de populations hétérogènes (*bulks* en anglais) se situent déjà hors de cette zone de faibles fréquences où la dérive prédomine et, s'il s'agit des mutations sous sélection (c'est-à-dire « conductrices » de l'adaptation ou *drivers* en anglais), leur fréquence augmentera en théorie jusqu'à fixation, et ce d'autant plus rapidement que s est grand. Rappelons que la probabilité de fixation d'une mutation apportant un bénéfice s est de $P \approx 2s$. Cependant, dans les cas d'évolution expérimentale par transferts en série, cette probabilité est probablement une surestimation puisqu'à chaque transfert dans un milieu frais, la taille efficace diminue généralement de façon importante et le biais de représentation de mutations ainsi créé peut avoir des conséquences importantes, notamment si certaines mutations bénéfiques étaient encore très peu fréquentes. Dans quelques rares études, les gains de fitness apportés individuellement par les mutations bénéfiques ont pu être mesurés et se situent généralement entre $s=2\%$ et $s=5\%$ (**Levy et al. 2015**).

Pour conclure, les mutations identifiées lors d'évolution en grandes populations sont en majorité des mutations bénéfiques ainsi que des mutations neutres ou légèrement délétères associées à des mutations bénéfiques. Notons tout de même que chez les lignées bactériennes présentant un phénotype hyper-mutateur, des mutations délétères peuvent parfois s'accumuler – augmentant ainsi le fardeau génétique (*genetic load* en anglais) – et que chez *E. coli* il a même été documenté des cas adaptatifs de fixation de mutations favorisant un retour vers un phénotype « moins mutateur » (**Wielgoss et al. 2013**).

1.5.4. Interférence clonale et auto-stop génétique : deux phénomènes aux conséquences importantes lors de l'évolution de populations asexuées

L'absence d'échange de matériel génétique et d'événements de recombinaison sont deux paramètres importants dont il convient de tenir compte car sont la cause des phénomènes appelés interférence clonale et déséquilibre de liaison total. Nous allons ici définir ces deux termes et discuter de leurs implications quant à l'évolution moléculaires au sein des populations microbiennes en laboratoire.

A condition que des mutations bénéfiques apparaissent et échappent à la forte dérive initiale de manière relativement fréquente, plusieurs sous-populations issues d'un même clone et qui diffèrent par quelques mutations bénéfiques qu'elles auront acquises indépendamment peuvent entrer en compétition au sein de la population. En considérant que la fitness relative des deux sous-populations l'une par rapport à l'autre soit maintenue constante dans le temps, cette compétition se terminera nécessairement par la disparition d'une des sous-populations (la création d'individus possédant d'emblée l'ensemble des mutations bénéfiques présentes dans la population étant impossible en l'absence de recombinaison). Ce phénomène de compétition entre clones portant des mutations bénéfiques acquises indépendamment est connu sous le nom d'interférence clonale (**Gerrish & Lenski 1998**). L'interférence clonale ralentit la dynamique d'évolution moléculaire, comme illustré sur le *Müller's plot* représenté en **Figure 21**. Cela conduit à la mise en place d'un polymorphisme plus durable que si cette compétition n'existait pas, les mutations bénéfiques se fixant finalement devant auparavant « éliminer » les mutations compétitrices. Des études génomiques menées aussi bien sur les populations entières ou sur des clones isolés à partir de ces populations montrent à quel point le phénomène d'interférence clonale est une réalité lors des expériences d'évolution expérimentale menées sur *E. coli* et *S. cerevisiae* (**Lang et al. 2013 ; Maddamsetti et al. 2015 ; Good et al. 2017**). Chez cette dernière espèce, il a ainsi été montré dans le cadre d'une évolution menée sur environ 1000 générations, que des mutations ayant atteintes des fréquences bien supérieures à 50% ont fini par disparaître de certaines populations car remplacées par une « meilleure » mutation, cette dernière étant apparue chez des individus qui n'étaient pas porteurs de la première mutation (**Lang et al. 2013**). Notons qu'une coexistence durable entre sous-populations peut s'établir par sélection fréquence-dépendante négative (avantage du rare) et qu'elle est alors bien plus durable que ce que permet la seule interférence clonale. De tels processus fréquences-dépendants résultent souvent d'une spécialisation écologique survenant au sein même du milieu de culture, une sous population se nourrissant par exemple des sous-produits du métabolisme des individus

d'une autre sous-population (**Maddamsetti et al. 2015**). Des phases de coexistence de plusieurs dizaines de milliers de générations ont ainsi été observées dans des populations expérimentales d'*E. coli*.

Une autre conséquence liée à la clonalité et à l'absence de recombinaison est l'effet d'autostop génétique. Dans les populations asexuées, le déséquilibre de liaison entre tous les loci du génome est en effet total : une mutation bénéfique survenant dans un fond génétique donné va augmenter en fréquence, mais entrainera également avec elle toutes les éventuelles autres mutations neutres ou légèrement délétères qui étaient déjà présentes dans le génome. Cela conduit bien souvent à des cohortes de mutations qui augmentent en fréquence de manière parallèle (**Lang et al. 2013 ; Good et al. 2017**). Ce phénomène rend difficile la recherche de causalité entre mutations et caractères. A la différence, chez les organismes à reproduction sexuée, une forte pression de sélection sur une mutation avantageuse conduit à un balayage sélectif, qui résulte en une baisse locale de polymorphisme, plus moins élevée selon l'âge du balayage sélectif. Cette impossibilité de remonter à la mutation *driver* parmi l'ensemble des mutations « passagères » chez les micro-organismes peut toutefois être surmontée par certaines approches. Pour les mutations codantes, une approche consiste à faire émerger la causalité des mutations *via* une validation fonctionnelle basée sur du génie génétique. Il est enfin possible que deux mutations au sein de la cohorte soient *drivers* (on parle alors de *co-drivers*) et cela ne nécessite pas nécessairement une occurrence simultanée très improbable des mutations, mais résulte plutôt de la discrétisation temporelle des séquençages en intervalles d'au moins quelques centaines de générations réalisés lors du suivi de la dynamique d'évolution moléculaire au sein d'une population. En effet, si une mutation bénéfique apparaît peu de temps après une autre et dans un individu porteur de la précédente alors que celle-ci est encore peu fréquente au sein de la population, le « double-mutant » pourra très rapidement rattraper son retard et finir par devenir prédominant (par rapport aux individus ne possédant que la première mutation) au sein de la population. Cet événement peut être extrêmement rapide par rapport aux temps auxquels les différents séquençages sont effectués, donnant alors l'impression que les *co-drivers* sont apparus en même temps (**Maddamsetti et al. 2015**). Chez la levure, l'importance de l'autostop génétique et du fond génétique dans laquelle une mutation génétique apparaît a pu être étudié en détail et les principaux résultats montrent que c'est le gain de fitness relative d'une mutation, combiné avec le fond génétique dans lequel elle apparaît, qui importe (**Levy et al. 2015**). Cela rend alors effectivement possible la fixation d'une mutation (légèrement) défavorable. Les phénomènes d'interférence clonale et de *genetic hitchhiking* sont, entre autres, représentés schématiquement lors de l'adaptation d'une population clonale fictive en **Figure 22**.

A. Reproduction sexuée

B. Reproduction asexuée

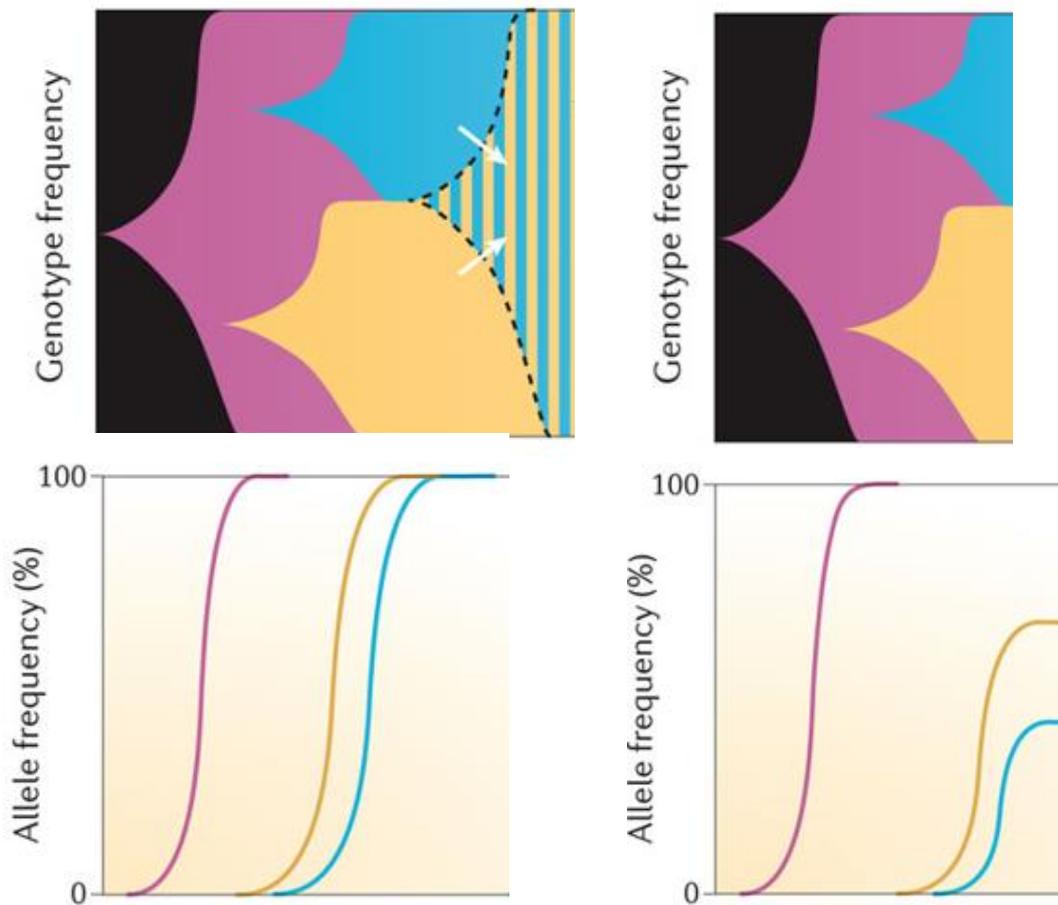


Figure I. 21 - Conséquence de la reproduction asexuée sur l'évolution des fréquences de mutations

A : Dans une population initialement clonale d'organismes pour lesquels de la recombinaison génétique est permise lors d'épisodes de reproduction sexuée, deux mutations avantageuses apparues indépendamment (mutations bleue et jaune) peuvent se combiner au sein d'un même individu (zone hachurée, *en haut*). Ce dernier, porteur des deux mutations bénéfiques, pourra alors rapidement envahir la population. Au niveau moléculaire, les deux mutations en question se fixeront rapidement et de manière quasi-simultanée (*en bas*).

B : A l'inverse, si la population est constituée d'individus d'une espèce à reproduction asexuée exclusive (et donc pour laquelle aucun événement de recombinaison n'est possible), alors l'évolution moléculaire sera ralentie par rapport au cas précédent. Seulement l'une des deux mutations bénéfiques apparues indépendamment pourra envahir la population et se fixer. S'il y a fixation, cela nécessitera auparavant qu'un des deux clones (soit celui portant la mutation bleue, soit celui portant la mutation jaune) parvienne à éliminer l'autre. Ce processus de compétition entre clones portant des mutations bénéfiques acquises de manière indépendante est connu sous le nom d'interférence clonale. L'interférence clonale ralentit d'autant plus l'adaptation que les gains de fitness procurés par les deux mutations en question sont similaires.

D'après **Barrick & Lenski 2013**

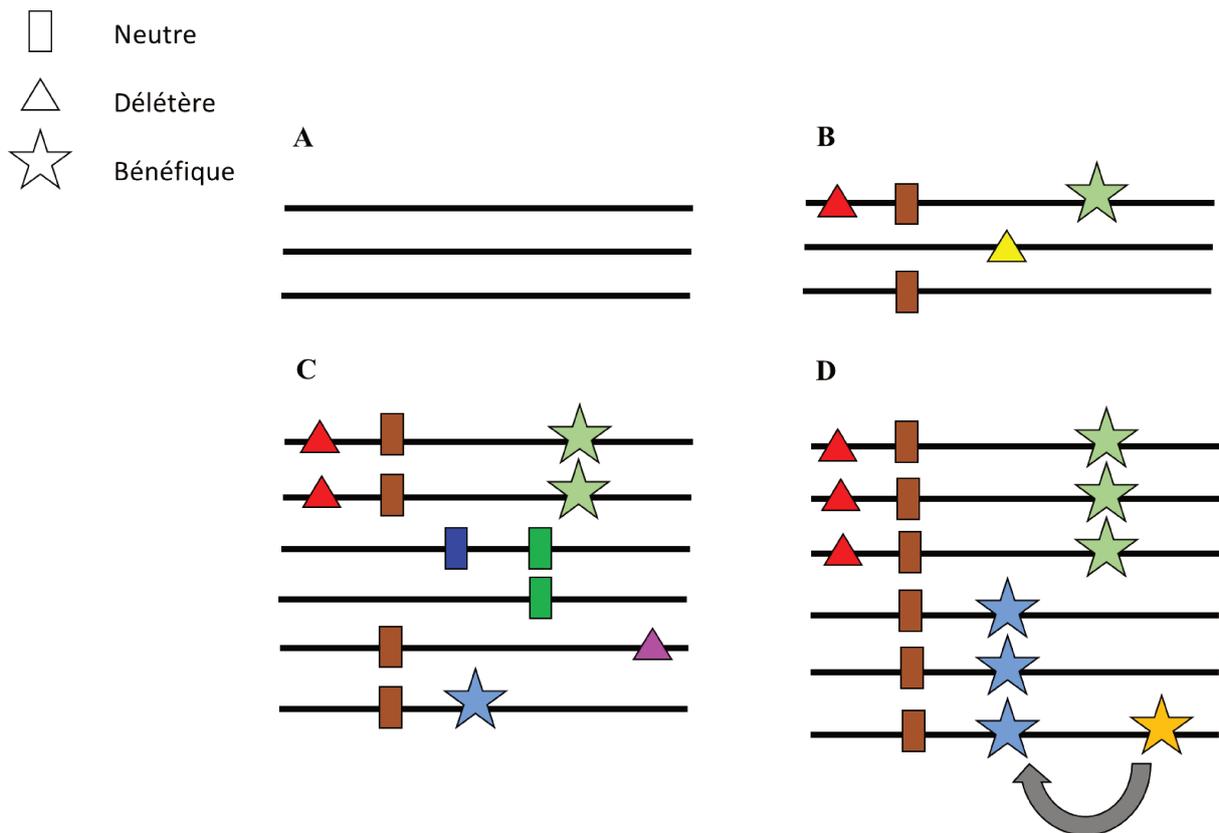


Figure I. 22 - Représentation schématique de quelques mécanismes évolutifs classiquement observés lors d'expériences d'évolution de populations asexuées en laboratoire

L'évolution d'une population initialement clonale est schématisée à partir d'un exemple fictif permettant d'illustrer certains processus évolutifs à l'œuvre lors d'expériences d'évolution expérimentale menées sur des micro-organismes se reproduisant de manière asexuée.

A : au début de l'expérience, la population est homogène d'un point de vue génétique

B : deux mutations apparaissent de manière quasi-simultanée dans un même individu, l'une étant bénéfique (étoile verte) et l'autre délétère (triangle rouge). Dans un autre individu, une autre mutation délétère apparaît (triangle jaune).

C : des mutations délétères apparaissent mais se perdent aussitôt (triangle jaune en **B**, triangle violet) à moins d'être associées à une mutation bénéfique (cas du triangle rouge). Une mutation bénéfique (étoile bleue) apparaît dans un individu non porteur de la mutation bénéfique apparue précédemment.

D : deux clones, l'un porteur de la mutation bénéfique verte et l'autre de la mutation bénéfique bleue, sont en compétition (interférence clonale). Les mutations neutres ou délétères qui y étaient associées ont été *draftées*. Dans l'une de ces deux sous-populations (celle constituée d'individus porteurs de la mutation bleue), une autre mutation bénéfique (étoile orange) apparaît. Malgré la possibilité d'épistasie à effet cumulatif décroissant (*diminishing-return epistasis* en anglais, illustrée par la flèche), il est probable que les individus porteurs des deux mutations dans leur génome deviennent majoritaires au sein de la population.

1.6. Une expérience d'évolution expérimentale réalisée au laboratoire sur *Zymoseptoria tritici*

La thèse présentée dans ce manuscrit porte sur une expérience d'évolution expérimentale menée entièrement *in vitro* sur le champignon phytopathogène *Zymoseptoria tritici*. Cette expérience a été réalisée au laboratoire UMR 1290 Bioger (INRA-AgroParisTech). L'objectif de la partie ci-dessous est de décrire le plan d'expérience qui a été défini puis suivi au cours de cette évolution expérimentale, laquelle s'est terminée quelques mois avant le début de mon contrat doctoral.

Deux individus issus d'une même population échantillonnée dans le sud de la France en 2010 ont servi de clones ancêtres (ou fondateurs) à partir desquels l'évolution a été initiée. Ces deux clones, de génotypes distincts, ont été prélevés sur deux cultivars de blé tendre différents. L'évolution expérimentale a été conduite exclusivement en culture *in vitro*, condition dans laquelle *Z. tritici* se reproduit de manière asexuée. Le milieu qui a été utilisé est du milieu liquide à base de pomme de terre (PDB, pour *Potato Dextrose Broth*). Le PDB présente l'avantage d'être un milieu peu propice aux contaminations par des levures. Un autre avantage présenté par le PDB est qu'il s'agit d'un milieu riche dans lequel *Z. tritici* croit quasi-exclusivement sous sa forme levure (*yeast-like*) et dans lequel quasiment aucun hyphes mycéliens ne se forme (à la différence des milieux limités en certains nutriments, induisant la formation d'hyphes ou de pseudo-hyphes). Cette croissance de *Z. tritici* sous forme levure lorsque cultivé *in vitro* en fait un organisme se prêtant aisément aux approches d'évolution en laboratoire – qui requièrent un nombre important de cycles cellulaires – en dépit du fait qu'il s'agisse d'un champignon qualifié de « filamenteux ». L'évolution a été menée dans de grands volumes de PDB (500 mL de milieu), permettant d'atteindre une taille efficace de population importante, d'un moins plusieurs dizaines de millions d'individus. Cette évolution expérimentale, réalisée selon un mode dit de transferts en série, a duré 48 semaines au total, avec des transferts hebdomadaires d'un nombre important d'individus lors de chaque changement de milieu. Au cours de l'expérience, de larges stocks de suspensions cellulaires étaient réalisés toutes les trois semaines. Sur la base d'une à deux divisions par jour dans les conditions choisies, l'évolution a probablement impliqué au moins 500 générations asexuées.

Chacun des deux clones ancestraux, appelés #MGGP01 et #MGGP44, a évolué dans trois environnements différents en parallèle. Pour chacun des trois environnements, trois réplicas d'évolution indépendants ont été réalisés, conduisant à un total de neuf lignées évoluées par clone de départ. Les trois environnements testés différaient par leur profil de température :

températures maintenues stables sur toute la durée de l'expérience (soit constamment à 17°C, soit constamment à 23°C) ou température alternant de manière régulière entre 17°C et 23°C toutes les 52-64h. Les températures de 23°C et 17°C ont été choisies car se situent dans la zone thermique où *Z. tritici* croît le mieux : en dessous, sa croissance est fortement ralentie ; au-dessus, il y a une transition du type de croissance *yeast-like* vers croissance sous forme d'hyphes. De plus, ces températures sont écologiquement pertinentes avec celles rencontrées par le champignon dans son environnement (*i.e.* ne sont pas supposées être stressantes) et présentent un écart de 6°C devant permettre d'induire des effets biologiques pertinents et suffisants pour être quantifiables. Pendant l'évolution, les deux ancêtres sont restés stockés à -80°C, et constituent donc le « temps zéro » de l'expérience (*Z. tritici* possède la capacité à survivre à l'issue de longues périodes de stockage à -80°C).

L'ensemble des dix-huit lignées évoluées obtenues à l'issue de la période d'évolution, avec les deux ancêtres dont elles dérivent, a constitué l'essentiel du matériel biologique fongique sur lequel sont basés les travaux présentés dans ce manuscrit.

1.7. Objectifs

L'objectif global de cette thèse est de caractériser les lignées de *Z. tritici* ayant évolué au laboratoire – c'est-à-dire de les comparer entre elles et par rapport à leur ancêtre – afin de mieux comprendre comment ce phytopathogène est capable de faire face, voire de s'adapter, à des fluctuations de température. Pour ce faire, trois principaux niveaux phénotypiques sont étudiés à l'issue de l'évolution: le transcriptome des différentes lignées, leur taux de croissance *in vitro* dans un environnement similaire à celui dans lequel s'est déroulée l'évolution ainsi que leur pouvoir pathogène sur le blé tendre. Une analyse génomique des changements survenus dans l'ADN des différentes lignées est intégrée à la partie phénotypage du pouvoir pathogène *in planta*. Les trois niveaux d'étude mentionnés ci-dessus constituent donc les trois principaux axes d'investigation et structurent ce manuscrit en trois chapitres. Dans la mesure du possible, nous essaierons de mettre en relation les résultats issus de ces différents niveaux phénotypiques, bien qu'établir des liens de causalité entre eux ne constitue pas la priorité, cette thèse ne comportant pas de volet de validation fonctionnelle.

Au niveau transcriptomique, nous nous sommes particulièrement intéressés à caractériser les changements survenus spécifiquement dans les lignées ayant évolué en conditions de fluctuation, afin de mieux comprendre comment le fait d'évoluer dans ces conditions remanie certains sous-ensembles de gènes. Nous avons également cherché à savoir si l'évolution de la

plasticité du niveau d'expression en réponse à un changement de température était différente selon le type régime sélectif imposé lors de l'évolution (températures stables ou fluctuantes). Enfin, nous avons également étudié l'aspect adaptatif ou non de cette plasticité du niveau d'expression, principalement celle présentée initialement par les ancêtres en réponse aux changements de température.

Dans des conditions *in vitro* similaires à celles de notre analyse transcriptomique (qui sont d'ailleurs celles dans lesquelles s'est déroulée l'évolution expérimentale), nous avons mesuré la fitness relative des différentes lignées à partir de leur taux de croissance. L'objectif, qui était ici triple, était de déterminer : *i*). si de l'adaptation s'était mise en place au cours de l'évolution, *ii*). si les différents régimes évolutifs avaient entraîné des degrés d'adaptation différents, et *iii*). si des phénotypes de types spécialistes ou généralistes s'étaient mis en place, et ceci notamment lors de l'évolution en conditions fluctuantes. Nous avons enfin cherché à déterminer à quel point la divergence de transcriptome (vis-à-vis de l'état ancestral) acquise au cours de l'évolution se reflétait dans l'éventuelle augmentation adaptative du taux de croissance des lignées.

Enfin, à partir d'un panel de cultivars de blé présentant un gradient de susceptibilité à la septoriose, nous avons quantifié le pouvoir pathogène des populations ancestrales et des populations évoluées qui en dérivent. L'objectif était ici d'estimer si l'adaptation *in vitro* qui avait pu se mettre en place s'accompagnait d'une diminution du pouvoir pathogène. La base génétique des changements de pathogénicité présentés par les différentes lignées a pu être étudiée en contrastant la localisation des mutations (SNPs et petits indels) survenues dans leurs génomes avec des régions par ailleurs connues ou candidates du déterminisme génétique de l'agressivité de *Z. tritici* vis-à-vis de son hôte.

2. CHAPITRE 1 : Evolution and plasticity of the transcriptome under temperature fluctuations in the fungal plant pathogen *Zymoseptoria tritici*

2.1. Introduction

Le niveau d'expression d'un gène est un caractère quantitatif qui varie entre et au sein des populations (Oleksiak et al. 2002 ; Whitehead & Crawford 2006a) et dont la variance peut être décomposée en une composante génétique et une composante environnementale plus leur interaction potentielle (Gibson & Weir 2005 ; Gibson 2008 ; Hodgins-Davis & Townsend 2009). Certaines études ont démontré qu'au sein des génomes un nombre significatif de transcrits présentent une héritabilité dans leurs niveaux d'expression similaire à celle observée pour des traits « visibles » (Brem et al. 2002 ; Leder et al. 2015). En combinant génomique et transcriptomique il est possible *via* des approches de cartographie de QTL d'expression (*eQTL mapping*, Brem & Kruglyak 2005 ; Gibson & Weir 2005 ; Majewski & Pastinen 2011) d'identifier les bases génétiques sous-jacentes responsables des variations observées entre individus quant à leurs niveaux d'expression. De telles études ont identifié des variants de nature régulatrice dans des régions intergéniques et dans des régions codant des protéines, variants supposés agir respectivement en *cis* et en *trans*. Bien que l'importance relative de ces deux types de régulation fasse l'objet d'un débat (Gibson & Weir 2005 ; Wray 2007 ; Ames & Lovell 2011 ; Dalal et al. 2016), l'existence d'une base génétique au niveau d'expression des gènes rend possible l'action de la sélection naturelle et artificielle sur ces traits moléculaires (pour la sélection artificielle, voir Koenig et al. 2013 et Lemmon et al. 2014). Ainsi des études ont pu documenter les effets bénéfiques que la variation du niveau d'expression a joué lors de processus d'adaptation ou de divergence (Chan et al. 2010 ; Dalal et al. 2016 ; Nourmohammad et al. 2017 ; Hofmann et al. 2018). D'autres études ont pu confirmer le rôle que joue de la régulation transcriptionnelle dans les processus adaptatifs, en identifiant par exemple les signatures moléculaires laissées par sélection directionnelle sur les niveaux d'expression chez différents types d'organismes (Whitehead & Crawford 2006a ; Whitehead & Crawford 2006b ; Crawford & Oleksiak 2007 ; Fay & Wittkopp 2008 ; Leder et al. 2015).

Concernant l'effet de l'environnement, il est bien connu que le niveau d'expression des gènes peut être modifié par des changements environnementaux. En revanche peu de choses

sont connues quant à l'aspect adaptatif ou mal-adaptatif d'une telle plasticité du niveau d'expression (mais voir **Ghalambor et al. 2015 ; Huang & Agrawal 2016 ; Mäkinen et al. 2016 ; Ho & Zhang 2018**). Enfin, effets génétiques et environnementaux peuvent interagir de façon non-additive sur le niveau d'expression (**Gibson & Weir 2005 ; Gibson 2008**), résultant en une interaction génotype-par-environnement. L'existence de cette interaction conduit à deux implications majeures : la plasticité du niveau d'expression peut évoluer au sein des populations et se focaliser sur uniquement quelques génotypes ne permet pas de capturer l'étendue des réponses plastiques que peuvent présenter les individus au sein d'une population dans leur niveau d'expression (**Hodgins-Davis & Townsend 2009**).

Alors même que les études d'évolution expérimentale sont nombreuses chez les organismes modèles, seul un nombre restreint d'entre elles ont étudié l'évolution du niveau d'expression. Ainsi, chez *S. cerevisiae*, il a été montré que des populations ayant évolué pendant 250 générations à partir d'un même clone avaient connu de nombreux changements de niveau d'expression (plusieurs centaines de gènes) et qu'une forte proportion de ces changements avait été répétable d'une population à l'autre et impliquait des gènes intervenant dans le catabolisme, notamment glucidique (**Ferea et al. 1999**). Toujours chez la levure, une expérience similaire menée sur 300 générations a montré que des populations évoluant en environnement alternant entre stress oxydatif et stress osmotique développaient spécifiquement (*i.e.* par rapport aux populations contrôles soumis à un unique type de stress) la capacité à exprimer certains de leurs gènes à un niveau donné en prédiction de leur futur environnement (**Dhar et al. 2013**). De manière plus générale, l'étude du transcriptome – qui constitue un niveau intermédiaire entre les phénotypes classiquement observés et les déterminants génétiques sous-jacents – représente en évolution expérimentale une approche complémentaire aux expériences cherchant à comprendre l'origine des modifications phénotypiques en étudiant directement les génomes des organismes ayant évolué en laboratoire. Les différences de niveaux d'expression renseignent en effet sur les fonctions qui ont évolué lors du processus adaptatif. Or des populations initialement clonales de micro-organismes soumises à des pressions évolutives identiques – telles des répliques d'évolution expérimentale – vont avoir tendance à voir certaines de leurs fonctions évoluer préférentiellement (du fait des conditions environnementales) et ce « parallélisme fonctionnel » ne sera pas nécessairement reflété dans les génomes par un parallélisme de mutations de séquences régulatrices. Ceci rend nécessaire d'étudier comment le transcriptome évolue en conditions contrôlées de laboratoire, et notamment en condition de sélection fluctuante.

Ce premier chapitre présente, sous forme d'article, les résultats de l'analyse transcriptomique réalisée à l'issue de l'évolution expérimentale sur *Z. tritici*. Brièvement, nous avons séquencé les différentes lignées – à la fois ancestrales et évoluées – par *RNA-sequencing* en population hétérogène (*bulk RNA-seq*) afin d'appréhender à quel point les différents régimes testés lors de l'évolution expérimentale affectent de manière différente l'évolution du transcriptome. De plus, les transcriptomes de chacune des lignées ont été obtenus à deux températures différentes, permettant l'étude de la plasticité du niveau d'expression en réponse aux changements de température, et tout particulièrement après évolution en environnement fluctuant. L'approche d'évolution expérimentale couplée à des données transcriptomiques présentée dans ce chapitre devrait permettre d'apporter des éléments de compréhension relatifs à l'évolution du transcriptome en conditions fluctuantes à la fois pour la communauté travaillant sur *Z. tritici*, mais aussi plus largement à destination du champ de recherche qu'est l'évolution expérimentale dans son ensemble.

2.2. Article : Evolution and plasticity of the transcriptome under temperature fluctuations in the fungal plant pathogen *Zymoseptoria tritici*

Evolution and plasticity of the transcriptome under temperature fluctuations in the fungal plant pathogen *Zymoseptoria tritici*

Arthur J. Jallet, Arnaud Le Rouzic, Anne Genissel

doi: <https://doi.org/10.1101/725010>

This article is a preprint and has not been peer-reviewed

Abstract

– **Background.** Species are subjected to variable environment in nature. While the ability to cope with changes has been studied through theoretical approaches, the small number of empirical studies limits our understanding of the evolutionary molecular mechanisms underlying adaptation to fluctuations – **Results.** Whole transcriptome sequencing of the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* revealed the evolution of gene expression after 48 weeks of experimental evolution under stable or fluctuating temperature. We found that although there is a strong genetic signature of gene expression, fluctuating regime could have a large and pervasive effect on the transcriptome evolution. Results show a few hot spots of significantly differentially expressed genes in the genome, in regions enriched with transposable elements (TE), including on dispensable chromosomes. Further, our results evidenced gene evolution towards robustness associated with the fluctuating regime, suggesting robustness is adaptive in changing environment. Last, an analysis on gene expression correlation revealed a significant set of genes that could act as trans-regulators. – **Conclusions.** This study is the first evolve and re-sequence experiment of a fungal pathogen, with the goal to describe the potential ability to evolve to changing environment and the molecular changes occurring in response to fluctuating selection. In addition to explore the evolutionary potential of the pathogen under temperature fluctuation this work highlights the important role of transcriptional rewiring that can adjust regulation of cell growth and multiplication.

Footnotes

- Authors' email address: arthur.jallet@inra.fr, arnaud.le-rouzic@egce.cnrs-gif.fr, anne.genissel@inra.fr
- **Data availability statement** The datasets supporting the conclusions of this article are available in the ncbi repository, [unique persistent identifiers XXX in <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>, .bam format].

Evolution and plasticity of the transcriptome under temperature fluctuations in the fungal plant pathogen *Zymoseptoria tritici*

Arthur J. Jallet^{1,2}, Arnaud Le Rouzic³ and Anne Genissel¹

¹ UMR BIOGER, INRA, AgroParisTech, Université Paris Saclay, Thiverval-Grignon, France

² Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Orsay, France

³ Laboratoire Évolution, Génomes, Comportement, Écologie, CNRS–IRD–Université Paris-Sud–Université Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette, France

Authors' email address: arthur.jallet@inra.fr, arnaud.le-rouzic@egce.cnrs-gif.fr, anne.genissel@inra.fr

Corresponding author: Anne Genissel, anne.genissel@inra.fr, (33) 130815359

Running Title: Fungal gene expression evolution under fluctuating selection

Supplementary Materials

Additional Files: Figures S1 to S11; Tables S1 to S7

Data availability statement

The datasets supporting the conclusions of this article are available in the ncbi repository, [unique persistent identifiers XXX in <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>, .bam format].

Abstract: - Background. Species are subjected to variable environment in nature. While the ability to cope with changes has been studied through theoretical approaches, the small number of empirical studies limits our understanding of the evolutionary molecular mechanisms underlying adaptation to fluctuations – **Results.** Whole transcriptome sequencing of the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* revealed the evolution of gene expression after 48 weeks of experimental evolution under stable or fluctuating temperature. We found that although there

is a strong genetic signature of gene expression, fluctuating regime could have a large and pervasive effect on the transcriptome evolution. Results show a few hot spots of significantly differentially expressed genes in the genome, in regions enriched with transposable elements (TE), including on dispensable chromosomes. Further, our results evidenced gene evolution towards robustness associated with the fluctuating regime, suggesting robustness is adaptive in changing environment. Last, an analysis on gene expression correlation revealed a significant set of genes that could act as trans-regulators. - **Conclusions.** This study is the first evolve and re-sequence experiment of a fungal pathogen, with the goal to describe the potential ability to evolve to changing environment and the molecular changes occurring in response to fluctuating selection. In addition to explore the evolutionary potential of the pathogen under temperature fluctuation this work highlights the important role of transcriptional rewiring that can adjust regulation of cell growth and multiplication.

Keywords: experimental evolution, adaptive evolution, fluctuation, RNA-seq, temperature, gene expression, plasticity

Background

One central theme in evolutionary genetics is to understand the role of regulatory variants in the molecular basis of adaptation. In particular in the context of rapid global climate change with growing evidence that species experience more abiotic fluctuations, it becomes more important to study the role of regulatory variants in adaptation to changing environments. Since early arguments in favor of regulatory variation explaining phenotypic differences between organisms (Britten and Davidson, 1971; King and Wilson, 1975), over the past two decades or so empirical studies have found abundant variation of gene expression within and between species (*e.g.* in non-human Primates (Enard et al., 2002); in teleost fish (Oleksiak et al., 2002; Whitehead and Crawford, 2006); in Humans (Rockman and Wray, 2002); in *Drosophila* (Whittkop et al., 2004); and *Saccharomyces* (Fay et al., 2004); and evidenced the widespread of heritable variation of gene expression within and between populations, much of which is thought to be adaptive (Brem and Kruglyak, 2002; Leder et al, 2015; Noormohammad et al., 2017; Glaser-Schmitt and Parsh, 2018).

Extensive body of work has shown that environmental change causes rapid gene expression response (*e.g.* *Caenorhabditis elegans* (Li et al., 2006; Feugeas et al., 2016). With regard to temperature, many studies have evidenced large and pervasive effect on the transcriptome of the temperature, paying much attention on cold and hot stresses (Chen et al., 2015; Jovic et al., 2017; Zhou et al., 2012), including temperature fluctuations (Podrasbky and Somero, 2004; Sørensen et al., 2016). Testing the gene expression variation in variable environments also raises the question of the role of the phenotypic plasticity in adaptive evolution. Plasticity is the ability of a genotype to produce different phenotypes in different environments (Pigliucci et al., 2006). Evidence of adaptive plasticity that contributes first to the establishment of adaptation remains a debate (see Ghalambor et al., 2007; Levis and Pfenning,

2016) though mechanisms of adaptation by mean of plasticity were nicely demonstrated in a few recent landmark papers (Corl et al., 2018; Ghalambor et al., 2015; Kenkel and Matz, 2016).

One powerful approach to understand how gene expression evolves in the face of environmental variation is experimental evolution, which consists of laboratory-controlled evolution that lasts over several generations (Garland and Rose, 2009). Premises to examine the molecular responses to environmental fluctuations has been fulfilled using experimental evolution in *Drosophila melanogaster* using diet fluctuations (Huang and Agrawal, 2016; Zanveld et al., 2017); in *Escherichia coli* long term evolution under changing temperature (Bennett, Lenski and Mittler 1992; Leroi, Lenski and Bennett 1994), variable pH (Hughes et al., 2007) and variable abiotic stresses in *Saccharomyces cerevisiae* (Dhar et al., 2013). In contrast, there are too few studies on filamentous fungi (Fisher and Lang, 2016).

In the present study, we investigate the transcriptome evolution of the wheat fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*, to assess the effect of temperature fluctuations on gene expression evolution and gene expression plasticity. Like other micro-organisms, *Z. tritici* displays clear advantages for experimental evolution, due to its short generation time, small genome and the ease of maintenance in the laboratory. *Z. tritici* is a filamentous Ascomycete fungus, and is the main causal agent of the Septoria Tritici Blotch (STB) disease on wheat (O'Driscoll et al., 2014; Fones and Gurr, 2015). *Z. tritici* is a haploid single-cell species that multiply asexually *in vitro* by budding (Steinberg, 2015). Nowadays this species becomes a good fungal model with growing interest to study its genome evolution since the publication of its complete reference genome (Goodwin et al., 2011). While much attention has been paid towards the ability of the pathogen to overcome the immune system of its host through QTL mapping approach (Meile et al., 2018; Stewart et al., 2018) or Genome Wide Association Studies (Zhong et al., 2017; Hartmann et al., 2017), we still have a poor understanding of the potential ability of *Z. tritici* to adapt to abiotic changes (Zhan and McDonald, 2011; Lendemann

et al., 2016), and we have very poor knowledge on the contribution of regulatory variants to adaptation for this fungal species.

Transcriptome studies in the fungal pathogen *Z. tritici* are fairly recent and aimed for the most part at characterizing the waves of up- and down-regulated genes in association with symptom development inside the host plant (Kellner et al., 2014; Rudd et al., 2015; Palma-Guerrero et al., 2017). The present study is the first analysis of transcriptome evolution in response to temperature fluctuations in this pathogenic fungus. We used an evolve-and-resequence approach to trace the changes of gene expression that occurred after a year of experimental evolution. We addressed the following questions: What genes respond to fluctuating temperature? Does fluctuation promote gene expression evolution? How does the fluctuation regime affect the level of gene expression plasticity?

Using two founder clones we performed a serial transfer experiment for 48 weeks, testing two stable regimes (temperature of 17°C or 23°C), and one fluctuating regime by alternating between these two temperatures every 2.5 days (**Figure 1**). We identified a pervasive effect of the selection regime on the gene expression level, with a strong difference of evolution between genetic backgrounds. Results show a few hot spots of significantly differentially expressed genes in the genome, in regions enriched with transposable elements (TE), including on dispensable chromosomes. Further, our results evidenced a gain of gene expression robustness associated with the fluctuating regime, suggesting robustness is adaptive in changing environment. Last, an analysis on gene expression correlation revealed a significant set of genes that could act as *trans*-regulators.

Results

Mapping quality and normalization

The mapping rate on the genome from the reference strain IPO-323 (Goodwin et al., 2011), was greater than 83.5 % for each sample. Average count of mapped reads was 35 millions after Relative Log Expression (RLE) normalization, and similar normalized read count distributions among samples was obtained (**Additional file 2: Figures S1 and S2**). Correlation coefficient between our sequencing replicates were on average 0.89 (Kendall τ) and agreement between those replicates was fair according to Cohen's kappa statistic with an average value of 0.2 (McIntyre et al. 2011). Only 10% of the genes changed in expression by more than 2 fold between replicates. We concluded that the repeatability between our experimental replicates was suitable for further analysis (**Additional file 2: Figure S3**). In addition, in comparison to growth at 17°C, growth at 23°C resulted in a greater variation of gene expression (variation coefficient = 0.021 *versus* VC = 0.049, at 17°C and 23°C, respectively).

Genome-wide analysis of the relative abundance of transcripts between acclimated laboratory strains

We checked the quality of our RNA-seq experiment by comparing our data with two previously published studies on the reference strain IPO-323 (Rudd et al., 2015; Kellner et al., 2014). For this purpose we only used the data from the two ancestor clones *MGGP01* and *MGGP44*. Our analysis shows that on average 61% of the genes are transcribed in all samples (with 6663 common gene transcripts on the core chromosomes (CCs) and 39 common gene transcripts on the accessory chromosomes (ACs)) (**Table 1**). FPKM comparisons between pairs of genotypes on CCs show congruent pattern of gene expression (data from 200kb-non overlapping windows, **Additional file 3: Figure S4**). Nevertheless 57% of the common transcripts are differentially expressed between the three genotypes (DESeq2 *Model 1*). Even with a correction for the gene number per chromosome, ACs possess a significantly lower proportion of expressed genes than

CCs (*Chi-2* test, $P < 2.2 \times 10^{-16}$). Chromosome 7 is singular, presenting significantly less gene transcripts than the other CCs, except for the smallest core chromosome 13 (*Chi-2* tests, $P < 0.05$). Indeed our results confirmed that a large region of 800kb on the chromosome 7 is without any transcriptional activity (**Additional file 3: Figure S5**). This feature was already mentioned for the strain IPO-323 by Rudd et al. 2015; Schotanus et al. 2015; and Haueisen et al. 2019. This chromosomal region is marked with histone H3K27me3 modifications that mediate transcriptional silencing, and these epigenetic marks are similar to the marks already identified on ACs. This chromosomal fragment is most likely originating from a fusion of a whole accessory chromosome onto the original chromosome 7 (Shotanus et al. 2015). In conclusion, we observed that *in vitro* transcriptome between strains is repeatable for the nature of gene transcripts, but highly variable for the level of expression of gene transcripts.

Contrasted transcriptomes among evolved lineages

To evaluate whether there was any differences of gene expression between the three selection regimes, we first analyzed the variation of gene expression among all evolved lineages. The ancestral background and the temperature of assay were the two main factors contributing to the total variance (Principal Component Analysis). We also observed a smaller but significant contribution of the selection regimes (**Table 2**). We then used *DESeq2* Model (2) and found that a large number of genes were significantly differentially expressed (SDE) between the two ancestral backgrounds (7022 genes with an average median fold change of 1.65). We detected 5637 significant genes due to the temperature of assay with an average absolute fold-change of 1.43, and 4146 genes with a significant effect of the selection regime (**Figure 2**). In addition, we detected 1728 SDE genes for the interaction term between ancestral background and selection regime. More specifically, many of those genes showed opposite direction of differential expression between the two ancestral backgrounds (**Additional file 4, Figure S6**). These results indicate that the expression level of a large number of genes evolved differently

depending on the genomic context the genes are found. As a consequence, to gain full insight in gene expression changes in response to the selection regime, we considered the two ancestral backgrounds separately for further analysis.

Evolution of gene expression under the selection regimes

To investigate the effect of the selection regimes on gene expression evolution for each ancestral background, we included the data from the ancestor using our DESeq2 Model (3). To detect evolution of gene expression level in response to fluctuating regime, we seek for genes differentially expressed from the expression level of the ancestor. This analysis is based on two biological independent measurements of gene expression level. On average replicates showed an average Spearman correlation of 0.87, while Cohen's kappa on FPKM showed a fair agreement of 0.2.

Overall our results indicate that up to 32% of the genes were significantly differentially expressed due to the selection regimes. The temperature of assay also affected the level of expression, for up to 39% of the genes (**Table 3**). The proportion of genes affected by fluctuation was approximately the same in both ancestral backgrounds (**Table 3** and **Additional File 5: Figure S7**). The distribution of the fold-change of gene expression for all significant genes is given in the **Additional File 5, Figure S8**. Overall, our results seem to suggest that, for each ancestral background, repeated evolution under fluctuation occurred for a significant number of genes (568 and 366 genes, for MGGP01 and MGGP44, respectively) (**Figure 3**). We focused our attention on this set of genes, hypothesizing those significant changes of gene expression with repeated pattern among experiments could result from adaptive evolution. Unexpectedly, we found an asymmetric response of up- and down-regulated genes between the two ancestral backgrounds, with a majority of down-regulated genes for the background *MGGP01*, while an opposite pattern was found for the background *MGGP44* (**Figure 4**). A large number of those genes were also significant for the stable regimes, to a greater extent for

the background MGGP44 (90% and 61% versus 21% and 41%, for the regimes Stable 17°C and Stable 23°C, respectively) (**Figure 4, Additional file 5: Figure S9**). While only one single transcript was differentially expressed and specific to the fluctuation regime for the ancestral background MGGP44 (gene ID 58295), 284 genes specifically evolved under fluctuation for the background MGGP01. The contrast between the two genetic backgrounds is strong, illustrating the high genetic diversity level of this fungal species, contributing to the complex genetic basis of gene expression. Genes differentially expressed in the four fluctuating lineages are given in **Additional File 6, Table S2**.

GO term enrichment tests identified different functional terms between the two ancestral backgrounds. First, when considering all genes significant for fluctuation for the background MGGP01 we did not find any evidence for GO term enrichment, while a test including the 284 genes that evolved specifically under thermal fluctuations, detected functional categories related to *Cell cycle control, cell division and chromosome partitioning* ($P = 0.0019$) and *Cytoskeleton* ($P = 0.027$), including proteins known to be essential components of the cytoskeletal mitotic apparatus and essential regulators of cell cycle progression. Notably, the gene length between up- and down-regulated DEGs due to fluctuation was biased toward a smaller size for down-regulated genes (Welch t-tests, $P = 3.8 \times 10^{-9}$ and $P = 0.003$, for MGGP01 and MGGP44, respectively). Second, when considering all genes significant for fluctuation for the background MGGP44, significant enrichment for the GO term *defense mechanisms* was found (9 genes, $P < 0.001$).

To fully characterize the transcriptome changes, we examined the distribution of significant genes across the whole genome. First, we reported the number of significant genes among CCs and ACs (**Figure 5A**). For the background MGGP01 only, the proportion of DEGs normalized by the total number of genes per chromosome was higher on ACs than on CCs (**Additional File 7, Table S3**). Second, we surveyed the density of DEGs along each chromosome using a sliding

window approach (**Figure 5B and 5C**). The distribution of significant genes under stable and fluctuating regimes was not totally uniform but instead we found 8 regions where the density of significant genes was higher than the nominal threshold of 0.13. Unexpectedly, these hot spots with a higher density – normalized by the number of known annotated genes – of significant genes were often located at the tips of chromosomes: 1, 2 and 6 and 7 for the core chromosomes and 15, 17, 18 and 19 for the accessory chromosomes. To control for a bias due to genomic features, we did the same approach for all significant genes for the temperature effect, and detected no hot spots (data not shown). The presence of significant genes on the accessory chromosomes suggests these chromosomes could be involved in adaptation to abiotic environment. Notice we detected overall 40 genes which expression level was turned off after experimental evolution. None of these genes were located in the hot spot regions, thus excluding the hypothesis that the hot spot regions could simply correspond to deletion events. In addition, 80% of the genes located in the hot spots were up regulated compared to the ancestral gene expression level. We found that the hot spots of DEGs co-locate with regions of high density of TE (TE annotation from Rudd et al. 2015). This might suggest that there is a rapid turn-over of gene regulation in these regions, where TE transposition during mitosis could have an impact on the expression level of the genes.

Extensive transcriptome rewiring

In the search of sets of genes that would be regulated in concert, we performed a WGCNA analysis. A total of 16 and 15 co-expression modules were detected, respectively for MGGP01 and MGGP44 lineages (**Additional File 8, Tables S4 and S5**). We retained some of the largest co-expression modules that included our most significant genes from our model (3) (**Additional File 8, Figure S10**). Consistent with DESeq2 model (3) results, this complementary clustering approach largely confirm the most significant enriched categories already identified. We identified the hub gene for each co-expression module. Interestingly, among the 8 selected

modules, we also found 24 transcription factors and 39 genes involved in signal transduction with high connectivity (**Additional File 9, Table S6**). However, based on 10,000 permutations tests to compare the ranking positions of these genes with the ranking positions of 63 randomly chosen genes among the modules, the ranking position of these genes was not significantly biased towards the most connected genes (**Figure 6**). We next investigated the relationship between the physical distance between genes within modules and their level of connectivity. No large *cis*- or *trans*-regulated clusters of genes were detected in our study, but rather scattered co-regulated transcripts all across chromosomes were found on CCs as well as on ACs (**Additional File 10, Figure S11**). Nonetheless our network analysis revealed hub genes and also transcription factors and signal transduction related genes with high connectivity within modules. Whether those genes are genuine *trans*-regulatory factors remains to be demonstrated.

Evolution of gene expression plasticity

The effect of the temperature of assay in our laboratory growth conditions —gene expression was assessed at both 17°C and 23°C— was large and pervasive across the genome. We next aimed at determining whether stable or fluctuating temperatures during the EE affected differently the gene expression plasticity. We observed 3.8% and 7.8% of genes significant for Temperature-by-Regime, for MGGP01 and MGGP44, respectively. We also verified that the differential expression between the two temperatures of assay was not due to a change of clone frequency in our evolved lineages. We could directly estimate the presence of new mutations in coding regions and see whether mutations were different between transcripts at the two temperatures of assay. There was no evidence for clonal interference from variants in the coding regions (data not shown). As a consequence a change of transcript level between the two temperatures of assay was assumed to be a plastic change. Using our contrast approach, we could classify genes for gain or loss of plasticity compared to the plasticity of gene expression of the ancestors. We detected a smaller number of genes that became plastic after the

experimental evolution for the fluctuating regime (Chi-square tests with Holm's correction for multiple comparisons, all $P < 2 \cdot 10^{-7}$) (**Figure 7 A and B; Additional File 11, Table S7**). These findings suggest that in our laboratory conditions, evolving under thermal fluctuations promotes robustness. Notably, the relative proportion of plastic genes between the two ancestors is also significantly different (Chi-squared = 33.2, $P = 8 \cdot 10^{-9}$) (**Figure 7C**). The distribution of the fold-change of gene expression between the two temperatures is biased for both ancestors, but in an opposite manner (with a greater number of up-regulated genes at 17°C as opposed to 23°C, for MGGP01 and MGGP44, respectively).

Discussion

Intraspecific variation of gene expression

We found pervasive gene expression variation between *Z. tritici* strains, most likely due to the contribution of small-scale mutations (SNPs and small indels). Although comparisons are often made using a limited number of strains, we start to accumulate evidence that there is considerable variation of gene expression within and between populations in *Z. tritici* (Palma-Guerrero et al., 2017; Haueisen et al. 2019). Although high, this amount of variation in *Z. tritici* remains comparable to former results coming from many other studies highlighting the natural variation of transcription within species, mostly using eQTL mapping (*e.g.* Brem, 2002; Schadt et al., 2003; Huang et al., 2015; Zan et al., 2016; Osada et al., 2017).

Genetic and abiotic factors both contribute to the evolution of gene expression

In this study we quantified the number of genes which expression level is changed due to the EE. Consistent with previous studies, we found a comparable effect of genotype and environment on gene expression level (Hodgins-Davis et al., 2012; Gibson, 2008). Our study based on a 'moderate' switch of temperature detects slightly more DEGs due to temperature than due to genetic differences between the founder clones. We also identified a comprehensive

set of genes responding to *in vitro* growth and temperature, describing genes and gene functions that can play a primary role in response to abiotic changes in this fungal pathogen. Furthermore, the average cell growth at the two temperatures is not significantly different between ancestors (unpublished data). This observation suggests that generation time, thereby mutation accumulation rate, are likely similar between the two temperatures.

The effect of fluctuation on transcriptome evolution

Our results suggest that evolution is somewhat repeatable between lineages but show contrasting results between genetic backgrounds. Our results clearly show a pervasive effect of selection regimes on gene expression, with as much as 38% of the *Z. tritici* genome displaying a selection regime effect among evolved lineages. Moreover in our experimental conditions each evolved lineage had on average 530 genes which expression level evolved by at least a factor 2. This result shows a high adaptive potential of the fungal species, which can evolve fast by means of gene expression variation operating on many functional categories. Interestingly, different functional categories were over-represented between the two ancestral backgrounds, suggesting different evolutionary routes can be explored to deal with changes in abiotic environment. The quasi-absence of significant genes in response to fluctuating regime alone for the background MGGP44 is rather surprising. This might suggest that the large number of plastic genes for the ancestor MGGP44 may be advantageous to cope with temperature fluctuations.

Genome-wide distribution of differentially expressed genes

The genome-wide distribution of all significant DEGs suggests that a few genomic regions are more prone to transcriptional evolution. Compartmentalization of filamentous fungal genomes is a well-known feature, characterized by the presence of regions of distinct evolutionary rate in the genome (Dong et al., 2015, Frantzeskakis et al., 2019). In our experiment, results suggest that regions near subtelomeres on a few core chromosomes and some dispensable chromosomes

are more prone to rapid evolution. This result has important implications for the understanding of the capacity of evolution of filamentous fungi. Also this work is the first evidence of rapid adaptation in filamentous fungi, linked to evolution of gene expression on dispensable chromosomes, which are often qualified as a cradle for adaptive evolution, due to their high mutation rates, including structural rearrangements (Croll and McDonald, 2012). The molecular causes of these gene expression changes remained to be understood. As a first attempt towards this goal, we could observe that these regions with higher density of significant genes are also regions enriched in transposable elements. The role of transposable elements in regulating gene expression evolution has been well documented (Sudaran et al., 2014; Rech et al., 2019; Uzunovic et al., 2019; see Schrader and Schmitz, 2019 for recent review). Our results altogether suggest that new mutations –due to TE themselves or SNPS/indels– in the *cis*-regulatory regions of the genes could be responsible for the evolution of gene expression level. In addition, we cannot exclude the hypothesis that some of the cells lost dispensable chromosomes in the evolved lineages, thus leading to a down-regulated effect. This partial loss of accessory chromosomes, if true, would have minor effect since only 20% of the genes under the hot spots are down regulated. Such loss of dispensable chromosome has been observed for 4-week *in vitro* grown cells in yeast-malt-sucrose medium in *Z. tritici* (Moller et al., 2018). The pervasive occurrence of structural rearrangements (indels, translocation, duplications) in filamentous fungi complicates our understanding of the genetic basis of gene expression. To gain full insight into this question, more sequencing of a greater number of evolved lineage and clones within lineages should be conducted.

Fighting changes by staying stable

We first observed significant differences of plasticity between the ancestors, highlighting genetic variation for transcription plasticity. Genotype-by-environment interaction for gene expression is common in many organisms: *C. elegans* (Li et al., 2006), yeast (Smith and

Kruglyak, 2008; Landry et al, 2006; Li and Fay, 2017), *Arabidopsis* genus (He et al., 2016). Here we observed a reduced gain of gene expression plasticity for a significant number of genes for all lineages exposed to fluctuating regime. This result suggests that in our experimental conditions robustness of gene expression is favored under environmental fluctuations. The evolutionary consequences of robustness are important. Robustness can be adaptive and lead to the accumulation of cryptic genetic mutations that can increase the evolvability of the species facing new environments (Le Rouzic and Carlborg, 2008 ; Cuypers et a l., 2017 ; Payne and Wagner, 2019). Several theoretical approaches have explained a gain of robustness, which is dependent on the rate of fluctuation and the strength of selection (Siegal and Bergman, 2002; LeRouzic et al., 2013). Full understanding of the molecular basis of robustness remains largely unexplored, with a clear lack of empirical support. Main hypothesis proposed that the evolution of robustness under temperature fluctuation is explained by gene networks evolution towards more complexity (Siegal and Bergman, 2002 ; reviewed in Masel and Siegal, 2009). Robustness could rely on functional redundancy arising from gene duplications, or different network topology. Functional annotation of the genome of *Z. tritici* is not advanced enough yet to gain full insights into these questions. Recently, empirical study in *Arabidopsis thaliana* does not support this hypothesis and demonstrated that a single gene, rather than gene network connectivity or functional redundancy, was leading to trait robustness (Lachowiec et al., 2018). In contrast, another study evidenced robustness by means of functional redundancy in yeast (Li et al., 2010).

Towards understanding of the genetic basis of gene expression regulation in *Z. tritici*

This work is the first examination the whole transcriptome evolution in response to environmental changes in the filamentous fungus *Z. tritici*. We found widespread variation of up- and down-regulated gene expression in response to temperature, but the genetic basis underlying this variation remains to be explained. Our knowledge on gene expression regulation

in this species is little. We cannot exclude in our study that heritable epigenetic variation (histone modification, DNA methylation) are also causing changes in gene regulation. Towards the understanding of the genetic basis of gene regulation in *Z. tritici*, we inferred gene modules based on their co-expression level across lineages. This co-expression network analysis identified 8 hub genes and a significant number of highly connected genes, which are transcription factors, or signal transduction genes. The functional role of those genes remains to be elucidated. Are they genuine capacitors in the gain of robustness?

Conclusion

Transcriptome evolution analysis at two different temperatures identified a comprehensive set of genes with abiotic variation response and revealed contrasted evolution between the two founder genotypes. These findings illustrate the high potential ability of the fungal species *Z. tritici* to respond to abiotic changes.

Methods

Biological material

The two laboratory clones of *Z. tritici* *MGGP01* and *MGGP44* were collected on wheat in 2010 from the same population sample in the south of France at the location of Auzeville-Tolosane (43° 53' N - 1° 48' W). Single colony was isolated and grown in the laboratory using Potato Dextrose Broth (PDB) medium at 17°C, 140 rpm and 70% humidity, for a few weeks prior to the experimental evolution. Strains were then multiplied for storage in PDB medium containing 30% glycerol at -80°C.

Experimental evolution design

Two clonal strains *MGGP01* and *MGGP44* were used to conduct experimental evolution to test two different genetic backgrounds. Three different selection regimes were tested in triplicates, for a total of 9 experiments starting from each clonal strain. We tested two stable temperatures

(17°C and 23°C) and a third condition with fluctuating temperature between 17°C and 23°C every 52-64 hours. Large asexual populations were multiplied in 500 mL of PDB at 140 rpm in a shaking incubator (Infors HT, Inc.). Every week $>10^7$ - 10^9 cells were transferred into fresh medium by pipetting 20 ml of cell suspension (**Figure 1A**). Large amounts of cell suspension were collected after 48 weeks, to provide liquid stocks at -80°C that were used to produce the RNA samples.

RNA isolation and sequencing

RNA samples were isolated from the two ancestor clones and 8 evolved lineages (**Figure 1B**). As much samples as possible were sequenced under our budget constraints: 2 fluctuating, 1 stable at 17°C and 1 stable at 23°C for each genetic background corresponding to the lab clones *MGGP01* and *MGGP44*. The 10 samples were grown in the same incubator for one week either at 17°C or at 23°C prior to collect the cell suspensions that were snap-frozen in liquid nitrogen. Each group comprising the 10 samples was grown in duplicate at the two temperatures of assay in separate experiments, in order to create two independent biological replicates Full list of 40 RNA-seq samples is described in **Additional File 1, Table S1**. Prior to RNA extraction of the 40 samples, 50 mL of frozen cell suspension were lyophilized for 3 days (LYOVAC™ GT 2-E freeze dryer, Steris) and ground in liquid nitrogen to a fine powder with a mortar and pestle. Lyophilized tissue was homogenized in 1 mL of Trizol reagent (Invitrogen Inc.), and 200 μ L of chloroform, vortexed, incubated at room temperature for 3 min and centrifuged at 12,000 g for 15 min at 4°C. Precipitation of RNA was done by transferring the aqueous phase to a new tube and adding 100% isopropanol. Samples were vigorously shaken and incubated at room temperature for 10 min. RNA pellet was obtained after centrifugation at 12,000 g for 10 min and washed with 1 mL of 70% ethanol. After centrifugation at 7,500 g for 5min, RNA was washed in 70% ethanol, air dried and re-suspended in RNase-free water and stored at -80°C. Sampling quality was checked using agarose gels, Qbit quantification (RNA HS assay kit,

Molecular Probes Inc., UK) and Fragment Analyzer (Agilent, CA, USA). Libraries were created using TruSeq Stranded mRNA Sample Prep kit from Illumina by selecting fragments between 250-400bp captured with poly-dT oligonucleotides (Integrage Inc, Evry, France). Paired-end (2 x 75bp) sequencing was done with HiSeq4000 Illumina (Integrage Inc, Evry, France).

Transcriptome mapping and quantification

We examined raw reads using FastQC (version 0.11.5, (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), removed adaptors and performed quality-based trimming using Trimmomatic (version 0.32; Bolger et al., 2014) with the following options: PE -phred33 SLIDINGWINDOW:4:20 MINLEN:30 TOPHRED33. For each sample, mate of trimmed reads were mapped to the reference genome IPO-323 (<http://genome.jgi.doe.gov/Mycgr3/Mycgr3.home.html>) using HISAT2 (version 2.0.4; Pertea et al. 2016). The default parameters were used except for the intron length, the number of multi mapping sites allowed per read and the stringency of mapping score, as follow: -min-intronlen 20 -max-intronlen 15000 -k 3 --score-min L, 0, -0.4. We quantified the number of mapped reads for each predicted gene in the annotation published by (Grandaubert et al., 2015), using Stringtie with the following options: -p 16 -c 7 -m 200 -e -B -G (version 2.3; Pertea et al. 2016). Reads that mapped to the predicted 18S and 28S rRNA genes were all removed from the analysis. The final number of genes utilized for all analyses was 10950.

Data normalization and differential expression analysis

We performed read count normalization using a size factor calculated for each sample according to the RLE (Relative Log Expression) method implemented in the R package DESeq2 (Love et al., 2014). We used Likelihood Ratio Tests (LRT) followed by Wald tests to compare expression level for each gene. For the comparison of expression levels between genes among genotypes we used FPKM normalization, in order to take in account the gene length.

Coding variant calling from RNA-sequencing

SNP calling for each RNA-sequencing sample was performed using GATK GenomeAnalysisTK.jar with the following parameters: `-T SplitNCigarReads -rf ReassignOneMappingQuality -RMQT 60 -U ALLOW_N_CIGAR_READS` and `GenomeAnalysisTK.jar -T HaplotypeCaller -dontUseSoftClippedBases -stand_call_conf 20`. Custom R scripts were used to identify SNP differences among all samples.

Natural variation of gene expression level among fungal isolates

Overall gene expression levels were compared between our two ancestor clones and the reference strain IPO-323 (Dutch field strain isolated in 1984), using *in vitro* cultures RNA-seq data from the literature (Kellner et al. 2014; Rudd et al. 2015); (fastq files *SRR1167717*, *SRR1167718* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra?term=SAMN02640204>; and fastq files *ERR789217*, *ERR789218* kindly provided by J. Rudd). Raw fastq files from both studies were analyzed the same way as for our samples.

The following model was fit for each gene to compare the genotypes:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + \varepsilon_{ij}, \quad (\text{Model 1})$$

Y_{ij} is the expression level of the i th genotype ($i = \text{IPO-323, MGGP01, MGGP44}$) and the j th replicate ($j = 1, 2, 3, 4$), μ is the intercept, and ε_{ij} is the random error. Significant transcripts were detected by comparing the full model to its null model without the genetic effect, using LRT tests. Correction for multiple testing was performed using a FDR at 5% (Benjamini and Hochberg, 1995).

Differential gene expression analysis among evolved lineages

To compare the gene expression levels between the evolved lineages the following model was fit for each gene:

$$Y_{lskj} = \mu + G_l + R_s + T_k + G_l R_s + \varepsilon_{lskj} \quad (\text{DESeq2 Model 2})$$

Y_{lskj} is the observed expression level of the l th genetic background ($l = \text{MGGP44, MGGP01}$), the s th selection regime ($s = \text{fluctuating, stable 17, stable 23}$), the k th temperature of assay ($k = 17^\circ\text{C, } 23^\circ\text{C}$) and the j th replicate ($j = 1,2$), μ is the intercept and ε is the random error. The significance of each term was tested using a LRT by comparing the full model with a reduced model without the considered term. Correction for multiple testing was done using FDR at 5%. To observe the relative contribution of ancestral background, temperature and selection regimes effects, we also transformed the read counts with the DESeq2 *rlog* function to perform a PCA with the DESeq2 *plotPCA* function. We computed the PC scores of each sample along the first four principal components. Those PC scores were then analyzed with the following ANOVA model:

$$PC_{lskj} = \mu + G_l + R_s + T_k + \varepsilon_{lskj}$$

PC_{lskj} is the PC score of the l th genetic background ($l = \text{MGGP44, MGGP01}$), for the s th selection regime ($s = \text{fluctuating, stable 17, stable 23}$), at the k th temperature of assay ($k = 17^\circ\text{C, } 23^\circ\text{C}$) and the j th replicate ($j = 1, 2$), μ is the intercept and ε is the random error.

Evolution of gene expression and its relationship with the temperature

For each ancestral background separately we assessed the transcriptome evolution and the level of plasticity of gene expression at the two temperatures of assay. We also tested the interaction between lineages and temperature, which could not be done with the Model (2), due to model over fitting. The following model was fit for each gene and for each ancestral background separately with the R package DESeq2:

$$Y_{ijk} = \mu + L_i + T_j + L_i T_j + \varepsilon_{ij} \text{ (Model 3)}$$

Y_{ijk} is the expression level of the i th lineage ($i = \text{ancestor MGGP01, 12F, 13F, 1217, 1323, or ancestor MGGP44, 441F, 443F, 44117, 44323}$), at the k th temperature ($k = 17^\circ\text{C, } 23^\circ\text{C}$), and for the j th replicate ($j = 1, 2$), μ is the intercept, and ε_{ikj} is the random error. LRT tests were used

to compare the full model to reduced models. Wald tests were applied in order to classify significant results using the following rationale:

Among the genes with a significant lineage effect, genes with significant contrast against their ancestor expression level, for both replicated evolution, were considered to have evolved. In addition genes with significant contrast from their ancestral expression level and the expression level for the stable regimes were considered to have specifically evolved under fluctuations.

To identify plastic genes, we considered genes with significant temperature effect, with a fold change greater than 2. To analyze the evolution of plasticity, genes significant for the interaction term temperature-by-lineage were considered using contrasts.

Gene ontology enrichment tests

Gene ontology enrichment was done using the R package GoSeq (Young et al., 2010). Notice the unknown functional category comprises 5690 genes.

Gene co-expression network analysis

We search for correlation patterns of expression among genes across our samples. Only genes that displayed at least one significant contrast from our *Model (3)* were included in this analysis (3174 and 3440 genes, for the ancestral background *MGGP01* and *MGGP44*, respectively). Scale-free co-expression networks were built using a Weighted Gene Correlation Network Analysis with the R package WGCNA (weighted correlation network analysis) (Langfelder and Horvath, 2008). Using the log₂ transformed read counts, the genes were clustered into modules according to their expression profile in response to the selection regimes and the temperature of assay. Modules were summarized by the first principal component of the gene expression data of the module, and the hub (most highly connected node of the module). Genes within modules were ranked using their correlation to the eigengene of the module.

Statistical analyses

All statistical tests were performed with R (version 3.3.1, <https://www.r-project.org>). *Chi-square* tests were used to compare the distribution of the number of significant genes among chromosomes. Welch's two samples *T*-tests were used to compare the length between up and down-regulated genes which expression level evolved after fluctuation. Chi-square tests with Holm's or FDR correction (Benjamini and Hochberg, 2001) correction for multiple testing corrections were applied to detect changes of gene expression plasticity. Permutation tests (10,000 bootstraps), were done to test the significance of the ranking position in term of connectivity for the genes with functional annotation associated to transcription regulation or signal transduction.

List of abbreviations

AC: Accessory chromosome

CC: Core chromosome

DEG: Differentially expressed gene

FDR: False Discovery Rate

LRT: Likelihood Ratio Test

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

TE: Transposable element

WGCNA: Weighted Correlation Network Analysis

Declarations.

Competing interests. Authors declare no competing interests.

Funding. This work was supported by the French National Research Agency, LabEx BASC (ANR-11-LABX-0034). AJJ was supported by an Academia fellowship.

Authors' contributions. ALR and AG conceived the experiments, AG did the experimental evolution, AJ conducted all the bioinformatics analysis, AJ, ALR, and AG did statistical analyses, interpretation of the data and writing.

Acknowledgements. We are grateful to Henriette Goyeau for sampling the two fungal isolates and to the genotoul bioinformatics Toulouse Midi-Pyrenees (Bioinfo Genotoul) for providing help and computing resources.

References

- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc B*. 2005;57, 289–300. 10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x
- Bennett AF, Lenski RE, Mittler JE. Evolutionary adaptation to temperature. I. Fitness Responses of *Escherichia coli* to Changes in its Thermal Environment. *Evolution* 1992;46:16-30. 10.1111/j.1558-5646
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* 2014;30:2114-20. 10.1093/bioinformatics/btu170
- Brem RB. Genetic dissection of transcriptional regulation in budding yeast. *Science* 2002;296: 752-5. 10.1126/science.1069516
- Britten RJ, Davidson EH. Repetitive and non-repetitive DNA sequences and a speculation on the origins of evolutionary novelty. *Q Rev Biol*. 1971;46: 111-38
- Chen J, Nolte V, Schlötterer C. Temperature stress mediates decanalization and dominance of gene expression in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genetics* 2016;12: e1006079. doi :10.1371/journal.pgen.100607
- Corl A, Bi K, Luke C, Challa AS, Stern AJ, Sinervo B, Nielsen R. The genetic basis of adaptation following plastic changes in coloration in a novel environment. *Curr Biol*. 2018;28:2970-77. 10.1016/j.cub.2018.06.075
- Croll D, McDonald BA. The accessory genome as a cradle for adaptive evolution in pathogens. *PLoS Patho*. 2012;8:e1002608. 10.1371/journal.ppat.1002608
- Cuypers TD, Rutten JP, Hogeweg P. Evolution of evolvability and phenotypic plasticity in virtual cells. *BMC Evol Biol*. 2017;17:60. 10.1186/s12862-017-0918-y
- Dhar R, Sägesser R, Weikert C, Wagner A. Yeast adapts to a changing stressful environment by evolving cross-protection and anticipatory gene regulation. *Mol Biol Evol*. 2013;30:573–88. 10.1093/molbev/mss253

Dong SM, Raffaele S, Kamoun S. The two-speed genomes of filamentous pathogens: waltz with plants. *Curr Opin Genet Dev.* 2015;35:57–65. 10.1016/j.gde.2015.09.001

Driscoll AO, Kildea S, Doohan F, Spink J, Mullins E. The wheat – Septoria conflict: a new front opening up? *Trends Plant Sci.* 2014;19:602–10. /10.1016/j.tplants.2014.04.011

Enard W, Khaitovich P, Klose J, Zollner S, Heissig F, et al. Intra- and interspecific variation in primate gene expression patterns. *Science*, 2002;296: 340–3. 10.1126/science.1068996

Fay JC, McCullough HL, Sniegowski PD, Eisen MB. Population genetic variation in gene expression is associated with phenotypic variation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol.* 2004;5: R26. 10.1186/gb-2004-5-4-r26

Feugeas JP, Tourret J, Launay A, Bouvet O, Hoede C, Denamur E, Tenaillon O. Links between transcription, environmental adaptation and gene variability in *Escherichia coli*: correlations between gene expression and gene variability reflect growth efficiencies. *Mol Biol Evol.* 2016;33:2515–2529. 10.1093/molbev/msw105

Fisher KJ, Lang GI. Experimental evolution in fungi: An untapped resource. *Fungal Genet Biol.* 2016;94:88–94. 10.1016/j.fgb.2016.06.007

Fones H, Gurr S. The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: an EU perspective. *Fungal Genet and Biol.* 2015;79:3-7. 10.1016/j.fgb.2015.04.004

Frantzeskakis L, Kusch S, Panstruga R. The need for speed: compartmentalized genome evolution in filamentous phytopathogens. *Mol Plant Pathol.* 2019;20:3–7. 10.1111/mpp.12738

Ghalambor CK, Hoke KL, Ruell EW, Fischer EK, Reznick DN, Hughes KA. Non-adaptive plasticity potentiates rapid adaptive evolution of gene expression in nature. *Nature*, 2015;525:372–375. 10.1038/nature15256

Ghalambor CK, McKay JK, Carroll SP, Reznick DN. Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Funct Ecol.* 2007;21:394–407. [10.1111/j.1365-2435.2007.01283.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2007.01283.x)

Gibson G. The environmental contribution to gene expression profiles. *Nat Rev Genet.* 2008;9:575-81. [10.1038/nrg2383](https://doi.org/10.1038/nrg2383)

Glaser-Schmitt A, Parsch J. Functional characterization of adaptive variation within a cis-regulatory element influencing *Drosophila melanogaster* growth. *PLoS Biol.* 2018;16:1–28. [10.1371/journal.pbio.2004538](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004538)

Goodwin SB, M'Barek S, Dhillon B, Wittenberg AHJ, Crane CF, Hane JK, Foster AJ, van der Lee TAJ, Grimwood J, Aerts A, et al. Finished genome of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* reveals dispensome structure, chromosome plasticity, and stealth pathogenesis. *PLoS Genet.* 2011;7: e1002070. [10.1371/journal.pgen.1002070](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002070)

Grandaubert J, Bhattacharyya A, Stukenbrock EH. RNA-seq-based gene annotation and comparative genomics of four fungal grass pathogens in the genus *Zymoseptoria* identify novel orphan genes and species-specific invasions of transposable elements. *G3,* 2015;5:1323-33. [10.1534/g3.115.017731](https://doi.org/10.1534/g3.115.017731)

Hartmann FE, Sánchez-Vallet A, McDonald BA, Croll D. A fungal wheat pathogen evolved host specialization by extensive chromosomal rearrangements. *ISME J.* 2017;11:1189–204. [10.1038/ismej.2016.196](https://doi.org/10.1038/ismej.2016.196)

Haueisen J, Möller M, Eschenbrenner CJ, Grandaubert J, Seybold H, Adamiak H, Stukenbrock EH. Highly flexible infection programs in a specialized wheat pathogen. *Ecol Evol.* 2019;9:275–94. [10.1002/ece3.4724](https://doi.org/10.1002/ece3.4724)

He F, Arce AL, Schmitz G, Koornneef M, Novikova P, Beyer A, De Meaux J. The footprint of polygenic adaptation on stress-responsive cis-regulatory divergence in the *Arabidopsis* Genus. *Mol Biol Evol.* 2016;33:2088–101. doi.org/10.1093/molbev/msw096

Hodgins-Davis A, Adomas AB, Warringer J, Townsend JP. Abundant gene-by-environment interactions in gene expression reaction norms to copper within *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol Evol.* 2012;4:1061–79. 10.1093/gbe/evs084

Huang W, Carbone MA, Magwire MM, Peiffer JA, Lyman RF, Stone EA, Anholt RRH, Mackay TFC. Genetic basis of transcriptome diversity in *Drosophila melanogaster*. *PNAS*, 2015;112:E6010–19. 10.1073/pnas.1519159112

Huang Y, Agrawal AF. Experimental evolution of gene expression and plasticity in alternative selective regimes. *PLoS Genet.* 2016;12:e1006336. 10.1371/journal.pgen.1006336

Hughes BS, Cullum AJ, Bennett AF. An Experimental evolutionary study on adaptation to temporally fluctuating pH in *Escherichia coli*. *Physiol Biochem Zool.* 2007;80:406–21. 10.1086/518353

Jovic K, Sterken MG, Grilli J, Bevers RPJ, Rodriguez M, Riksen JAG, et al. Temporal dynamics of gene expression in heat-stressed *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* 2017;12:e0189445. 10.1371/journal.pone.0189445

Kellner R, Bhattacharyya A, Poppe S, Hsu TY, Brem RB, Stukenbrock EH. Expression profiling of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* reveals genomic patterns of transcription and host-specific regulatory programs. *Genome Biol Evol.* 2014;6:1353–65. 10.1093/gbe/evu101

Kenkel CD, Matz M V. Gene expression plasticity as a mechanism of coral adaptation to a variable environment. *Nat Ecol Evol.* 2016;7:14. 10.1038/s41559-016-0014

King M-C, Wilson AC. Evolution at two levels in Humans and Chimpanzees. *Science*; 1975. 188:107–16. 10.1126/science.1090005

Lachowiec J, Mason GA, Schultz K, Queitsch C. Redundancy, feedback, and robustness in the *Arabidopsis thaliana* BZR/BEH gene family. *Front Genet.* 2018;9:1–10. 10.3389/fgene.2018.00523

Landry, CR, Oh J, Hartl DL, Cavalieri D. Genome-wide scan reveals that genetic variation for transcriptional plasticity in yeast is biased towards multi-copy and dispensable genes. *Gene*, 2006;366:343–51. 10.1016/j.gene.2005.10.042

Langfelder P, Horvath S. WGCNA: An R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, 2008;9:559. 10.1186/1471-2105-9-559

Le Rouzic A, Álvarez-Castro JM, Hansen TF. The Evolution of Canalization and Evolvability in Stable and Fluctuating Environments. *Evol Biol*. 2013;40:317–40. 10.1007/s11692-012-9218-z

Le Rouzic A, Carlborg Ö. Evolutionary potential of hidden genetic variation. *Trends Ecol Evol*. 2008;23:33-7. 10.1016/j.tree.2007.09.014

Leder EH, McCairns RJS, Leinonen T, Cano JM, Viitaniemi HM, et al. The evolution and adaptive potential of transcriptional variation in sticklebacks—signatures of selection and widespread heritability. *Mol Biol Evol*. 2015;32: 674–89. 10.1093/molbev/msu328

Lendenmann MH, Croll D, Palma-Guerrero J, Stewart EL, McDonald BA. QTL mapping of temperature sensitivity reveals candidate genes for thermal adaptation and growth morphology in the plant pathogenic fungus *Zymoseptoria tritici*. *Heredity* 2016;116:384–94. 10.1038/hdy.2015.111

Leroi AM, Lensky RE, Bennett A. Evolutionary adaptation to temperature. III. Adaptation of *Escherichia coli* to a temporally varying environment. *Evolution*, 1994;48:1222–29. 10.1111/j.1558-5646

Levis NA, Pfennig DW. Evaluating “plasticity-first” evolution in nature: key criteria and empirical approaches. *Trends Ecol Evol*. 2016;31:563–74. 10.1016/j.tree.2016.03.012

Li J, Yuan Z, Zhang Z. The cellular robustness by genetic redundancy in budding yeast. *PLoS Genet*. 2010;6:e1001187. 10.1371/journal.pgen.1001187

Li XC, Fay JC. Cis-regulatory divergence in gene expression between two thermally divergent yeast species. *Genome Biol Evol.* 2017;9:1120–29. 10.1093/gbe/evx072

Li Y, Álvarez OA, Gutteling EW, Tijsterman M, Fu J, Riksen JAG, Hazendonk E, Prins P, Plasterk RHA, Jansen RC, et al. Mapping determinants of gene expression plasticity by genetical genomics in *C. elegans*. *PLoS Genet.* 2006;2:2155–61. 10.1371/journal.pgen.0020222

Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15:550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8

Masel J, Siegal ML. Robustness: mechanisms and consequences; *Trends Genet.* 25:395–403. doi.org/10.1016/j.tig.2009.07.005

McIntyre LM, RNA-seq: technical variability and sampling. *BMC Genomics* 2011;12:293. 10.1186/1471-2164-12-293

Meile L, Croll D, Brunner PC, Plissoneau C, Hartmann FE, McDonald BA, Sanchez-Vallet A; A fungal avirulence factor encoded in a highly plastic genomic region triggers partial resistance to septoria tritici blotch. *New Phytol.* 2018; 219: 1048–1061. 10.1111/nph.15180

Möller M, Habig M, Freitag M, Stukenbrock EH. Extraordinary genome instability and widespread chromosome rearrangements during vegetative growth. *Genetics,* 2018;210:517–29. 10.1534/genetics.118.301050

Noormohammad A, Rambeau J, Held T, Kovakova V, Berg J, Lassig M. Adaptive Evolution of Gene Expression in *Drosophila*. *Cell Rep.* 2017;20:1385-95. 10.1016/j.celrep.2017.07.033

Oleksiak MF, Churchill GA, Crawford DL. Variation in gene expression within and among natural populations. *Nat Genet.* 2002;32:261–66. 10.1038/ng983

Osada N, Miyagi R, Takahashi A. Cis- and trans-regulatory effects on gene expression. *Genetics* 2017;206:2139–48. [10.1534/genetics.117.201459](https://doi.org/10.1534/genetics.117.201459)

Palma-Guerrero J, Ma X, Torriani SFF, Zala M, Francisco CS, Hartmann FE, Croll D, McDonald BA. Comparative transcriptome analyses in *Zymoseptoria tritici* reveal significant differences in gene expression among strains during plant infection. *MPMI*, 2017;30:231–44. [10.1094/MPMI-07-16-0146-R](https://doi.org/10.1094/MPMI-07-16-0146-R)

Payne JL, Wagner A. The causes of evolvability and their evolution. *Nat Rev Genet.* 2019;20:24–38. [10.1038/s41576-018-0069-z](https://doi.org/10.1038/s41576-018-0069-z)

Pertea M, Kim D, Pertea GM, Leek JT, Salzberg SL. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nat Protoc.* 2016;11:1650–67. doi: [10.1038/nprot.2016.095](https://doi.org/10.1038/nprot.2016.095)

Pigliucci M, Murre CJ, Schlichting CD. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *J Exp Biol.* 2006;209:2362–67. doi:[10.1242/jeb.02070](https://doi.org/10.1242/jeb.02070)

Podrabsky JE. Changes in gene expression associated with acclimation to constant temperatures and fluctuating daily temperatures in an annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *J Exp Biol.* 2004;207:2237–54. [10.1242/jeb.01016](https://doi.org/10.1242/jeb.01016)

Rech GE, Bogaerts-Márquez M, Barrón MG, Merenciano M, Villanueva-Cañas JL, Horváth V, Fiston-Lavier AS, Luyten I, Venkataram S, Quesneville H, Petrov D. Stress response, behavior, and development are shaped by transposable element-induced mutations in *Drosophila*. *PLoS Genet.* 2019;15:e1007900. [10.1371/journal.pgen.1007900](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007900)

Rockman MV, Wray GA. Abundant raw material for cis-regulatory evolution in humans. *Mol Biol Evol.* 2002;19:1991–04. [10.1093/oxfordjournals.molbev.a004023](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004023)

Rudd JJ, Kanyuka K, Hassani-Pak K, Derbyshire M, Andongabo A, Devonshire J, Lysenko A, Saqi M, Desai NM, Powers SJ, et al. 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 Physiol.* 2015;167:1158–85. 10.1104/pp.114.255927

Schadt EE, Monks SA, Drake TA, Lusk AJ, Che N, Colinayo V, Ruff TG, Milligan SB et al. Genetics of gene expression surveyed in maize, mouse and man. *Nature*, 2003;422:297–02. 10.1038/nature01434

Schotanus K, Soyer JL, Connolly LR, Grandaubert J, Happel P, Smith KM, Freitag M, Stukenbrock EH. Histone modifications rather than the novel regional centromeres of *Zymoseptoria tritici* distinguish core and accessory chromosomes. *Epigenetics & Chromatin* 2015;8:41. 10.1186/s13072-015-0033-5

Schrader L, Schmitz J. The impact of transposable elements in adaptive evolution. *Mol Ecol.* 2019;28:1537–49. doi.org/10.1111/mec.14794|

Siegal ML, Bergman A. Waddington’s canalization revisited: Developmental stability and evolution. *PNAS*, 2002;99:10528–32.

Smith EN, Kruglyak L. Gene-environment interaction in yeast gene expression. *PLoS Biol.* 2008;6:e83. 10.1371/journal.pbio.0060083

Sørensen JG, Schou MF, Kristensen TN, Loeschcke V. Thermal fluctuations affect the transcriptome through mechanisms independent of average temperature. *Sci Rep.* 2016;6:30975. 10.1038/srep30975

Steinberg G. Cell biology of *Zymoseptoria tritici*: Pathogen cell organization and wheat infection. *Fungal Genet Biol.* 2015;79:17–23. 10.1016/j.fgb.2015.04.002

Stewart EL, Croll D, Lendenmann MH, Sanchez-Vallet A, Hartmann FE, Palma-Guerrero J, Ma X, McDonald BA. Quantitative trait locus mapping reveals complex genetic architecture of quantitative virulence in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Mol Plant Pathol.* 2018;9:201–16. 10.1111/mpp.12515

- Sundaram V, Cheng Y, Ma Z, Li D, Xing X, Edge P, Snyder MP, Wang T. Widespread contribution of transposable elements to the innovation of gene regulatory networks. *Genome Res.* 2014;24:1963–76. 10.1101/gr.168872.113.
- Uzunovic J, Josephs EB, Stinchcombe JR, Wright SI. Transposable elements are important contributors to standing variation in gene expression in *Capsella grandiflora*. *Mol Biol Evol.* 2019;36:1734–45. 10.1093/molbev/msz098
- Whitehead A, Crawford DL. Neutral and adaptive variation in gene expression. *PNAS,* 2006;103:5425–30. 10.1073/pnas.0507648103
- Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biol.* 2010;11:R14–R. 10.1186/gb-2010-11-2-r14
- Zan Y, Shen X, Forsberg SKG, Carlborg Ö. Genetic regulation of transcriptional variation in natural *Arabidopsis thaliana* accessions. *G3,* 2016;6:2319–28. 10.1534/g3.116.030874
- Zandveld J, van den Heuvel J, Mulder M, Brakefield PM, Kirkwood TBL, Shanley DP, Zwaan BJ. Pervasive gene expression responses to a fluctuating diet in *Drosophila melanogaster*: The importance of measuring multiple traits to decouple potential mediators of life span and reproduction. *Evolution* 2017;71:2572–83. 10.1111/evo.13327
- Zhan J, McDonald BA. Thermal adaptation in the fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Mol Ecol.* 2011;20:1689–701. 10.1111/j.1365-294X.2011.05023.x
- Zhong Z, Marcel TC, Hartmann FE, Ma X, Plissonneau C, Zala M, Ducasse A, Confais J, Compain J, Lapalu N, et al. A small secreted protein in *Zymoseptoria tritici* is responsible for avirulence on wheat cultivars carrying the *Stb6* resistance gene. *New Phytol.* 2017;214:619–31. 10.1111/nph.14434
- Zhou S, Campbell TG, Stone EA, Mackay TFC, Anholt RRH. Phenotypic plasticity of the *Drosophila* transcriptome. *PLoS Genet.* 2012;8(3): e1002593.

Fig. 1

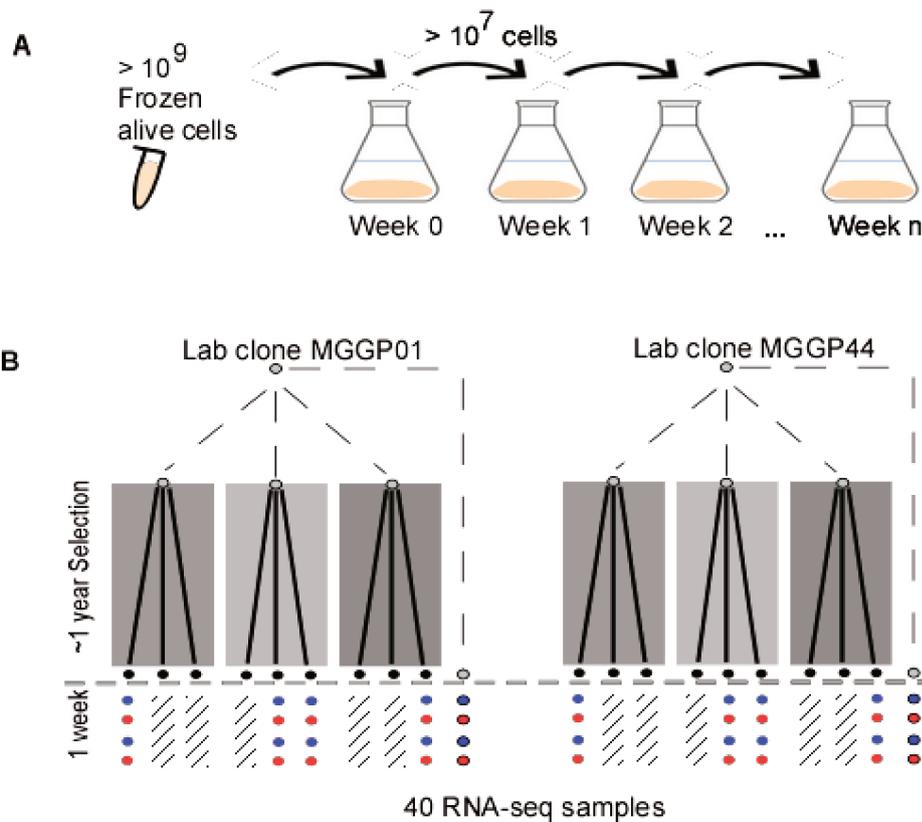


Figure 1 - Schema describing the Evolve-and-Resequencing approach starting from two lab clones of *Z. tritici*

A: *In vitro* weekly serial transfers occurred over ~1 year in 500mL of liquid medium ; **B:** Description of evolved lineages that were RNA-sequenced for the two ancestral backgrounds, after the experimental evolution under three selection regimes: Stable at 17°C (blue), Stable at 23°C (green) and fluctuating between 17°C and 23°C (purple). Ancestors were sequenced in duplicates at two temperatures of assay (17°C: blue dots ; 23°C : red dots) as were one Stable_17°C lineage, one Stable_23°C lineage and two fluctuating lineages from each ancestor.

Fig. 2

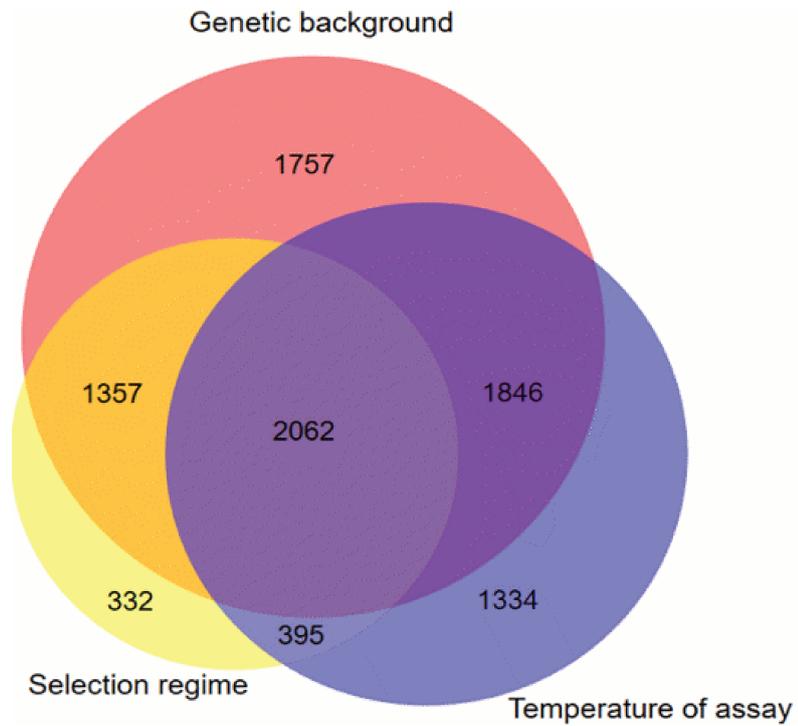


Figure 2 - Venn diagram displaying unique and shared DEGs due to the selection regimes, the temperature of assay and the ancestral genetic background

Significant genes were obtained from the statistical model DESeq2 model (2) with FDR correction for multiple testing correction at 5%.

Fig. 3

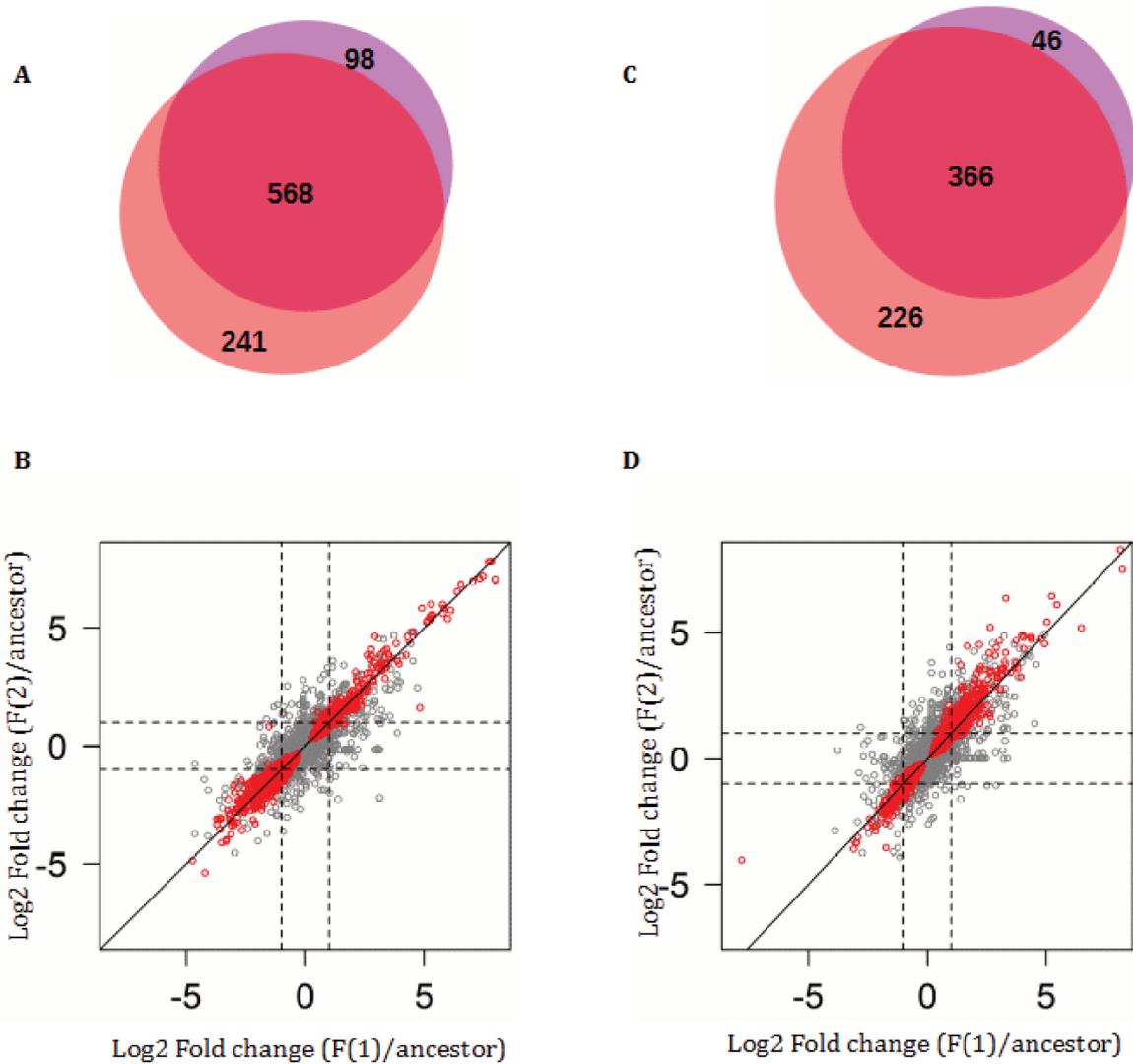


Figure 3 - Comparison of significant genes between the two replicates of evolution under fluctuation

A and **C**: Venn diagrams showing the number of significant genes which are common between the replicates for the fluctuating regime (**A**: MGGP01, **C**: MGGP44). **B** and **D**: Correlation of Log2 Fold change (evolved lineage against ancestor) between the two replicates under fluctuation (F(1) and F(2)); Pearson's correlation coefficient on whole data: $\rho = 0.88$ and 0.86 , respectively (**B**: MGGP01, **D**: MGGP44). Red points: significantly DE genes in both replicates (FDR correction at 5%). Dashed-lines correspond to a fold-change of two.

Fig. 4

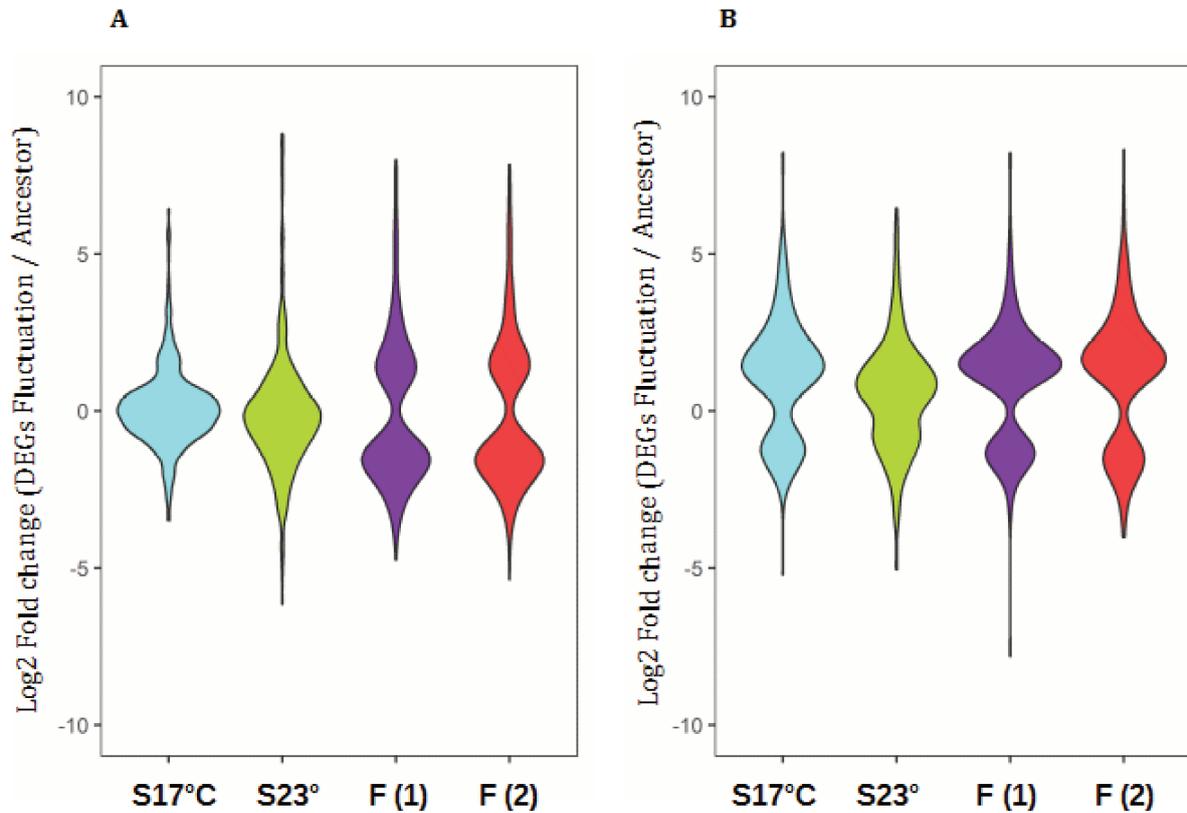


Figure 4 - Comparison of gene expression evolution between the stable and fluctuating regimes, for the set of genes with repeated significance in fluctuating regime

Log2 Fold changes are relative to the ancestral gene expression level. **A:** 568 genes for the background MGGP01; **B:** 366 significant genes for the background MGGP44; selection regimes are annotated as follow: Stable regimes (S17°C and S23°C); fluctuating regimes (experimental replicates F(1) and F(2)).

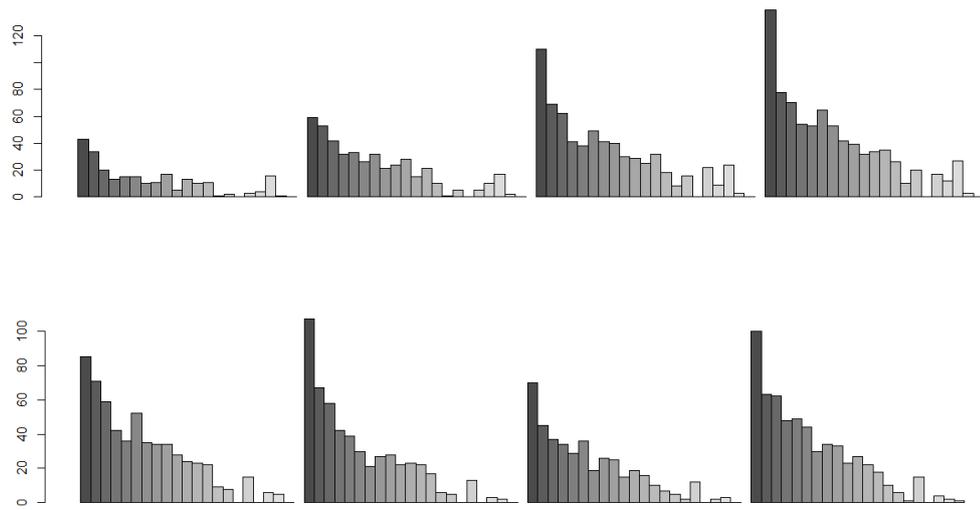
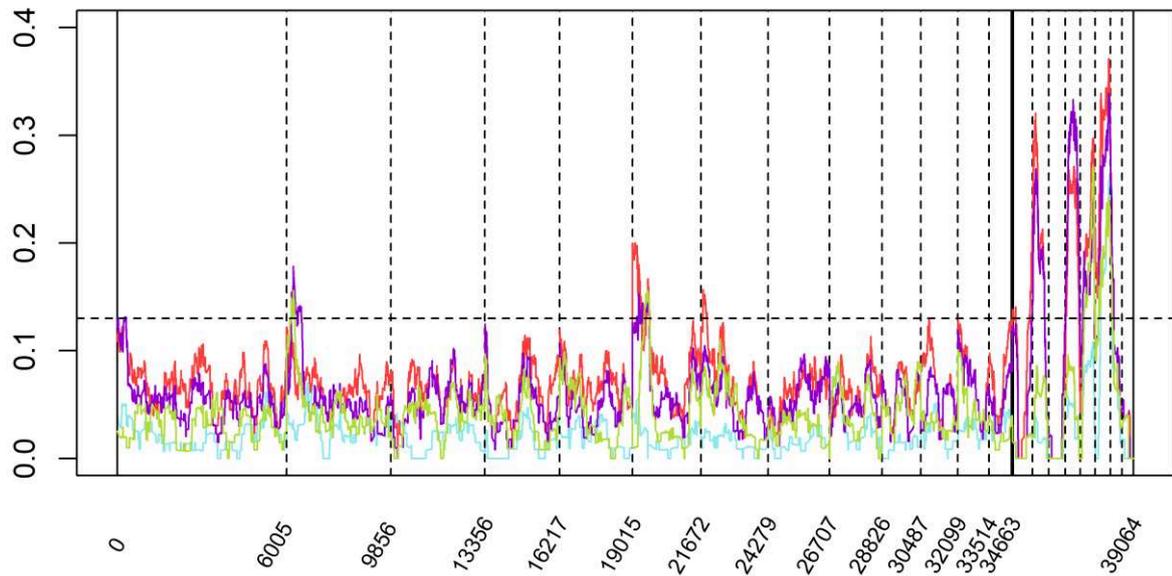
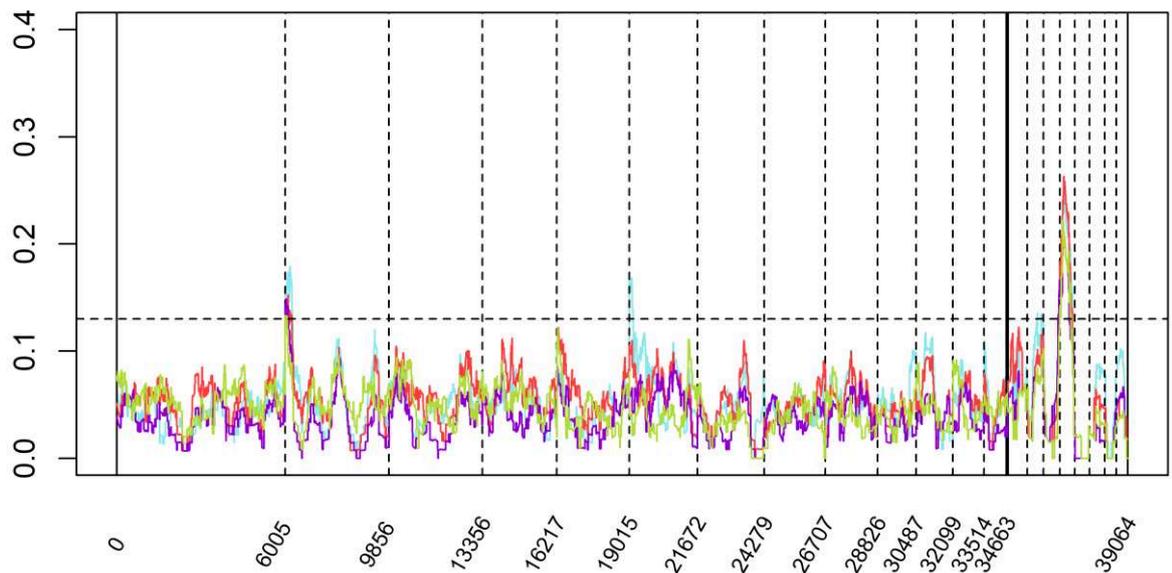
A**B****C**

Figure 5 - Whole genome distribution of significant genes for a selection regime effect

A: Barplots describing the number of significant genes (y-axis) for each of the 21 chromosomes (x-axis), for each condition of experimental evolution tested (Stable: 17°C and 23°C, and replicates under fluctuation: F(1) and F(2), for the two genetic backgrounds (MGGP01 and MGGP44); **B** and **C:** Curves represent density of DE genes for MGGP01 and MGGP44, respectively. Gene density is given by the number of DE genes per window of 100kb, using sliding windows with an overlap of 500bp within each chromosome, and after correction for gene content from the annotation provided in Grandaubert et al. 2015); density curves are presented for each selection regime: Stable 17°C (blue), Stable 23°C (green), fluctuating (1) (purple), and fluctuating (2) (red). Chromosomes are separated by vertical dashed lines.

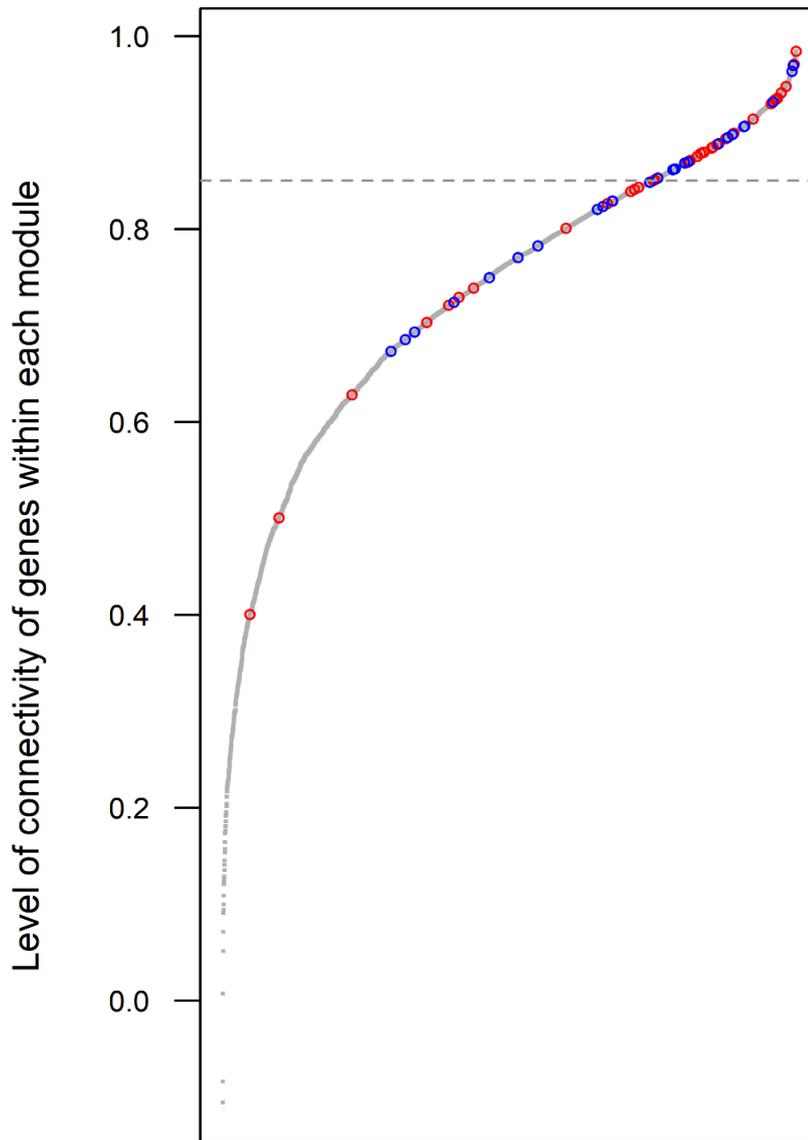


Figure 6 - Cumulative distribution of the gene connectivity for all genes included in the 8 selected modules revealed by WGCNA

Gene connectivity is measured by the correlation of each gene to the eigengene within modules.

The ranking position of genes with functional annotation related to transcription regulation and signal transduction are indicated in blue and red, respectively. Horizontal dashed line corresponds to the 75th percentile.

Fig. 7

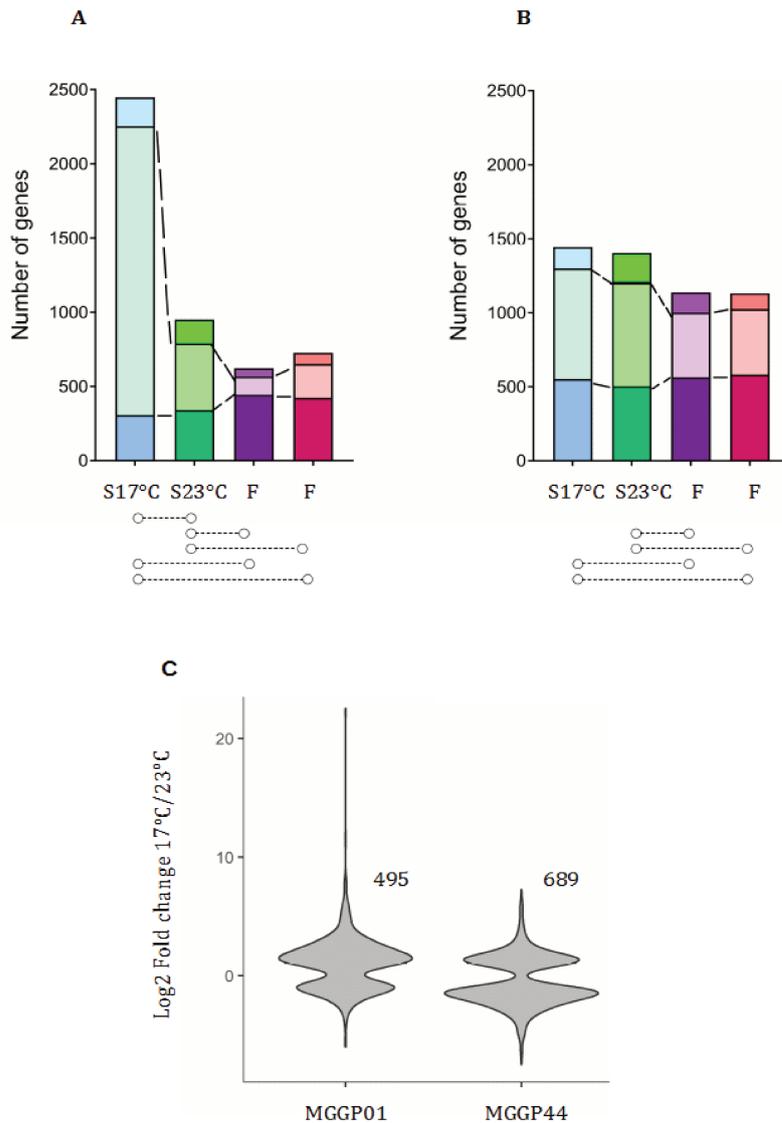


Figure 7 - Evolution of plasticity for each selection regime

A and **B**: Stacked bar charts describing the number of genes significant for the temperature of assay evolving towards a reduced plasticity (bottom), evolving towards a gain of plasticity (middle bar), and not evolving (top bar). Horizontal dashed lines below the bar charts are indicating the significant pairwise comparisons (Contrast approach using the model DESeq2 (3)). **C**: Fold change of gene expression between the two temperatures of assay for the ancestors MGGP01 and MGGP44.

IPO-323 annotation		Number of expressed genes			
Chromosomes	Gene number	IPO-323	<i>MGGP01</i>	<i>MGGP44</i>	Common
1	1986	1515 (0,76)	1589 (0,80)	1604 (0,81)	1419 (772)
2	1146	845 (0,74)	894 (0,78)	906 (0,79)	781 (454)
3	1073	770 (0,72)	834 (0,78)	840 (0,78)	715 (398)
4	824	605 (0,73)	652 (0,79)	667 (0,81)	554 (324)
5	782	559 (0,71)	590 (0,75)	591 (0,76)	505 (271)
6	692	489 (0,71)	518 (0,75)	516 (0,75)	446 (247)
7	743	385 (0,52)	402 (0,54)	412 (0,55)	347 (190)
8	694	518 (0,75)	538 (0,78)	527 (0,76)	466 (273)
9	604	412 (0,68)	409 (0,68)	427 (0,71)	357 (211)
10	516	359 (0,70)	375 (0,73)	376 (0,73)	325 (189)
11	488	332 (0,68)	339 (0,70)	352 (0,72)	298 (172)
12	414	287 (0,69)	308 (0,74)	307 (0,74)	266 (157)
13	334	210 (0,63)	230 (0,69)	224 (0,67)	184 (110)
Total core	10296	7286 (0.71)	7678 (0.75)	7749 (0.75)	6663 (3768)
14	114	32 (0,28)	22 (0,19)	20 (0,18)	17 (14)
15	86	14 (0,16)	25 (0,29)	8 (0,09)	6 (4)
16	88	17 (0,19)	0	4 (0,05)	0
17	78	5 (0,06)	22 (0,28)	3 (0,04)	2 (2)
18	64	0 *	18 (0,28)	0	0
19	87	18 (0,21)	14 (0,16)	11 (0,13)	7 (6)
20	79	12 (0,15)	25 (0,32)	11 (0,14)	7 (4)
21	58	24 (0,41)	0	0	0
Total accessory	654	122 (0.19)	126 (0.19)	57 (0.09)	39 (30)

* IPO-323 lost its chromosome 18 during sub-cultures in other laboratories

Table 1 - Distribution of transcribed genes among chromosomes (Deseq2 model (1))

Number of chromosomes and genes per chromosome for the reference genome IPO-323 (annotation from Grandaubert et al. 2015); total number of genes which are expressed (≥ 4 FPKM) in each of the three genotypes used in this study (*IPO-323*, *MGGP01* and *MGGP44*), and number of common transcripts in all three genotypes; in parentheses: proportion of transcripts among annotated genes; core: chromosomes 1 to 13; accessory: chromosomes 14 to 21.

Principal components (% of inertia in the dataset)	PC1 (52%)	PC2 (15%)	PC3 (7%)	PC4 (6%)
Genetic background	*** (98%)	NS	NS	NS
Temperature of assay	NS	*** (66%)	** (20%)	NS
Selection regime	NS	NS	** (30%)	*** (66%)
<i>Residuals</i>	<i>(1%)</i>	<i>(34%)</i>	<i>(50%)</i>	<i>(32%)</i>

Table 2 - Total percent variance of gene expression explained from DESeq2 Model (2) (ANOVA).

Contribution (percent of variance) of the genetic background; temperature of assay and selection regime to the first four Principal Components (PC1, PC2, PC3, PC4), significance is indicated by NS (non-significant), ** ($P < 0.01$) *** ($P < 0.001$).

	Background <i>MGGP01</i>	Background <i>MGGP44</i>
Lineage	3420	3659
<i>Stable 17°C</i>	244 (3.1)	588 (2.9)
<i>Stable 23°C</i>	436 (3.1)	532 (2.8)
<i>Fluctuating</i>	666 (2.9)	412 (2.8)
<i>Fluctuating</i>	809 (2.7)	592 (2.8)
Temperature of assay	3601	4333
Lineage-by-temperature	414	851

Table 3 - Number of DEGs from the gene expression level in the ancestor, associated with the selection regime and the temperature of assay

Three selection regimes (stable at 17°C, stable at 23°C and fluctuating between 17°C and 23°C) and two genetic backgrounds (*MGGP01*, *MGGP44*), were tested. Each genetic background was analyzed separately. Significance threshold for genes with a fold-changed >2 was determined after FDR correction for multiple testing at 5% (Benjamini and Hochberg, 2001); median fold change among significant genes when indicated is in parentheses.

Additional File 1

Table S1. List of RNA samples used for the differential expression analysis

Nb ¹	Sample IDs	Genetic background	Selection regime	Temperature during selection (°C)	Temperature of assay ² (°C)	Replicates ³
1	MGGP01_17_R1	<i>MGGP01</i>	-	-	17	R1
	MGGP01_17_R2	<i>MGGP01</i>	-	-	17	R2
2	MGGP01_23_R1	<i>MGGP01</i>	-	-	23	R1
	MGGP01_23_R2	<i>MGGP01</i>	-	-	23	R2
3	MGGP01_23_17_R1	<i>MGGP01</i>	Stable	23	17	R1
	MGGP01_23_17_R2	<i>MGGP01</i>	Stable	23	17	R2
4	MGGP01_23_23_R1	<i>MGGP01</i>	Stable	23	23	R1
	MGGP01_23_23_R2	<i>MGGP01</i>	Stable	23	23	R2
5	MGGP01_17_17_R1	<i>MGGP01</i>	Stable	17	17	R1
	MGGP01_17_17_R2	<i>MGGP01</i>	Stable	17	17	R2
6	MGGP01_17_23_R1	<i>MGGP01</i>	Stable	17	23	R1
	MGGP01_17_23_R2	<i>MGGP01</i>	Stable	17	23	R2
7	MGGP01_F_1_17_R1	<i>MGGP01</i>	Fluctuating	17/23	17	R1
	MGGP01_F_1_17_R2	<i>MGGP01</i>	Fluctuating	17/23	17	R2
8	MGGP01_F_1_23_R1	<i>MGGP01</i>	Fluctuating	17/23	23	R1
	MGGP01_F_1_23_R2	<i>MGGP01</i>	Fluctuating	17/23	23	R2
9	MGGP01_F_2_17_R1	<i>MGGP01</i>	Fluctuating	17/23	17	R1
	MGGP01_F_2_17_R2	<i>MGGP01</i>	Fluctuating	17/23	17	R2
10	MGGP01_F_2_23_R1	<i>MGGP01</i>	Fluctuating	17/23	23	R1
	MGGP01_F_2_23_R2	<i>MGGP01</i>	Fluctuating	17/23	23	R2
11	MGGP44_17_R1	<i>MGGP44</i>	-	-	17	R1
	MGGP44_17_R2	<i>MGGP44</i>	-	-	17	R2
12	MGGP44_23_R1	<i>MGGP44</i>	-	-	23	R1
	MGGP44_23_R2	<i>MGGP44</i>	-	-	23	R2
13	MGGP44_23_17_R1	<i>MGGP44</i>	Stable	23	17	R1
	MGGP44_23_17_R2	<i>MGGP44</i>	Stable	23	17	R2
14	MGGP44_23_23_R1	<i>MGGP44</i>	Stable	23	23	R1
	MGGP44_23_23_R2	<i>MGGP44</i>	Stable	23	23	R2
15	MGGP44_17_17_R1	<i>MGGP44</i>	Stable	17	17	R1
	MGGP44_17_17_R2	<i>MGGP44</i>	Stable	17	17	R2
16	MGGP44_17_23_R1	<i>MGGP44</i>	Stable	17	23	R1
	MGGP44_17_23_R2	<i>MGGP44</i>	Stable	17	23	R2
17	MGGP44_F_1_17_R1	<i>MGGP44</i>	Fluctuating	17/23	17	R1
	MGGP44_F_1_17_R2	<i>MGGP44</i>	Fluctuating	17/23	17	R2
18	MGGP44_F_1_23_R1	<i>MGGP44</i>	Fluctuating	17/23	23	R1
	MGGP44_F_1_23_R2	<i>MGGP44</i>	Fluctuating	17/23	23	R2
19	MGGP44_F_2_17_R1	<i>MGGP44</i>	Fluctuating	17/23	17	R1
	MGGP44_F_2_17_R2	<i>MGGP44</i>	Fluctuating	17/23	17	R2
20	MGGP44_F_2_23_R1	<i>MGGP44</i>	Fluctuating	17/23	23	R1
	MGGP44_F_2_23_R2	<i>MGGP44</i>	Fluctuating	17/23	23	R2

¹Nb corresponds to the number of pairs of biological replicates ²RNA were collected after one week of growth at 17°C or 23°C; ³two independent biological replicates were produced per lineage

Additional File 2

Figure S1. RNA sample library sizes before and after RLE normalization (y-axis: millions of mapped reads). Dark grey bars and light grey bars represent library sizes before and after Relative Log Expression normalization, respectively. X-axis labels are described in Table S1. Briefly, two different genetic backgrounds were tested (*MGGP01* and *MGGP44*); 3 different selection regimes were tested (stable 17°C (_17), stable 23°C (_23) and fluctuating temperature between 17°C and 23°C (_F)); 2 experimental replicates for the fluctuating regime were performed (F_1, F_2); 2 temperatures of assay were tested prior to sequencing: 17°C and 23°C (_17, _23); and biological replicates are annotated _R1 and _R2. Reads were mapped using the annotation of the reference genome of *Z. tritici* from (Grandaubert et al., 2015).

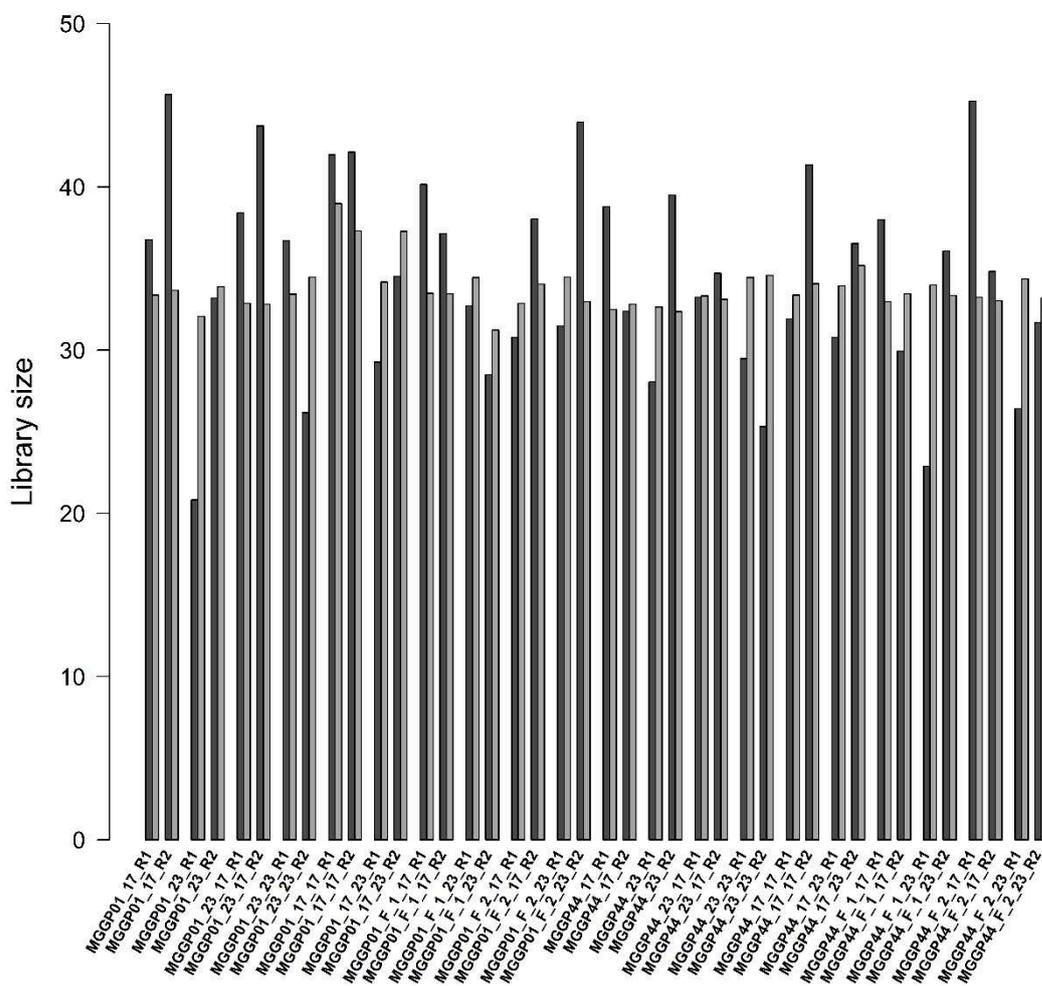


Figure S2. Distribution of the log2 transformed number of mapped reads per annotated gene for the 40 libraries.

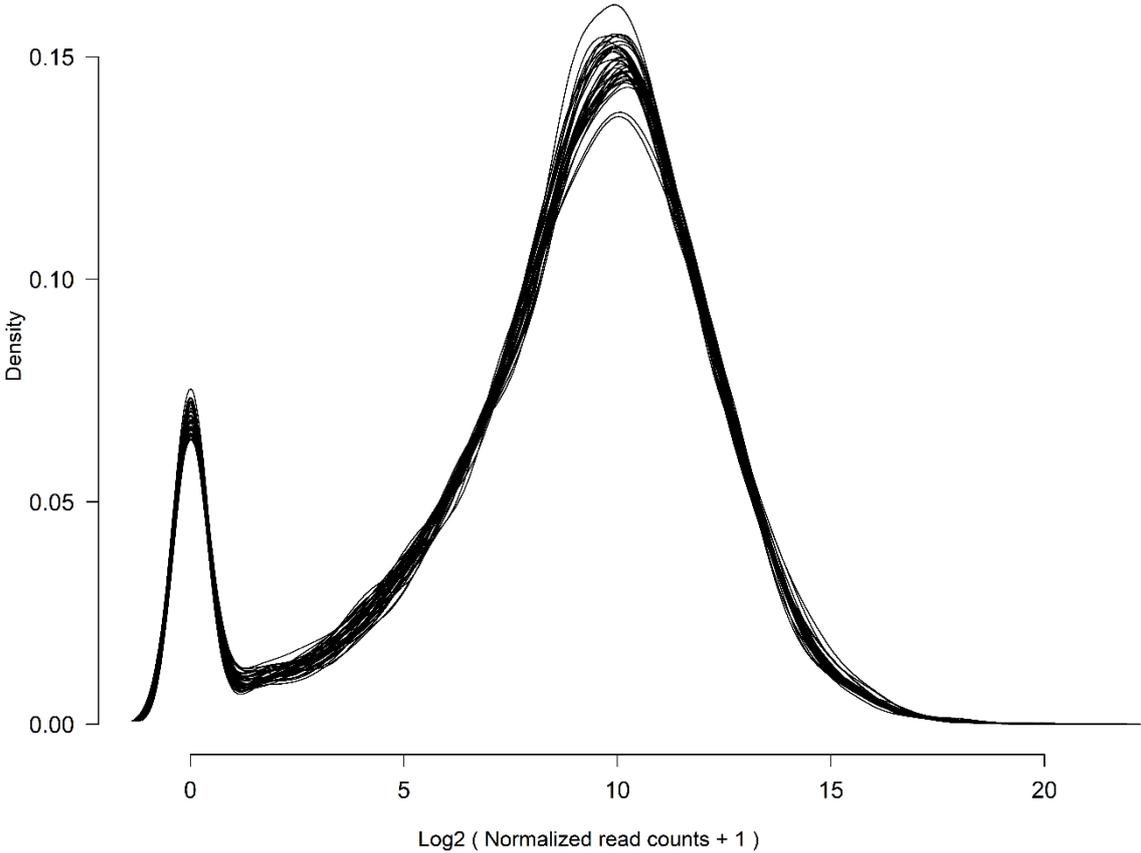
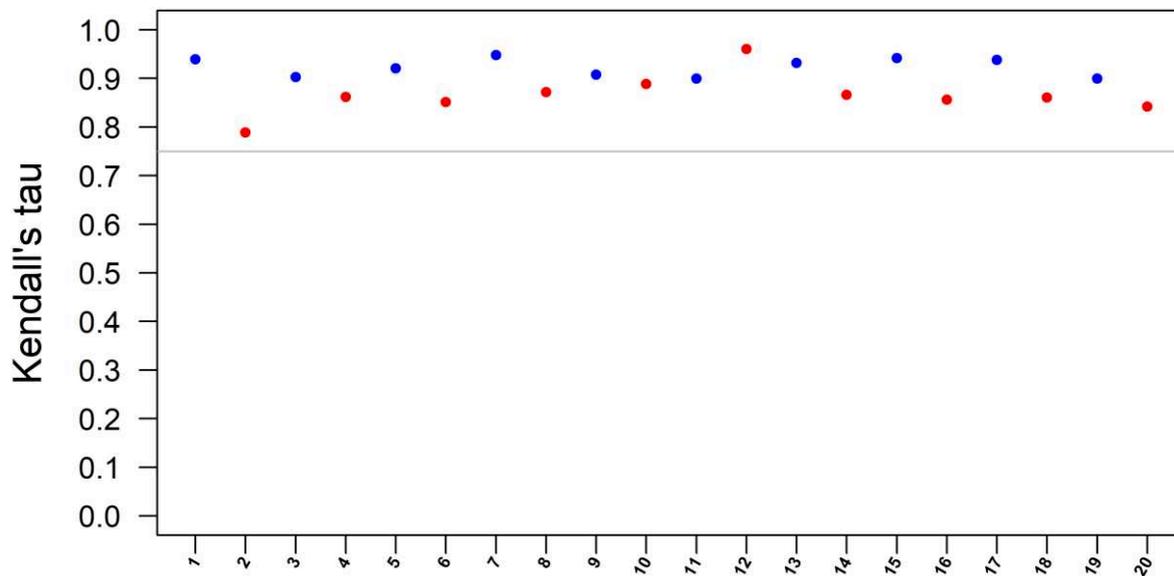


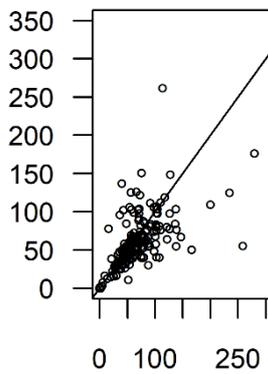
Figure S3. Kendall's τ correlation coefficient between pairs of biological replicates, estimated using whole transcriptome (10,950 genes annotated in Grandaubert et al., 2015). Sample numbers and corresponding treatments are listed in the Table S1. Grey line represents the τ value of 0.75.



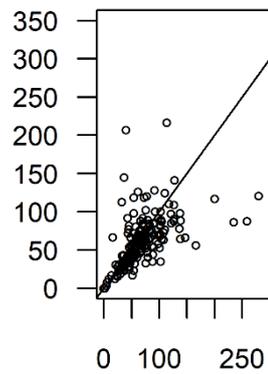
Additional File 3

Figure S4. Scatter plot showing the relationship of averaged FPKM between pairs of genotypes. **A.** Strains *IPO-323* (x-axis) and *MGGP01* (y-axis); **B.** Strains *IPO-323* (x-axis) and *MGGP44* (y-axis); **C.** *MGGP01* (x-axis) and *MGGP44* (y-axis). 181 non-overlapping windows of 200 kb were used. Pearson's correlation coefficients are 0.55, 0.52 and 0.76, for A, B and C, respectively; and the black line corresponds to the first bisector ($y = x$)

A



B



C

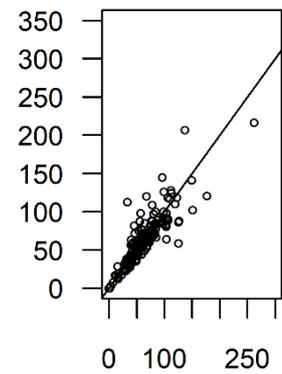
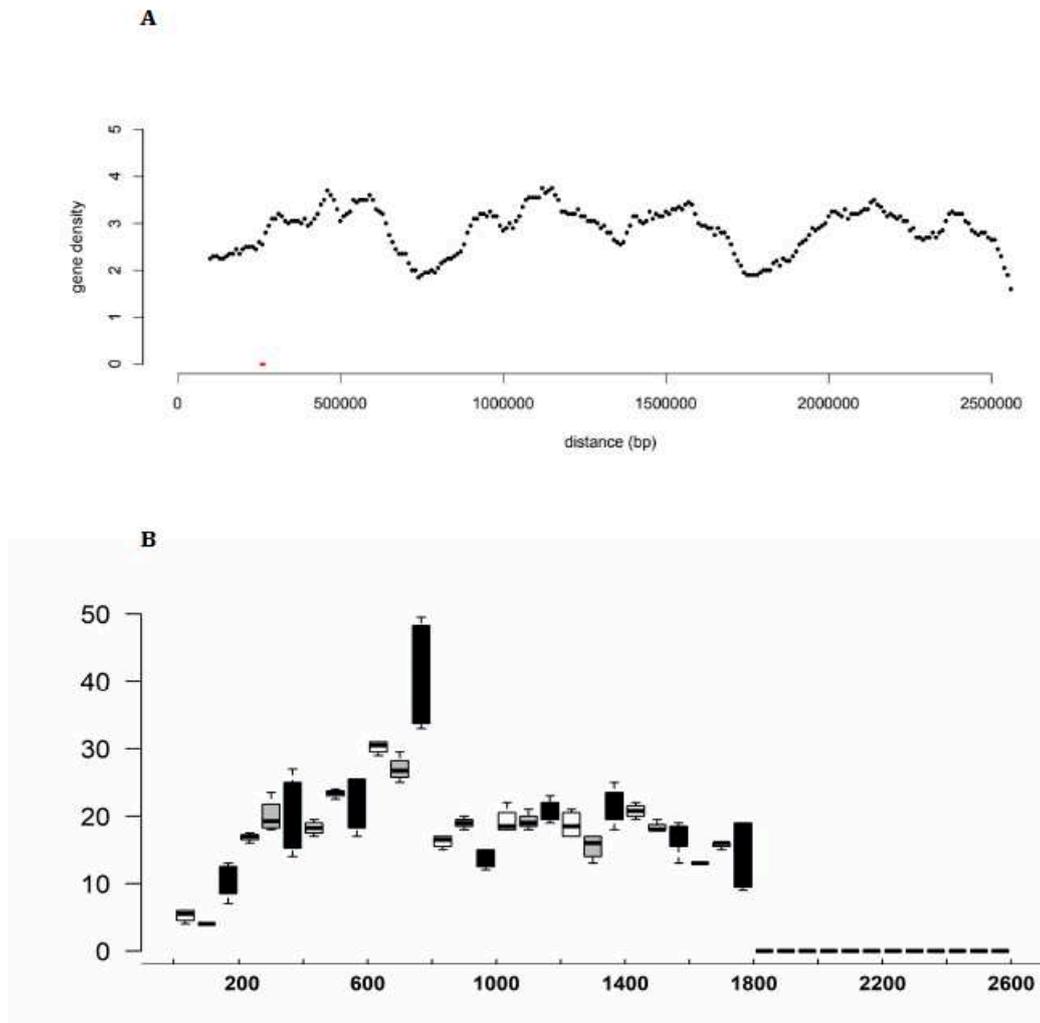


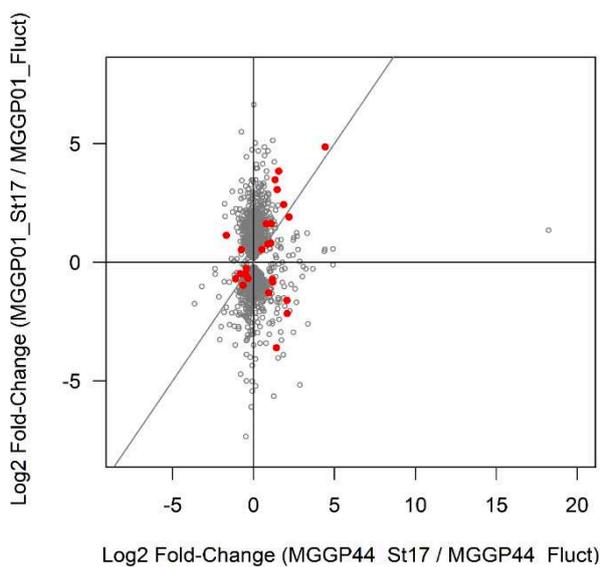
Figure S5. Transcriptional activity on chromosome 7. **A.** Gene density along the chromosome 7 (30Kb overlapping windows by 10Kb); **B.** Gene expression profile for three isolates *MGGP01* (white), *MGGP44* (grey), and *IPO-323* (black), using median FPKM within 200kb non-overlapping windows for all annotated genes along the chromosome 7 (Grandaubert et al., 2015).



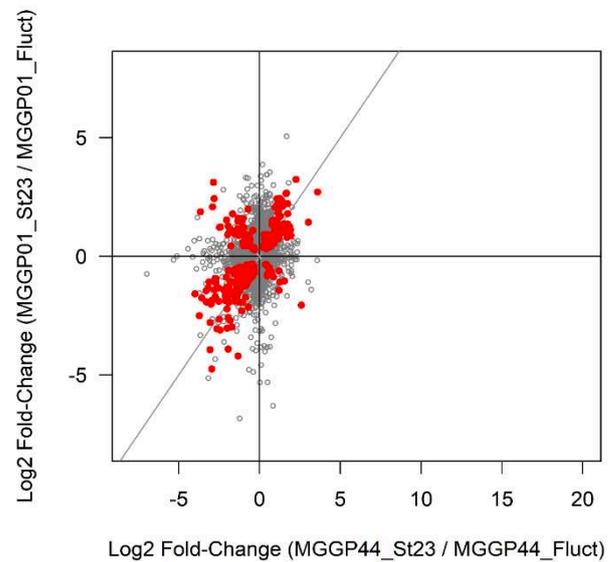
Additional File 4

Figure S6. Correlation between fold changes of gene expression among selective regimes measured for the two genetic backgrounds MGGP44 and MGGP01. All significant genes (1728) for the interaction term Regime-by-Genetic background in model DESeq2 (2) are included; Red points: significant genes between the selection regimes using a contrast approach; **A:** Fold change of gene expression between Stable at 17°C and Fluctuating lineages, Spearman correlation coefficient $\rho = 0.23$; **B:** Fold change of gene expression between Stable at 23°C and Fluctuating lineages, Spearman correlation coefficient $\rho = 0.31$; **C:** Fold change of gene expression between Stable at 17°C and Stable 23°C lineages, Spearman correlation coefficient $\rho = 0.51$.

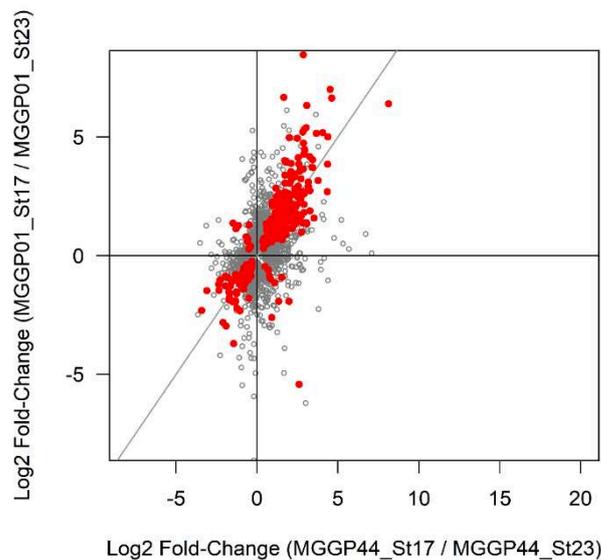
A



B



C



Additional File 5

Figure S7. Volcano plots of DESeq2 analysis model (3) for DEGs compared to the ancestor expression level. A: results for the genetic background MGGP01 ; **B:** results for the genetic background MGGP44 ; vertical dashed lines: Fold change of 2 ; horizontal dashed line: FDR threshold at 5 %. Genes significantly DE of at least a factor two are in red and genes SDE of a factor less than 2 in orange.

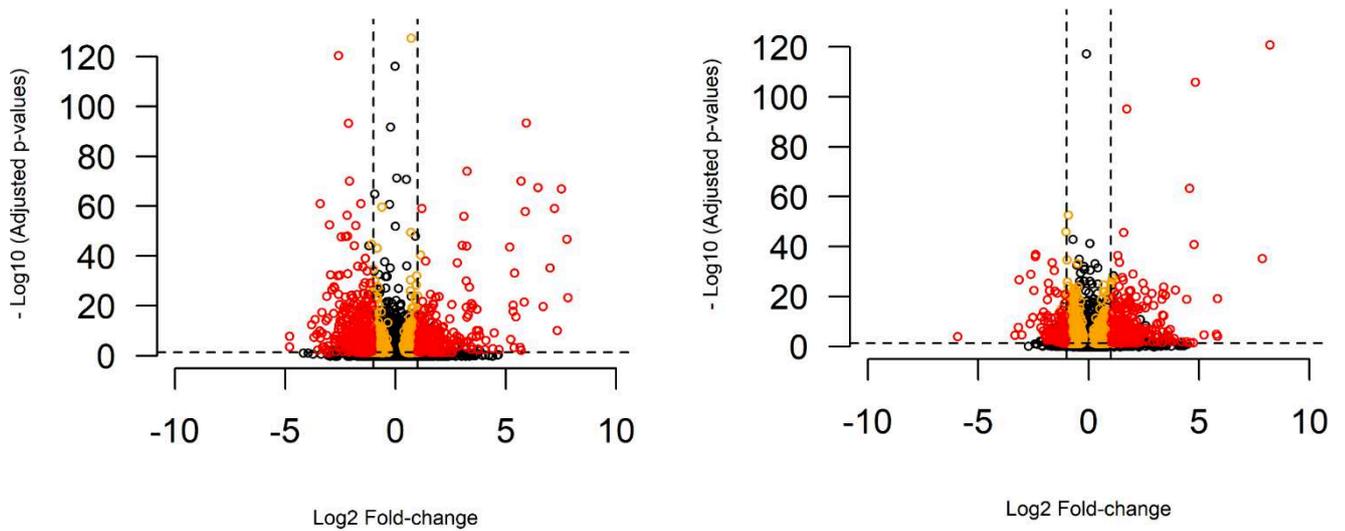


Figure S8. Distribution of Log2 fold change of all significant genes differentially expressed due to the selection regimes in the model DESeq2 (3). **A:** results using the genetic background MGGP01 ; **B:** results using the genetic background MGGP44; number of up- and down-regulated significant genes are indicated on top of each graph. Colours as follow: blue (Stable_17°C lineages) ; green (Stable_23°C lineages) ; red and purple (fluctuating lineages).

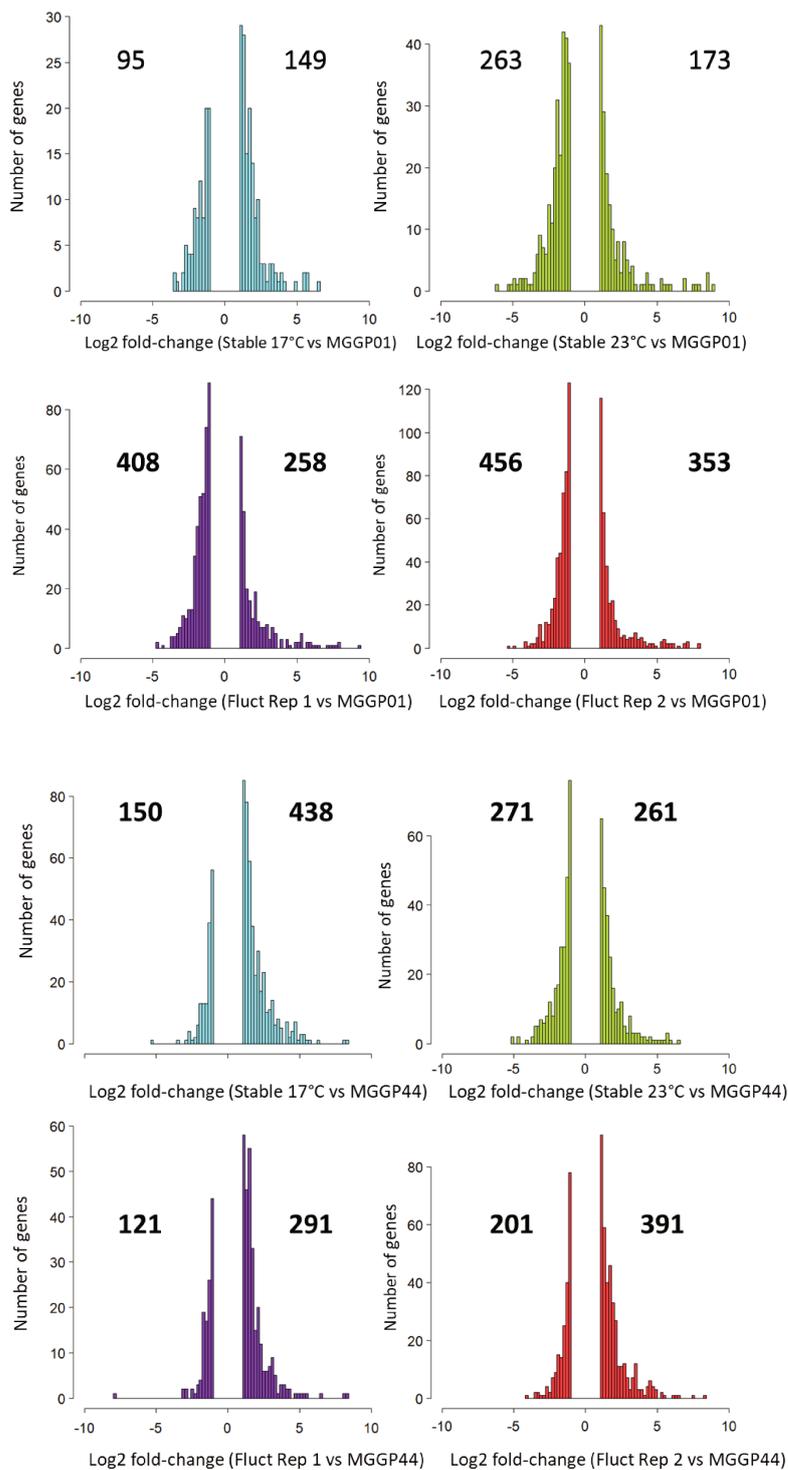
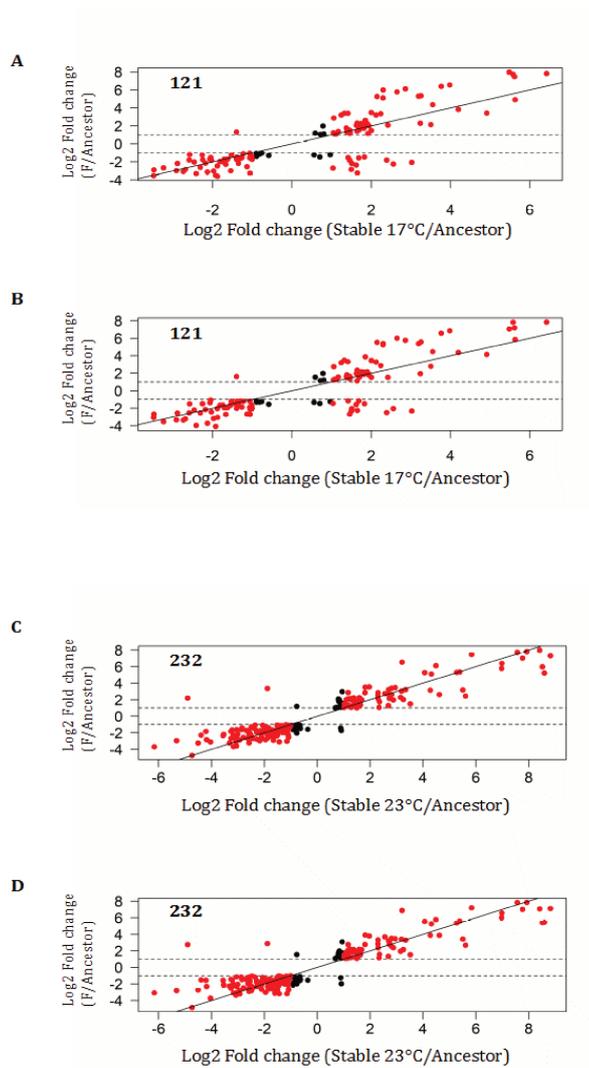
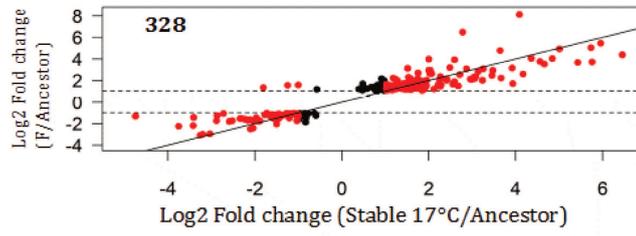


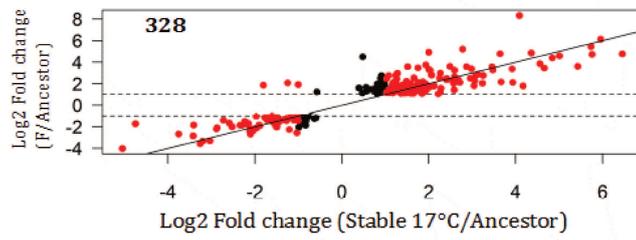
Figure S9. Correlation of Log2 fold change between all genes differentially expressed under fluctuation with other evolved lineages. Panels A to D: genetic background MGGP01; panels E to H: genetic background MGGP44 ; results are shown separately for each repeated evolution under fluctuation : see panels A and B, C and D, E and F, G and H. The number of significant genes in common between the selection regimes is added on each graph. Red points represent genes with a raw Fold change greater than 2.



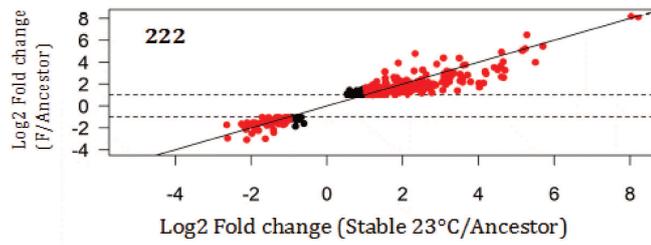
E



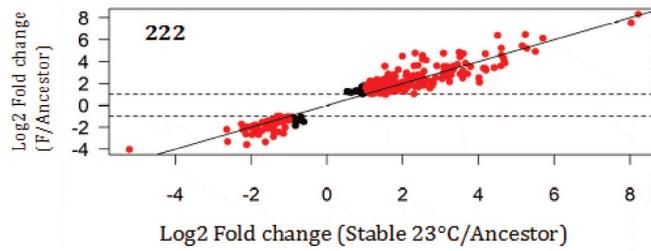
F



G



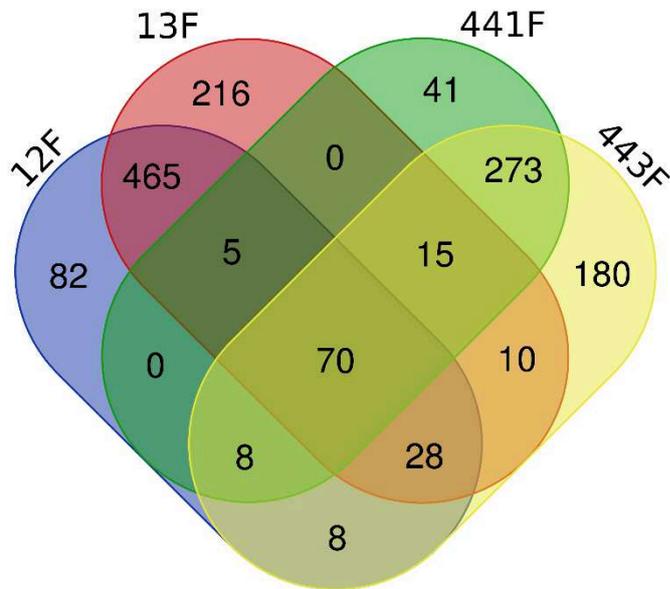
H



Additional File 6

Venn diagram corresponding to **Table S2**

Numbers of DE genes in each fluctuating lineage, compared to the ancestral expression level, are given. For MGGP01 (resp. MGGP44) background, 12 and 13F (resp. 441F and 443F) correspond to F1 and F2 lineages listed in **Table S1**.



Additional File 7

Table S3. Number of DEGs per chromosome for each selection regime and genetic background (2 genetic backgrounds tested: MGGP01 and MGGP44); Three selection regimes: Stable 17°C, Stable 23°C and Fluctuation (2 replicate lineages). Chi-square test for proportions was applied to compare the total number of evolved gene for each regime between the core genome (chromosomes 1 to 13) and the accessory genome (chromosomes 14 to 21); FDR threshold at 5% was applied for multiple testing correction.

Chromosomes	MGGP01 lineages		MGGP44 lineages					
	Stable 17°C	Stable 23°C	Fluct (1)	Fluct (2)	Stable 17°C	Stable 23°C	Fluct (1)	Fluct (2)
Chr_1	43	59	110	139	85	107	70	100
Chr_2	34	53	69	78	71	67	45	63
Chr_3	20	42	62	70	59	58	37	62
Chr_4	13	32	41	54	42	42	34	48
Chr_5	15	33	38	53	36	39	29	49
Chr_6	15	26	49	65	52	30	36	44
Chr_7	10	32	41	53	35	21	19	30
Chr_8	11	21	40	42	34	27	26	34
Chr_9	17	24	30	39	34	28	25	33
Chr_10	5	28	29	32	28	22	15	23
Chr_11	13	15	25	34	24	23	19	27
Chr_12	10	21	32	35	23	22	16	22
Chr_13	11	10	18	26	22	17	10	18
Total Core Chromosomes	217	396	584	720	545	503	381	553
Chr_14	1	1	8	10	9	6	7	10
Chr_15	2	5	16	20	8	5	5	6
Chr_16	0	0	0	0	0	0	2	1
Chr_17	3	5	22	17	15	13	12	15
Chr_18	4	10	9	12	0	0	0	0
Chr_19	16	17	24	27	6	3	2	4
Chr_20	1	2	3	3	5	2	3	2
Chr_21	0	0	0	0	0	0	0	1
Total Accessory Chromosomes	27	40	82	89	43	29	31	39
Chi-square test (core versus accessory)	10,68	7,7	49,5	38,3	1,74	0,18	1,55	0,31
pvalue(adjusted)	0,003	0,011	1,50E-11	2,30E-09	0,28	0,69	0,28	0,65

Additional File 8

Table S4. WGCNA modules (16) identified for the background MGGP01. Each module contains genes which expression profiles across selection regimes and temperatures of assay are similar.

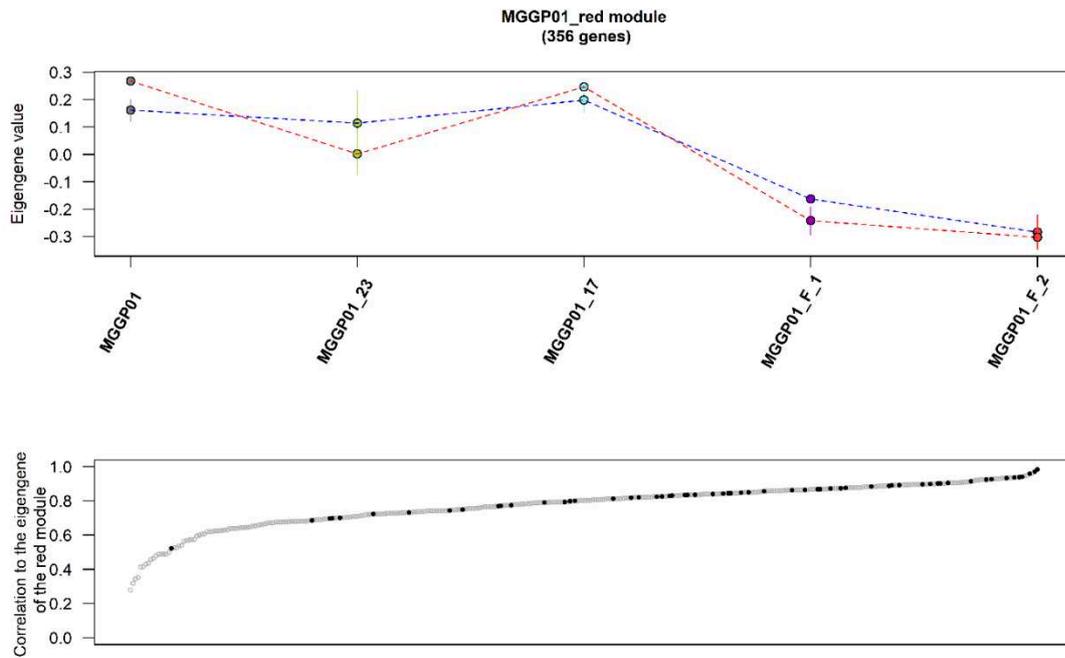
WGCNA module	Gene count
MGGP01_blue	760
MGGP01_darkolivegreen	622
MGGP01_black	556
MGGP01_magenta	532
MGGP01_darkgreen	458
MGGP01_skyblue	456
MGGP01_red	356
MGGP01_darkred	227
MGGP01_purple	177
MGGP01_tan	166
MGGP01_orange	154
MGGP01_darkorange	151
MGGP01_lightyellow	125
MGGP01_darkmagenta	90
MGGP01_white	77
MGGP01_yellowgreen	41

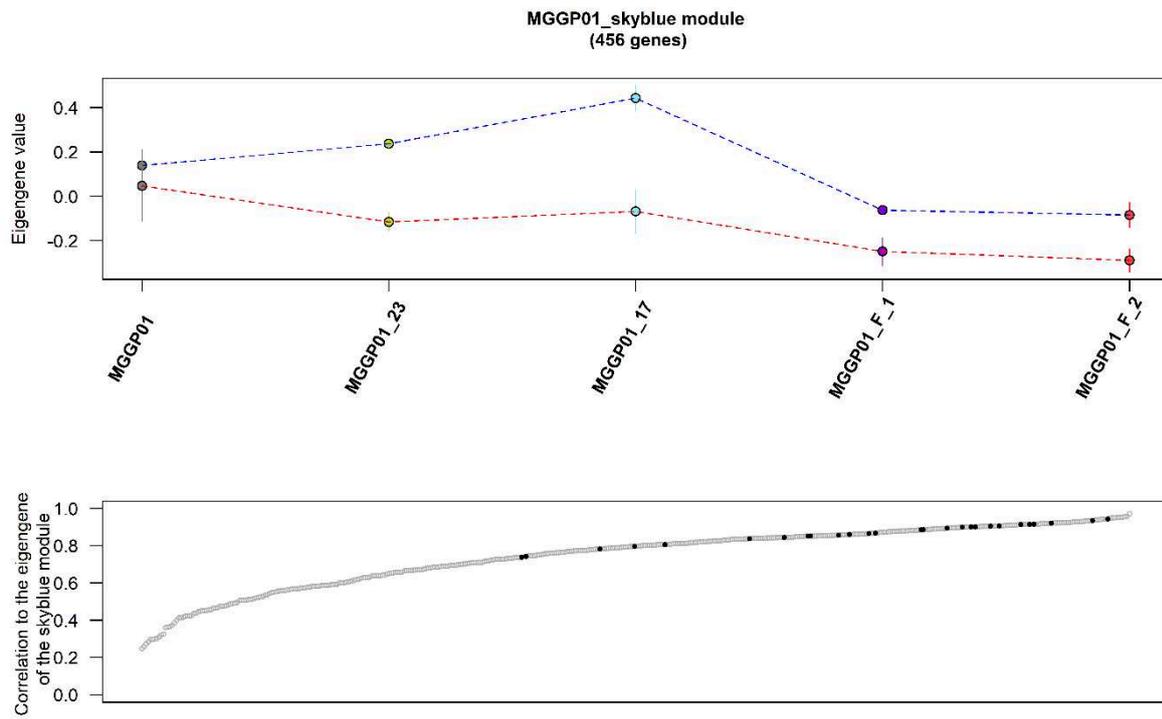
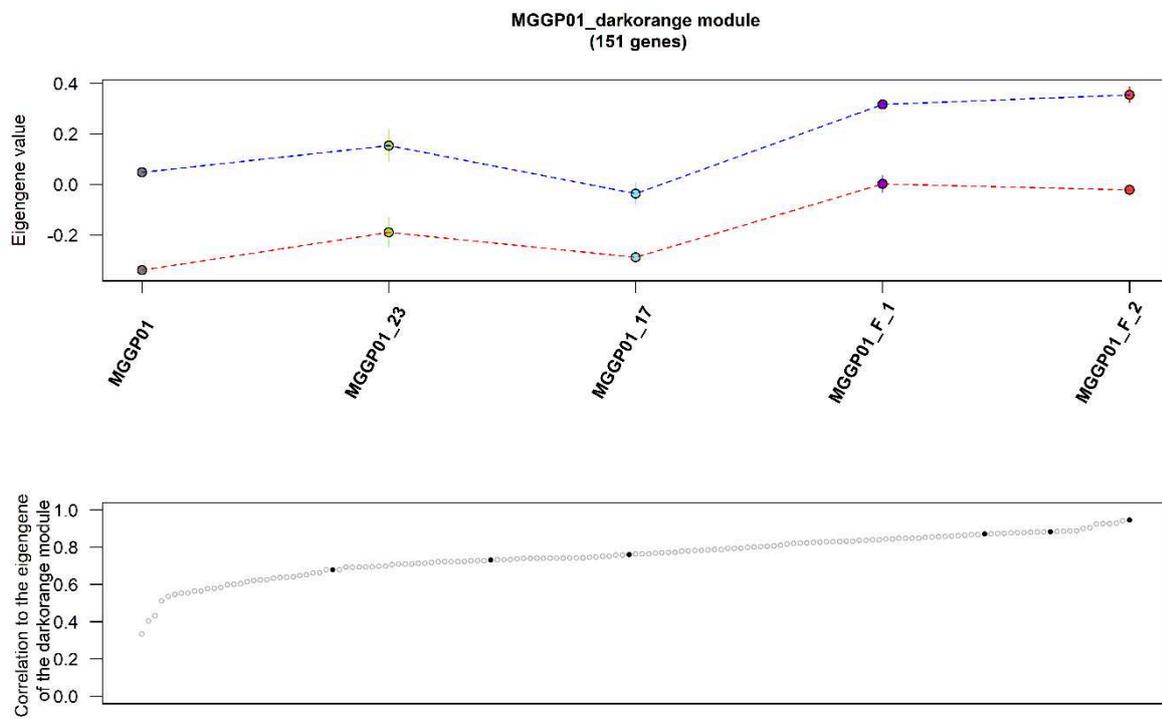
Table S5. WGCNA modules (15) identified for the background MGGP44. Each module contains genes which expression profiles across selection regimes and temperatures of assay are similar.

WGCNA module	Gene count
MGGP44_grey60	1509
MGGP44_lightcyan	1455
MGGP44_black	409
MGGP44_salmon	313
MGGP44_green	304
MGGP44_cyan	224
MGGP44_darkolivegreen	185
MGGP44_darkmagenta	181
MGGP44_tan	160
MGGP44_darkorange	144
MGGP44_orange	101
MGGP44_skyblue	93
MGGP44_steelblue	85
MGGP44_violet	76
MGGP44_sienna3	66

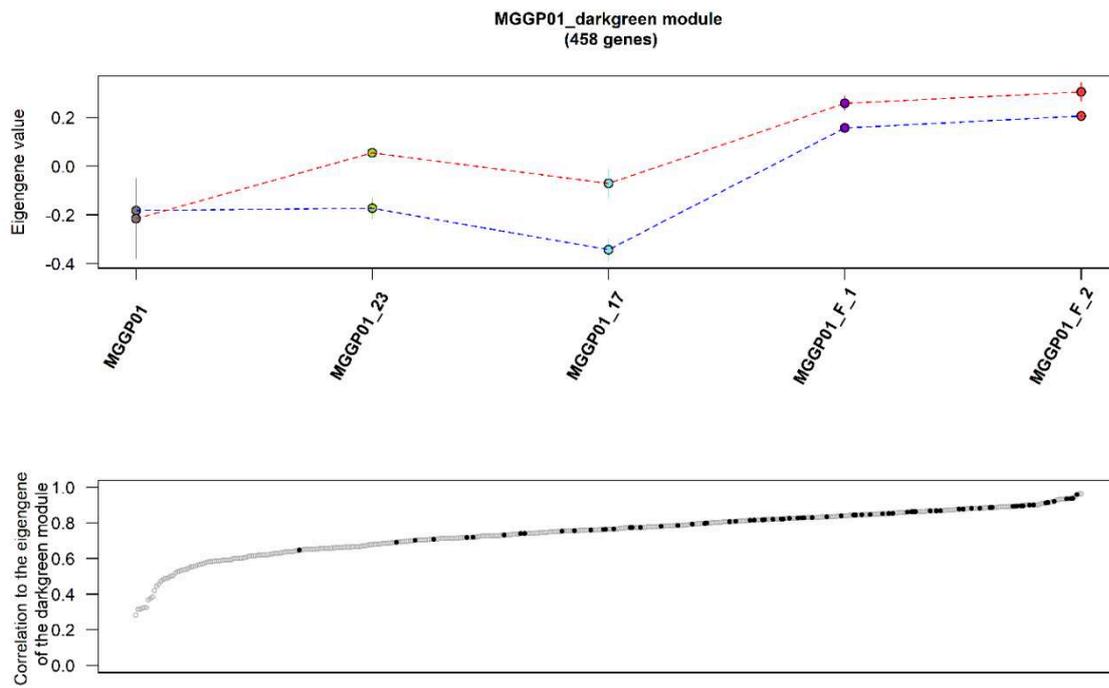
Figure S10. Characteristics of the top 8 WGCNA modules. **A to E:** modules detected for the background MGGP01; **F to H:** modules detected for the background MGGP44. **Top panel** of each figure represents the pattern of the eigengene value among the evolved lineages; **Bottom panel** of each figure represents ranked level of correlation of each gene of the module to the eigengene. Darker points are the ranked positions of genes identified by our contrast approach.

A

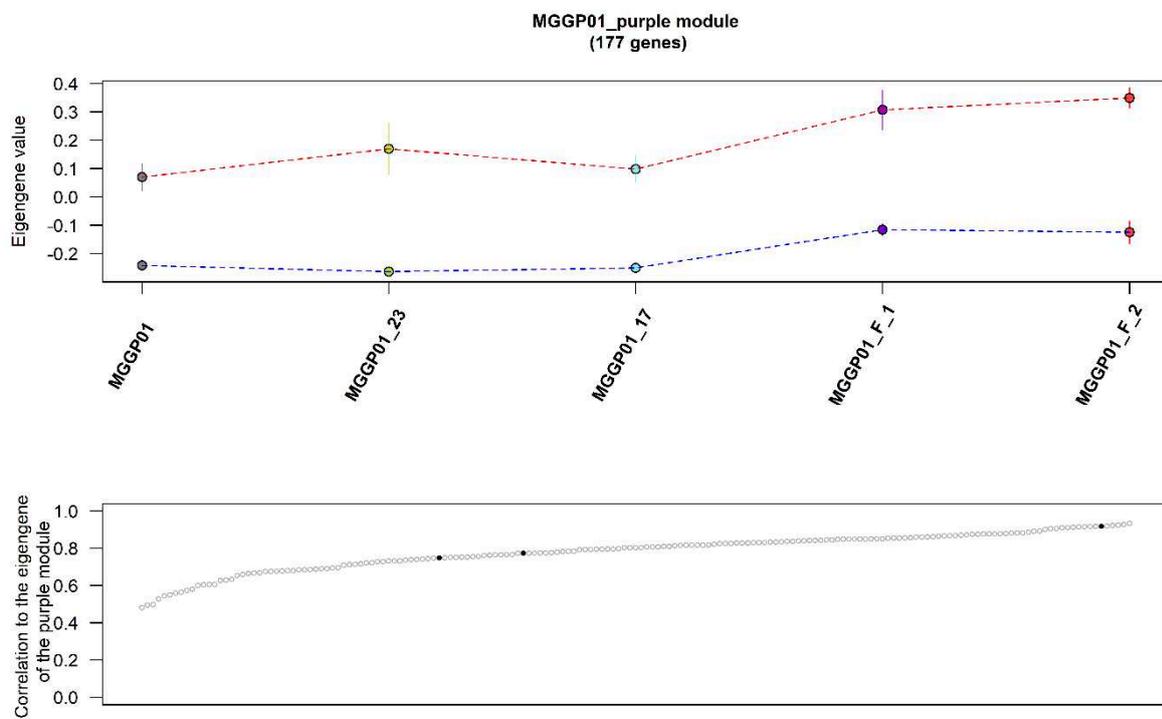


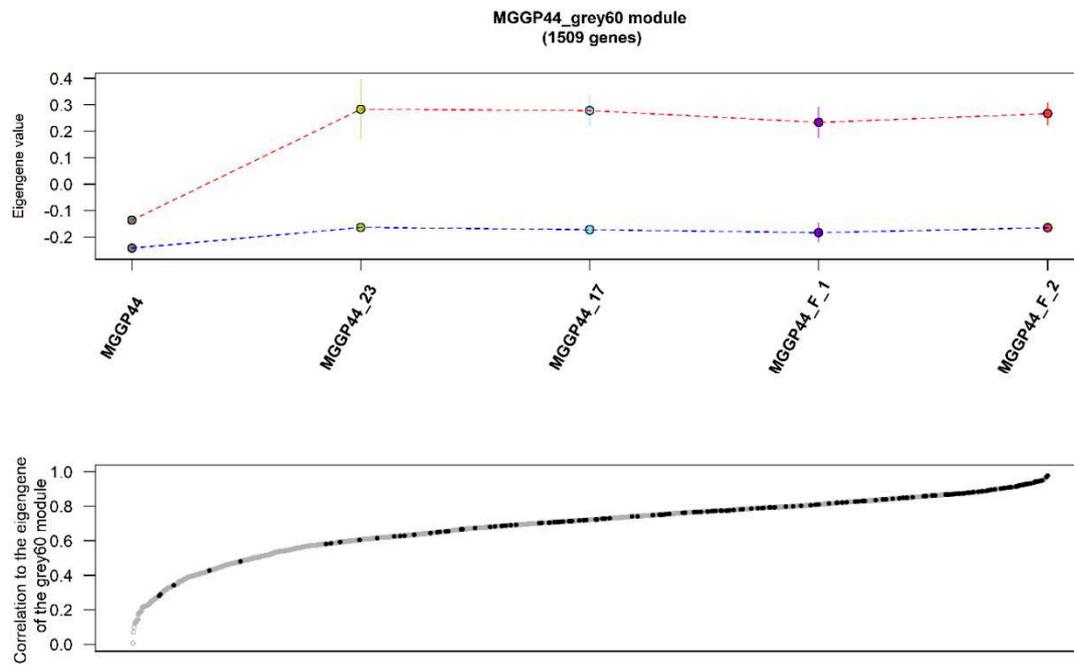
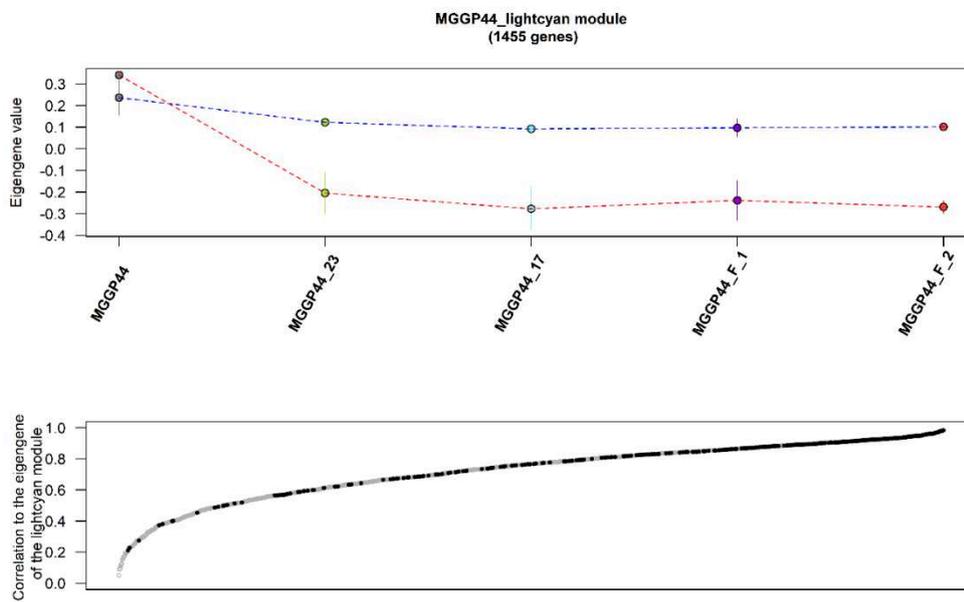
B**C**

D

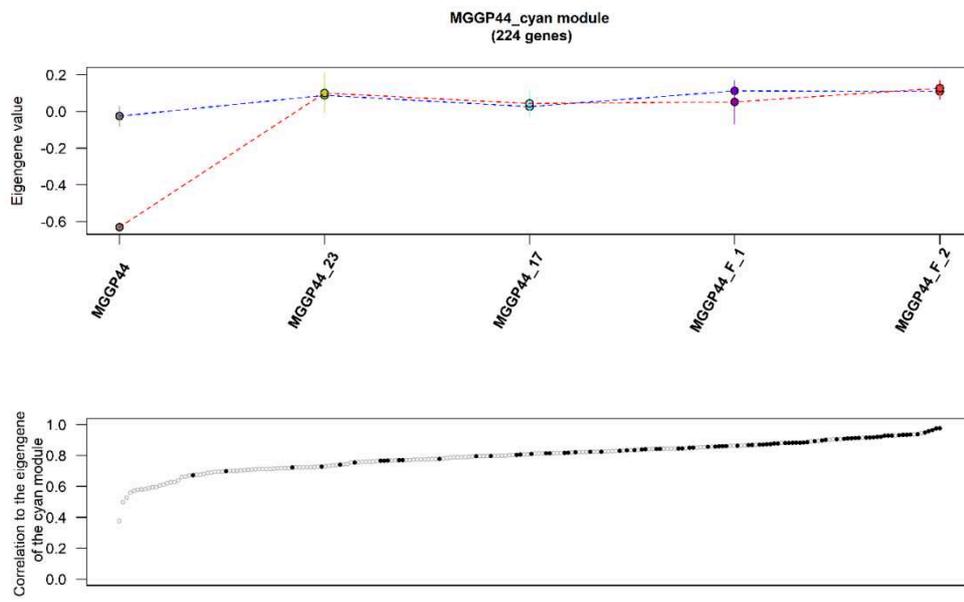


E



F**G**

H



Additional File 9

Table S6. Description of the 63 genes which function is associated to transcription regulation or signal transduction, among the top 8 WGCNA modules. ID: unique gene identifier from the DOE Joint Genome Institute, Gene_name: gene number presented in the genome annotation from Grandaubert et al. (2015). Rank: Gene rank within each module depending on their level of connectivity within each module and number of genes in the module.

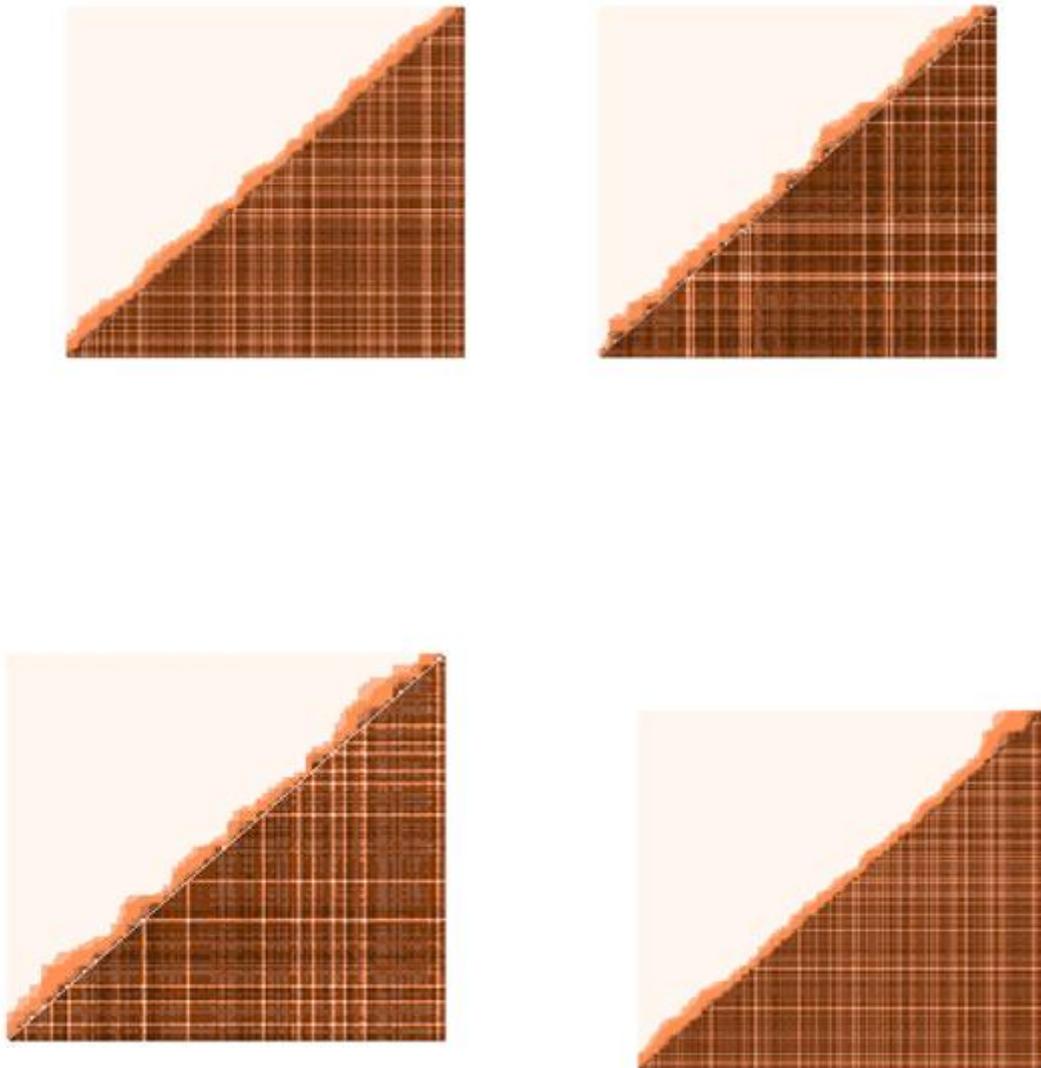
ID	Gene_name	Module	Correlation to the eigengene	Rank	Gene Function
43318	gene_6182	MGGP01_darkgreen	0,6857	121 / 458	Transcription
50394	gene_3427	MGGP01_darkgreen	0,7213	164 / 458	Signal transduction
87549	gene_5500	MGGP01_darkgreen	0,8236	314 / 458	Transcription
108064	gene_7068	MGGP01_darkgreen	0,8699	388 / 458	Transcription
83976	gene_10229	MGGP01_darkgreen	0,8952	427 / 458	Transcription
23234	gene_9490	MGGP01_red	0,7501	131 / 356	Transcription
99917	gene_5845	MGGP01_red	0,8435	233 / 356	Signal transduction
47621	gene_4324	MGGP01_red	0,8487	240 / 356	Transcription
86708	gene_817	MGGP01_red	0,8697	271 / 356	Signal transduction
84295	gene_10819	MGGP01_red	0,8846	291 / 356	Signal transduction
110369	gene_3078	MGGP01_red	0,8887	298 / 356	Transcription
60611	gene_2407	MGGP01_red	0,9344	344 / 356	Signal transduction
70309	gene_9304	MGGP01_red	0,9415	350 / 356	Signal transduction
34487	gene_2657	MGGP01_red	0,9710	355 / 356	Signal transduction
66273	gene_9648	MGGP01_red	0,9847	356 / 356	Signal transduction
95583	gene_2178	MGGP01_skyblue	0,7391	176 / 456	Signal transduction
31187	gene_6733	MGGP01_skyblue	0,8530	309 / 456	Transcription
111431	gene_1815	MGGP01_skyblue	0,9361	439 / 456	Signal transduction
93761	gene_3801	MGGP44_cyan	0,6735	21 / 224	Transcription
52472	gene_6919	MGGP44_cyan	0,7294	56 / 224	Signal transduction
92547	gene_5802	MGGP44_cyan	0,8292	135 / 224	Signal transduction
108657	gene_7540	MGGP44_cyan	0,8394	143 / 224	Signal transduction
57142	gene_9092	MGGP44_cyan	0,8620	166 / 224	Transcription
77247	gene_1282	MGGP44_cyan	0,8713	175 / 224	Signal transduction
93065	gene_2972	MGGP44_cyan	0,8787	179 / 224	Signal transduction

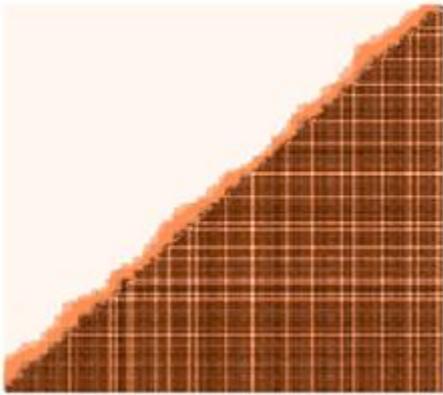
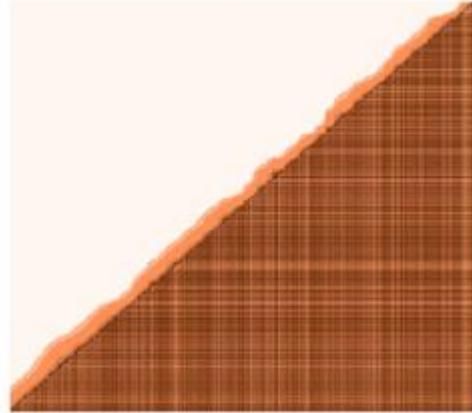
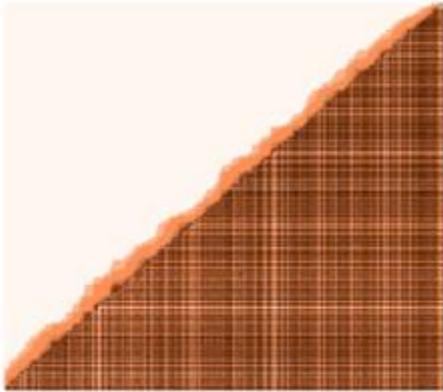
111192	gene_1442	MGGP44_cyan	0,8851	187 / 224	Signal transduction
105024	gene_27	MGGP44_grey60	0,6285	443 / 1509	Signal transduction
62864	gene_868	MGGP44_grey60	0,7034	672 / 1509	Signal transduction
65583	gene_7211	MGGP44_grey60	0,7244	767 / 1509	Transcription
43039	gene_7058	MGGP44_grey60	0,7707	949 / 1509	Transcription
32659	gene_9864	MGGP44_grey60	0,7829	1004 / 1509	Transcription
108064	gene_7068	MGGP44_grey60	0,8208	1162 / 1509	Transcription
74012	gene_4883	MGGP44_grey60	0,8414	1243 / 1509	Signal transduction
80821	gene_5349	MGGP44_grey60	0,8506	1276 / 1509	Signal transduction
36765	gene_5226	MGGP44_grey60	0,8513	1278 / 1509	Signal transduction
77753	gene_1619	MGGP44_grey60	0,8628	1319 / 1509	Transcription
102849	gene_10565	MGGP44_grey60	0,8687	1342 / 1509	Transcription
99181	gene_8278	MGGP44_grey60	0,8713	1354 / 1509	Signal transduction
66328	gene_9782	MGGP44_grey60	0,8757	1372 / 1509	Signal transduction
88606	gene_709	MGGP44_grey60	0,8803	1380 / 1509	Signal transduction
79543	gene_8841	MGGP44_grey60	0,9069	1438 / 1509	Transcription
63560	gene_2141	MGGP44_grey60	0,9322	1480 / 1509	Transcription
95797	gene_5348	MGGP44_grey60	0,9481	1497 / 1509	Signal transduction
36575	gene_4151	MGGP44_lightcyan	0,4007	95 / 1455	Signal transduction
106955	gene_6422	MGGP44_lightcyan	0,5008	187 / 1455	Signal transduction
109829	gene_4859	MGGP44_lightcyan	0,6936	547 / 1455	Transcription
89428	gene_9507	MGGP44_lightcyan	0,8009	835 / 1455	Signal transduction
42881	gene_4920	MGGP44_lightcyan	0,8269	921 / 1455	Signal transduction
67073	gene_10487	MGGP44_lightcyan	0,8293	932 / 1455	Transcription
50302	gene_5238	MGGP44_lightcyan	0,8801	1146 / 1455	Signal transduction
101572	gene_2954	MGGP44_lightcyan	0,8844	1164 / 1455	Signal transduction
70921	gene_4307	MGGP44_lightcyan	0,8877	1180 / 1455	Signal transduction
74796	gene_5093	MGGP44_lightcyan	0,8940	1210 / 1455	Signal transduction
28576	gene_6144	MGGP44_lightcyan	0,8983	1230 / 1455	Transcription
67977	gene_3903	MGGP44_lightcyan	0,8997	1234 / 1455	Signal transduction
37171	gene_7192	MGGP44_lightcyan	0,9065	1265 / 1455	Transcription
50100	gene_1575	MGGP44_lightcyan	0,9142	1295 / 1455	Signal transduction
65151	gene_4281	MGGP44_lightcyan	0,9304	1357 / 1455	Signal transduction

46584	gene_1507	MGGP44_lightcyan	0,9350	1374 / 1455	Signal transduction
88104	gene_5191	MGGP44_lightcyan	0,9357	1376 / 1455	Signal transduction
47390	gene_5057	MGGP44_lightcyan	0,9640	1435 / 1455	Transcription
69388	gene_2933	MGGP44_lightcyan	0,9699	1442 / 1455	Transcription
76018	gene_633	MGGP44_lightcyan	0,9701	1443 / 1455	Signal transduction

Additional File 10

Figure S11. Pairwise distance (bp) and pairwise connectivity between genes within each of the top 8 WGCNA modules. Above diagonale: distance between genes; Below diagonale: connectivity. Each graph summarises the relationship among gene for each of the 8 selected modules, named as follow: **A:** red, **B:** purple ; **C:** darkorange ; **D:** darkgreen ; **E:** skyblue, **F:** grey60 ; **G:** cyan ; **H:** lightcyan.





Additional File 11

Table S7. Gene counts according to their change of plasticity among the selection regimes, for the two genetic backgrounds (MGGP01 and MGGP44). (+) : gene expression level is greater at 23°C; (-): gene expression level is greater at 17°C; Four scenarios of plasticity change are given : Loss (plasticity is reduced compared to ancestral plasticity); Gain (plasticity is increased compared to ancestral plasticity); Remained same (plasticity level and direction are not different between evolved and ancestral); Remained same but reversed (plasticity level is not different but the direction is different).

Plasticity changes regarding to ancestral state				
MGGP01 lineage	Loss	Gain	Remained same	Remained but reversed
St17	211 (+) / 96 (-)	972 (+) / 975 (-)	155 (+) / 30 (-)	4 (+ → -) / 5 (- → +)
St23	245 (+) / 96 (-)	265 (+) / 184 (-)	124 (+) / 35 (-)	1 (+ → -) / 0 (- → +)
Fluc	330 (+) / 114 (-)	77 (+) / 45 (-)	41 (+) / 15 (-)	1 (+ → -) / 0 (- → +)
FluctBis	315 (+) / 109 (-)	129 (+) / 97 (-)	53 (+) / 21 (-)	2 (+ → -) / 1 (- → +)
MGGP44 lineage	Loss	Gain	Remained same	Remained but reversed
St17	194 (+) / 359 (-)	525 (+) / 221 (-)	74 (+) / 52 (-)	4 (+ → -) / 16 (- → +)
St23	197 (+) / 307 (-)	408 (+) / 297 (-)	75 (+) / 114 (-)	1 (+ → -) / 5 (- → +)
Fluc	183 (+) / 380 (-)	313 (+) / 125 (-)	88 (+) / 43 (-)	1 (+ → -) / 4 (- → +)
FluctBis	202 (+) / 380 (-)	255 (+) / 187 (-)	58 (+) / 39 (-)	2 (+ → -) / 8 (- → +)

3. CHAPITRE 2 : Estimation de la fitness relative des lignées évoluées soumises à différents régimes de température

3.1. Introduction

Tous les individus sont soumis à des environnements variables dans la nature. Comprendre comment se fait l'adaptation à un milieu changeant est donc une question essentielle en biologie évolutive. Dans ce cadre, mesurer la fitness des individus ayant spécifiquement évolué en conditions fluctuantes permet d'estimer les capacités adaptatives d'une espèce donnée, et notamment de déterminer si l'évolution en milieu changeant peut favoriser son adaptation.

Les apports d'expériences en laboratoire menées sur des micro-organismes ayant évolué dans des environnements variables sont passés en revue dans **Kassen 2002**. Intéressons-nous ici plus particulièrement au rôle des fluctuations de température dans l'adaptation à différents environnements. Une étude a montré que des populations d'*E. coli* avaient pu mettre en place, au cours de 2000 générations d'évolution dans un environnement où la température alternait quotidiennement entre 32°C et 42°C, une adaptation à ce type de fluctuations (gain de fitness moyen d'environ 10%) (**Bennett et al. 1992**). L'adaptation aux fluctuations s'était également accompagnée d'un gain de fitness à 37°C, mais celui-ci était d'ampleur moindre (6% environ, différence significative d'après l'article précité). Une étude ultérieure menée sur ces mêmes lignées a montré qu'elles présentaient également un gain de fitness significatif lorsque testées à chacune des deux températures auxquelles elles avaient été soumises alternativement : les gains de fitness s'élevaient à 20% à 42°C et à 4% à 32°C (**Leroi et al. 1994**). D'ailleurs, les auteurs de cette étude ont pu démontrer que c'est bien l'adaptation à chacune de ces deux températures individuellement (et non l'adaptation aux transitions de température en tant que telles) qui avait contribué à l'augmentation relative de la fitness des lignées en conditions de fluctuations. Ces études, dans la mesure où elles montrent que s'adapter à un environnement alternant entre différentes températures ne conduit pas nécessairement à une symétrie quant à la réponse présentée dans chacune des températures prises individuellement, soulignent l'importance : *i*). d'estimer de manière quantitative les gains de fitness à l'issue des expériences

d'évolution en laboratoire ; *ii*). de mesurer ces gains aussi dans des environnements vis-à-vis desquels les lignées évoluées sont naïves.

D'autres études ont été menées afin de comprendre l'impact de l'évolution en conditions de température fluctuante sur l'adaptation à divers environnements et toutes n'ont pas conclu à un effet significatif. Toujours chez *E. coli*, il a pu être montré que l'environnement dans lequel des populations avaient évolué lors des 2000 générations précédentes – les auteurs avaient testé trois environnements stables et un environnement fluctuant, tous plutôt chauds, de manière préalable – n'interagissait pas avec la mise en place d'une adaptation ultérieure à une température relativement basse (20°C) (**Bennett & Lenski 2007**). Enfin, une méta-analyse menée sur neuf espèces de bactéries a montré que l'évolution dans un régime alternant entre 20°C et 40°C n'avait pas spécifiquement permis – par rapport à une température stable de 30°C – de mieux tolérer des changements d'environnements (**Saarinen et al. 2018**).

Afin de mettre en évidence s'il y eu adaptation aux conditions expérimentales lors d'une évolution en laboratoire, il est nécessaire d'estimer la fitness des populations évoluées qui en sont issues. Plus précisément, plus que la fitness absolue, c'est la fitness relative des populations évoluées par rapport à une population de référence qui est ici importante (**Orr 2009**). La fitness relative tient en effet compte du fait que les différents génotypes présents au sein d'une population sont en compétition et que c'est bien la différence entre génotypes quant à leurs succès reproducteur – différence résumée par la fitness relative – qui dicte l'évolution de la population. En évolution expérimentale, la population de référence peut par exemple être une population ayant évolué en condition contrôle (**Burke et al. 2010**). Dans le cas de micro-organismes ayant la capacité de survivre à la congélation comme *Z. tritici*, la fitness est le plus souvent mesurée relativement à la population ancestrale fondatrice, maintenue au congélateur durant l'évolution (**Wiser & Lenski 2015**). Ceci permet alors de mesurer directement l'avantage acquis par les populations au cours de leur évolution, par rapport à l'état ancestral.

La fitness des micro-organismes se reproduisant par divisions cellulaires successives de manière asexuée est bien estimée par leur taux de croissance (**Orr 2009**). L'approche de comparaison des taux de croissance lors de tests de compétition entre lignées évoluées et ancestrales a beaucoup été utilisée en évolution expérimentale pour mesurer la fitness relative et aucune méthode alternative ne semble plus précise, d'après **Wiser & Lenski 2015**. Le plus souvent, de la variabilité génétique neutre (*i.e.* sans effet sur la fitness) mais aux conséquences phénotypiques visibles par l'expérimentateur est exploitée pour distinguer les génotypes en compétition: les populations ancestrales peuvent ainsi par exemple porter une mutation

permettant de métaboliser un certain substrat (tel que le tétrazolium arabinose) en un produit coloré (**Lenski et al. 1991**) ou encore être porteuses de protéines fluorescentes telle que la *Green Fluorescent Protein* (GFP) (**Dhar et al. 2013**).

De nombreuses études d'évolution expérimentale en conditions *in vitro* ont été menées sur des micro-organismes modèles. Chez ces derniers, les gains de fitness par rapport à la population fondatrice peuvent être assez variables selon les études mais sont en général de l'ordre de quelques dizaines de pourcents, et ceci même pour les expériences menées sur le long terme et impliquant plusieurs milliers de générations. Ainsi **Wiser et al. 2013** ont pu montrer qu'au bout de 50 000 générations et en moyenne sur 12 réplicas d'évolution à partir d'un même clone, la fitness relative des populations d'*E. coli* avait augmenté d'environ 70%. L'essentiel de cette adaptation s'est d'ailleurs réalisé lors des quelques premiers milliers de générations (avec un gain de 50% lors des seules 10 000 premières générations), et le ralentissement de l'adaptation observé s'explique principalement par les phénomènes d'interférence clonale et d'épistasie à effet cumulatif décroissant sur la fitness. Toujours chez *E. coli*, un gain de fitness d'environ 10% a été mesuré à l'issue de 460 générations de croissance en phase exponentielle (**Yi & Dean 2016**, Figure 2, Figure supplémentaire 2). Chez *S. cerevisiae*, différentes études ont reporté des gains de fitness de 60% en 300 générations d'évolution sur milieu simple à teneur limitée en glucose (**Goddard et al. 2005**) ; des gains de 30 % en un peu moins de 400 générations dans des conditions d'évolution similaires (**Kao & Sherlock 2008**) ; et enfin des gains de l'ordre de 10% en 500 générations d'évolution (**Desai et al. 2007**). En ce qui concerne les Eumycètes filamenteux, peu d'études d'évolution en laboratoire ont pour l'heure été publiées (**Fisher & Lang 2016**).

Le Chapitre 1 présentait l'évolution du transcriptome de *Z. tritici* en réponse à différentes conditions de température. Nous avons notamment observé que de nombreux gènes – dont certains interviennent dans les processus cytologiques et régulateurs impliqués dans la progression du cycle cellulaire – avaient vu leurs niveaux d'expression évoluer. De plus, l'effet du fond génétique à partir duquel était initiée l'évolution avait un impact important sur la façon dont le transcriptome des lignées de *Z. tritici* avait évolué selon les régimes, avec des différences particulièrement marquées vis-à-vis de la réponse aux conditions fluctuantes. Enfin, nous avons observé que les clones ancestraux ne présentaient pas le même nombre de gènes dont l'expression était plastique en réponse à des changements de température.

L'objectif est ici de mesurer, pour chacune des lignées évoluées analysées dans le Chapitre 1, leur fitness relative par rapport à leur ancêtre. Estimer cette fitness relative nous permettra de déterminer quelles sont les lignées dont le taux de croissance dans l'environnement d'évolution a significativement augmenté, et donc de savoir si l'évolution dans certains des régimes testés s'est accompagnée d'une adaptation au milieu de sélection. De plus, la mesure de la fitness relative dans les trois conditions testées lors de l'évolution expérimentale (17°C, 23°C, fluctuations thermiques) nous permettra également de décrire la fitness des lignées dans des conditions où elles n'ont pas évolué. Ce dernier point devrait nous renseigner sur la mise en place de compromis entre adaptation au régime auxquels les lignées ont été soumises et leurs performances dans des environnements présentant des profils de températures vis-à-vis desquels elles sont naïves. Les résultats empiriques quant à l'émergence de tels compromis adaptatifs sont contrastés (**Garland & Rose 2012**) et la généralisation semble difficile. Il a pu être montré par une approche d'évolution expérimentale que l'adaptation à 20°C chez *E. coli* s'accompagnait d'une diminution – par rapport à l'état ancestral – de la fitness à 40°C. Ce résultat est cependant global et parmi les 24 répliques (populations) ayant évolué à 20°C pris individuellement, seuls 15 montraient un tel compromis adaptatif (**Bennett & Lenski 2007**). De plus, aucune corrélation significative entre l'ampleur des gains de fitness à 20°C et celle des diminutions à 40°C n'a été observée. Notons que cette complexité et variabilité en termes d'émergence de compromis adaptatifs se retrouve pour d'autres paramètres abiotiques que la température, tels que l'acidité du milieu de culture comme cela a pu être démontré par **Hughes et al. 2007b**. Notre design expérimental nous permettra également de tester si l'évolution en conditions de fluctuations entre 17°C et 23°C a permis aux lignées de s'adapter à chacune de ces deux températures lorsqu'elle est maintenue constante. Ceci devrait donc *in fine* nous renseigner sur le fait que la variabilité environnementale puisse, comme cela a pu être proposé par ailleurs, favoriser l'évolution de phénotypes généralistes (**Gilchrist 1995 ; Kassen 2002**).

Dans le présent chapitre, nous chercherons donc à tester : *i*). si l'évolution dans les différentes conditions thermiques testées s'est accompagnée d'une augmentation de la fitness relative dans ces mêmes conditions ; *ii*). si des compromis adaptatifs se sont mis en place ; *iii*). si l'évolution en conditions fluctuantes a favorisé à l'adaptation à l'une ou l'autre (ou les deux) des températures.

3.2. Matériels et méthodes

3.2.1. Caractérisation préliminaire de la croissance des deux souches ancestrales

Les souches #MGGP01 et #MGGP44 sont cultivées durant six jours à 23°C dans 500 mL de *Potato Dextrose Broth* (PDB), dans une étuve sous agitation à 140 rpm (Infors HT, Inc.). La quantité d'inoculum initiale est ajustée à 10 millions de cellules par comptage manuel sous microscope à l'aide de cellules de Mallassez, à partir de cultures ayant été étalées sur boîtes de pétri contenant un milieu *Potato Dextrose Amidon* (PDA agar) 72h auparavant. Deux expériences de croissance sont menées (duplicas biologiques indépendants). Le but étant de vérifier que les populations sont encore en phase de croissance exponentielle après 6 jours de culture, nous privilégions pour cette vérification la température de 23°C, température à laquelle, *a priori*, les populations atteignent la phase stationnaire le plus rapidement. Pendant les cinq jours suivant l'inoculation, le nombre de cellules est dénombré sous microscope à l'aide d'une chambre de comptage (Kova® Glasstic® R Slide 10), avec comptage de trois prélèvements indépendants pour chaque culture. Pour chaque prélèvement (1 mL de suspension), le nombre de cellules présentes dans 11 µL est compté et la culture est agitée entre chaque prélèvement.

3.2.2. Transformation par ATMT (*Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation)

3.2.2.1. Matériel biologique

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisée – PYSKH4-GFP – contient un plasmide porteur de la séquence codante de la protéine GFP sous contrôle d'un promoteur constitutif de *Z. tritici* (Sidhu 2015). Ce plasmide porte également des gènes de résistance à deux antibiotiques (Rifampicine et Kanamycine), ainsi qu'à un composé possédant une action fongicide sur *Z. tritici*, la sulfonyleurée (chlorimuron-ethyl). La carte du plasmide est fournie en **Annexe 3**.

Les souches de *Z. tritici* utilisées lors de la transformation sont : IPO-323 (souche de référence, d'origine néerlandaise (Goodwin et al. 2011)), ainsi que #MGGP01 et #MGGP44 – deux souches provenant d'une même population et isolées en 2010 près de Toulouse (43° 53' N - 01° 48' W). Ces deux souches correspondent aux ancêtres à partir desquels l'évolution

expérimentale a été initiée (voir Chapitre 1). L'ensemble des souches est stocké à -80°C dans un milieu PDB glycérolé à 30%.

3.2.2.2. Culture de la souche *Agrobacterium tumefaciens* PYSKH4-GFP

La souche PYSKH4-GFP est cultivée deux jours à 28°C sur boîtes de pétri contenant le milieu de culture *Lysogeny Broth* (LB agar), en présence de Rifampicine à 100 µg/mL et de Kanamycine à 50 µg/mL. Une petite quantité d'agrobactéries est ensuite prélevée et inoculée dans un milieu liquide (milieu LB avec de la Rifampicine à 100 µg/mL et de la Kanamycine à 50 µg/mL). Les bactéries sont cultivées dans ce milieu (28°C, 200 rpm) pendant 16h avant la transformation.

3.2.2.3. Culture des souches de *Z. tritici* à transformer

Les clones ancestraux #MGGP01 et #MGGP44 ainsi que la souche IPO-323 sont cultivés sur boîtes de pétri sur le milieu *Yeast Potato Dextrose* (YPD agar) à 18°C pendant 5 jours.

3.2.2.4. Transformation des souches de *Z. tritici* par *A. tumefaciens*

Les cultures liquides d'*A. tumefaciens* sont centrifugées (4000 rpm, 5 min), le surnageant éliminé et les culots cellulaires repris dans 30 mL de milieu d'induction (MI, voir composition en **Annexe 4**) contenant de la Kanamycine à 50 µg/mL et de l'acétosyringone à 40 µg/mL. La concentration de cette suspension est ajustée par dilution afin d'obtenir une densité optique de 0,4 (lecture avec le spectrophotomètre *WPA CO 8000 Biowave Cell Density Meter*).

Le contenu de chacune des boîtes contenant les cultures solides de *Z. tritici* est dilué dans 3 mL de MI en présence de Kanamycine à 50 µg/mL et d'acétosyringone à 40 µg/mL. Des suspensions concentrées à 10⁷ cellules par mL sont obtenues par dénombrement sous microscope à l'aide d'une chambre de comptage (Kova® Glasstic® R Slide 10).

Trois mélanges par souche de *Z. tritici* à transformer sont réalisés comme suit :

- 1 mL de suspension de la souche considérée + 100 µL de la suspension d'agrobactéries PYSKH4-GFP

- 1 mL de suspension de la souche considérée + 200 µL de la suspension d'agrobactéries PYSKH4-GFP

- 1 mL de suspension de la souche considérée + 500 µL de la suspension d'agrobactéries PYSKH4-GFP

Ces différents mélanges (trois par souche de *Z. tritici*) sont déposés et étalés directement sur des cellophanes recouvrant des boîtes de MI contenant de l'agar, de la Kanamycine (50 µg/mL), et de l'acétosyringone (40 µg/mL). Différents contrôles sont réalisés : boîtes MI agar avec 1 mL de souches de *Z. tritici* seules ; boîte MI agar avec 500 µL d'agrobactéries seules ; boîte MI agar non inoculée recouverte de cellophane ; boîte MI agar non inoculée sans cellophane. L'ensemble des boîtes est incubé à 18°C pendant 48h. Durant ce laps de temps, l'acétosyringone active les gènes de virulence d'*A. tumefaciens* et favorise donc l'insertion du plasmide dans le génome des souches de *Z. tritici* à transformer.

3.2.2.5. Sélection des transformants potentiels et isolement de clones

Après 48h à 18°C, les cellophanes sont transférées sur des boîtes de pétri contenant du milieu minimum (MM, voir composition en **Annexe 5**) complété avec trois antibiotiques – Cefotaxime (250 µg/mL), Streptomycine (100 µg/mL) et Ampicilline (100 µg/mL) – ainsi qu'avec de la sulfonylurée (10 µg/mL). Après 21 jours à 18°C, les transformants potentiels apparaissent. Parmi eux, ceux qui expriment la GFP après contrôle visuel sous stéréomicroscope (*Leica MZI6 F Fluorescence Stereomicroscope*) sont prélevés des cellophanes et transférés sur boîte de pétri contenant MM, en présence de Cefotaxime (250 µg/mL), de Streptomycine (100 µg/mL), d'Ampicilline (100 µg/mL) et de sulfonylurée (10 µg/mL). Après une semaine à 18°C, ces transformants potentiels sont isolés par deux fois sous forme de clones.

3.2.2.6. Validation par PCR de la présence de la GFP dans le génome de deux transformants

Pour chacune des souches ayant servis d'ancêtre à l'expérience d'évolution *in vitro* (#MGGP01 et #MGGP44), la présence de la GFP dans le génome est vérifiée par PCR dans un des transformant stockés (appelés respectivement #MGGP01-GFP et #MGGP44-GFP par la

suite). Les amorces utilisées pour amplifier spécifiquement une partie de la séquence codante de la GFP sont les suivantes : 5' ACCCTCGTGACCACCCTGACCTAC 3' et 5' GGACCATGTGATCGCGCTTCTCGT 3'. Les conditions de réaction sont les suivantes : 2 min à 94°C puis 25 cycles comme suit : 30 sec à 94°C (dénaturation de l'ADN), 30 sec à 65°C (hybridation des amorces) et 40 sec à 72°C (élongation). A l'issue de ces cycles, une étape de 5 min à 72°C a été ajoutée.

3.2.3. Mesure de la fitness relative par test de compétition

3.2.3.1. Souches de *Z. tritici*

Les tests de compétition sont réalisés avec les « lignées test » #MGGP01-GFP et #MGGP44-GFP mentionnées au paragraphe ci-dessus. Pour chacun des deux fonds génétiques, la croissance en compétition des cinq lignées suivantes est caractérisée : la souche ancêtre, une lignée ayant évolué à 17°C, une lignée ayant évolué à 23°C et deux lignées ayant évolué dans un environnement où la température alternait entre 17°C et 23°C toutes les 60 heures environ (*i.e.* lignées RNA-séquencées dont l'analyse transcriptomique est présentée au Chapitre 1). Les noms correspondants aux lignées évoluées sont fournis en **Annexe 6**.

3.2.3.2. Conditions de croissance

1/ Pré-culture

Avant les tests de compétition, une étape de « pré-culture » sur milieu PDA est réalisée. Cette première phase de multiplication *in vitro* a pour objectif de s'affranchir d'éventuelles différences de survie entre lignées, dues à la décongélation des stocks glycérolés.

2/ Conditions d'estimation de la fitness relative

Chaque lignée (ancêtres inclus) est co-inoculée avec l'ancêtre GFP-transformé de fond génétique correspondant, dans une proportion 50/50, dans 500 mL de milieu PDB (même volume et même milieu de culture que lors de l'évolution expérimentale). Le nombre de cellules inoculées initialement est dénombré au microscope à l'aide d'une chambre de comptage

(Kova® Glasstic® R Slide 10), à partir de deux comptages répétés pour trois prélèvements indépendants.

Après co-inoculation, les cultures liquides sont mises dans une étuve (Infors HT, Inc.) et agitées à 140 rpm pendant cinq jours. Trois environnements thermiques sont testés afin d'estimer la fitness relative des lignées évoluées : à 17°C constant, à 23°C constant et lors d'alternances entre 17°C et 23°C (conduisant à quatre changements de température sur la durée du test). A l'exception de la durée des fluctuations de température, dont la fréquence a été réduite à 24h pour des raisons de faisabilité, les autres paramètres sont identiques à ceux utilisés lors de l'évolution expérimentale.

Pour chacune des trois conditions testées, quatre répétitions indépendantes sont réalisées et l'ordre des douze expériences est randomisé. Pour une même répétition, l'ensemble des lignées en compétition est placé dans les mêmes conditions (*i.e.* même agitateur Infors), avec la même quantité de cellules initialement introduites. En revanche, selon les expériences, la quantité de cellules inoculées dans les 500 mL de PDB a varié entre 8 et 20 millions. Ce nombre de cellules correspond à la quantité inoculée de chacun des géotypes en compétition (lignée à tester et ancêtre GFP-transformé).

Parmi les quatre répétitions réalisées en environnement fluctuant, deux sont initiées à 17°C (cycle : 17°C → 23°C → 17°C → 23°C → 17°C) et deux sont initiées à 23°C (cycle : 23°C → 17°C → 23°C → 17°C → 23°C).

Des tests visuels d'éventuelles contaminations bactériennes étaient réalisés pour chaque culture, en étalant sur boîtes de pétri un petit volume de la suspension fongique à l'issue des tests de fitness (voir **Annexe 7A**).

3.2.3.3. Acquisition des images par microscopie à épifluorescence

1/ Préparation des échantillons

Après les cinq jours de culture, quatre aliquots indépendants de 2 mL sont prélevés de chacune des co-cultures, avec agitation entre chaque prélèvement. A partir de chaque aliquot, 10 µL sont placés entre lame et lamelle, en présence d'1 µL de calcofluor-blanc (*18909 CalcofluorWhite Stain 1g/L, Sigma-Aldrich*) pré-dilué au 1/1000^{ème}. Ce colorant est utilisé afin de révéler toutes les cellules fongiques, dont la paroi devient visible en présence d'ultra-violets (le calcofluor-blanc se lie aux polysaccharides de la chitine présents dans la paroi fongique).

2/ Prise d'images au microscope à épifluorescence

Alors que seules les cellules GFP-transformées sont visibles à la longueur d'onde excitant la GFP, le calcofluor-blanc révèle la totalité des cellules dans la co-culture (qu'elles expriment la GFP ou non). Un microscope à épifluorescence (*Leica DM5500 B research microscope*) est utilisé pour photographier les cellules : celles exprimant la GFP (i.e. les ancêtres transformés) sont révélées via l'utilisation d'un laser de longueur d'onde $\lambda = 475$ nm (lumière bleue) et celles ayant incorporé le colorant calcofluor-blanc (i.e. l'ensemble des cellules présentes dans la préparation) via un laser de longueur d'onde $\lambda = 355$ nm (UV). A partir des 10 μ L de chacun des aliquots prélevés, cinq paires de photographies sont réalisées, l'une révélant la GFP et l'autre le calcofluor-blanc. Ainsi, pour chaque test de compétition, la fitness relative de chacune des lignées est estimée à partir de 20 paires de photographies de la co-culture correspondante.

L'**Annexe 7B** schématise le protocole permettant de distinguer, à l'issue de cinq jours de culture post co-inoculation à 50/50, les génotypes en compétition dans l'Erlenmeyer.

Connaissant le champ des photographies (621 μ m x 466 μ m) et sachant qu'il y a 10 μ L sous les lamelles de 20 mm x 20 mm utilisées, le volume correspondant à chaque photographie est de $7,235 \cdot 10^{-3}$ μ L. Ainsi, les 20 photographies prises à l'issue de chaque test de compétition pour chacune des lignées représentent environ $2 \cdot 10^{-5}$ % du volume total de la culture utilisée lors des tests de fitness. Le nombre moyen de cellules par photographie, toutes répétitions confondues, est de 237 (voir **Annexe 8**).

3.2.3.4. Dénombrement des cellules assisté par ImageJ

Afin de compter le nombre de cellules présentes sur chaque photographie, nous utilisons le logiciel ImageJ (**Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018**) et créons un plugin personnalisé. Ce dernier, dont le code (en *ImageJ Macro Language*) est fourni en **Annexe 9**, comprend trois étapes principales : *i*). la soustraction des pixels correspondants à la couleur de l'arrière fond de l'image ; *ii*). la définition d'un seuil basé sur l'intensité du pixel le plus faible qui sera considéré ; *iii*). la définition de gammes caractérisant la géométrie de l'objet à quantifier. Seule la deuxième étape a nécessité de spécifier les paramètres légèrement différemment selon que la photographie considérée ait été prise à la longueur d'onde excitant la GFP ou à celle excitant le

calcofluor-blanc, les cellules ne présentant pas le même niveau d'intensité à ces deux longueurs d'onde (intensité plus forte pour le calcofluor-blanc).

3.2.3.5. Estimation du taux de croissance exponentielle

La dynamique temporelle de croissance d'une population de cellules en phase exponentielle est modélisée par : $N(t) = N(0) \cdot e^{m \cdot t}$, avec m le taux de croissance de la population considérée.

Le taux de croissance, homogène à un temps⁻¹, s'obtient donc de la façon suivante:

$$m = 1/t \cdot [\ln(N(t) / N(0))]$$

3.2.3.6. Estimation de la fitness relative

Nous suivons ici la procédure présentée par **Dhar et al. 2013**.

Considérons les indices suivants :

- a fait référence aux souches ancestrales non-transformées, vis-à-vis desquelles nous cherchons à comparer la fitness des lignées évoluées
- e fait référence aux lignées évoluées dont nous cherchons à mesurer la fitness relative
- r fait référence aux souches ancestrales transformées pour exprimer la GFP (#MGGP01-GFP et #MGGP44-GFP). Ces dernières sont co-inoculées dans chaque culture et constituent nos lignées tests vis-à-vis desquelles l'ensemble des souches (évoluées ou ancestrales) est mis en compétition

Le taux de croissance d'une population en compétition est:

$$N(t)_i = N(0)_i \cdot e^{m_i \cdot t} \quad (Eq. 1)$$

Pour estimer la différence entre le taux de croissance m_i d'une souche donnée ($i = e$ ou a) et le taux de croissance m_r de la lignée test (*i.e.* GFP) correspondante avec laquelle elle est en compétition, nous reprenons l'équation (1) :

$N(t)_i / N(t)_r = e^{(m_i - m_r)t}$ (les $N(0)$ se simplifient car la même quantité initiale de souche i et de souche r est initialement inoculée)

$$m_i - m_r = 1/t \cdot [\ln(N(t)_i / N(t)_r)] \quad (Eq. 2)$$

Finalement nous obtenons, respectivement pour les lignées évoluées et ancestrales non-transformées, les deux équations suivantes permettant de comparer leurs taux de croissance à celui de la lignée test vis-à-vis de laquelle elles sont en compétition :

$$m_e - m_r = 1/t \cdot [\ln(N(t)_e / N(t)_r)] \quad (Eq. 3)$$

$$m_a - m_r = 1/t \cdot [\ln(N(t)_a / N(t)_r)] \quad (Eq. 4)$$

La différence entre les taux de croissance m_e d'une lignée évoluée et m_a de l'ancêtre non-transformé dont elle dérive (qui est *in fine* ce qui nous intéresse) s'obtient en soustrayant les équations (3) et (4) :

$$m_e - m_a = (m_e - m_r) - (m_a - m_r)$$

$$m_e - m_a = 1/t \cdot [\ln(N(t)_e / N(t)_r) - \ln(N(t)_a / N(t)_r)]$$

$$m_e - m_a = 1/t \cdot [\ln(N(t)_e / N(t)_a)] \quad (Eq. 5)$$

La fitness relative w de la lignée e par rapport à son ancêtre a s'obtient en divisant l'équation (5) par m_a , qui d'après l'équation (1) vaut : $1/t \cdot [\ln(N(t)_a / N(0)_a)]$.

Ainsi, finalement :

$$w = \frac{(m_e - m_a)}{m_a}$$

D'où l'équation suivante permettant d'estimer la fitness relative de e par rapport à a :

$$w = \frac{\ln(N(t)_e / N(t)_a)}{\ln(N(t)_a / N(0)_a)} \quad (\text{Eq. 6})$$

La fitness relative est équivalente au gain de fitness acquis – par rapport à l’ancêtre dont elle dérive – par une lignée lors de son évolution.

Les nombres $N(t)$ utilisés font référence aux nombres de cellules non GFP-transformées, obtenus par soustraction du nombre de cellules exprimant la GFP de celui correspondant aux cellules colorées au calcofluor-blanc. Les valeurs utilisées pour les différents membres de l’équation (6) suivent la logique suivante, permettant – pour les points *i*) et *ii*) – de tenir compte de l’effet « Répétition » que présente la croissance des ancêtres :

i). Le dénominateur de (Eq. 6) est remplacé par sa valeur moyenne obtenue sur les 20 photographies pour chacune des 12 répétitions ayant testé *a* versus *r*. Par répétition et par ancêtre (#MGGP01 et #MGGP44), nous avons donc une valeur moyenne :

$$\overline{\ln(N(t)_a / N(0)_a)}$$

ii). Concernant le numérateur, $N(t)_a$ est également remplacé par sa valeur moyenne obtenue sur les 20 photographies pour chacune des 12 répétitions ayant testée *a* versus *r*. Par répétition et par ancêtre (#MGGP01 et #MGGP44), nous avons donc une valeur moyenne :

$$\overline{N(t)_a}$$

iii). Enfin, pour chacune des 12 répétitions, les 20 valeurs $N(t)_e$ obtenues pour la lignée évoluée *e* considérée en compétition avec *r* sont utilisées

3.2.4. Estimation de la taille des cellules

Le plugin ImageJ utilisé permet de quantifier la surface totale des cellules comptabilisées (surface mise en évidence au-dessus de l’arrière-fond de l’image). Ainsi, pour chaque paire de photographies, nous obtenons la surface correspondante aux cellules exprimant la GFP et celle, identifiée par calcofluor-blanc, correspondante à l’ensemble des cellules présentes dans la co-culture (ancêtre-GFP et lignée testée en compétition).

La taille des cellules, qu'elles soient issues de populations ancestrales ou évoluées, a été calculée grâce à la formule suivante :

$$\text{Taille} = \frac{\text{Surface calcofluor} - \text{Surface GFP}}{\text{Nombre cellules calcofluor} - \text{Nombre cellules GFP}}$$

3.2.5. Analyses statistiques

Toutes les analyses ont été réalisées avec le logiciel R (*R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <https://www.R-project.org/>*). La version utilisée est la version 3.4.1 (20/06/2017).

3.2.5.1. Régressions linéaires

1/ Estimation de l'adéquation de la croissance des populations ancestrales avec une croissance exponentielle

Avec la quantité initiale inoculée lors des tests préliminaires, nous disposons d'une cinétique à 6 points au long de laquelle la croissance des ancêtres #MGGP01 et #MGP44 à 23°C a pu être suivie. Pour vérifier l'adéquation des données de croissance à une loi exponentielle, le nombre de cellules est log-transformé (logarithme népérien) et nous réalisons une régression linéaire de type : $\text{Ln}(\text{Nombre cellules}) = f(t)$. Le R^2 -ajusté de la droite de régression permet de mesurer cette adéquation : sur une échelle logarithmique, une croissance exponentielle devient représentée par une droite. L'intervalle de confiance à 95% est calculé avec la fonction *stat_smooth* de R.

2/ Estimation de l'effet de la quantité de cellules initialement inoculées

Pour les n=12 tests de compétition menés sur chacune des populations ancestrales, une régression du nombre de cellules atteint à l'issue des cinq jours de culture sur la quantité initialement introduite en début d'expérience est réalisée. Les résultats de significativité des tests de Student testant la nullité de la pente sont exploités, afin de déterminer si les variations d'inoculum entre expériences influençaient la quantité dénombrée à la fin des expériences.

3/ Lien entre fitness relative des lignées et taille des spores

L'existence d'un lien statistique entre fitness des différentes lignées (moyennées sur l'ensemble des n=12 expériences, toutes conditions thermiques testées confondues) et taille moyenne des spores produites dans ces mêmes conditions a été menée par régression linéaire. Par définition, les souches ancestrales se sont vues assigner une fitness relative nulle. Le résultat de significativité du test de Student testant la nullité de la pente a été exploité pour conclure à l'existence d'une relation entre fitness relative et taille des spores. De plus, un test de coefficient de corrélation de Pearson (fonction *corr.test* de R) est réalisé afin d'estimer quantitativement la corrélation linéaire entre nos deux variables. Le R²-ajusté de la droite de régression permet notamment d'évaluer à quel point la connaissance d'une des deux variables permet de prédire l'autre de manière précise.

3.2.5.2. Comparaisons des taux de croissance des deux ancêtres à partir des données obtenues lors des tests de compétition

Les taux de croissance (en jour⁻¹) ont été utilisés pour comparer de manière globale (*i.e.* sur les n=12 répétitions réalisées) le comportement des deux populations ancestrales l'une par rapport à l'autre et également afin de comparer, ancêtre par ancêtre, la croissance présentée par chacun d'eux en fonction des trois conditions environnementales testées (17°C, 23°C, fluctuations ; n=4 pour chacune de ces conditions). Les comparaisons ont été effectuées à l'aide d'une ANOVA à un facteur suivie, si nécessaire, de comparaisons multiples ajustées par la méthode de Tukey.

3.2.5.3. Fitness relative des lignées évoluées

A l'aide du package *nlme* de R (*Non-linear Mixed Effects models*), les données de fitness relative, notée Y, ont été modélisées grâce au modèle mixte suivant :

$$Y_{ijk} = \mu + L_i + C_j + (L:C)_{i:j} + (I|Exp_k) + \varepsilon_{ijk}$$

Dans ce modèle, un effet fixe (noté L_i) correspondant à la lignée évoluée considérée a été modélisé avec i=8 modalités différentes (*i.e.* autant que de lignées évoluées : MGGP01_Stable17 ; MGGP01_Stable23 ; MGGP01_12F ; MGGP01_13F ;

MGGP44_Stable17 ; MGGP44_Stable23 ; MGGP44_441F ; MGGP44_443F). Un autre effet fixe (noté C_j), correspondant aux conditions dans lesquelles était testée la fitness, est également pris en compte ($j=3$ modalités : 17°C, 23°C et conditions fluctuantes). Le modèle est équilibré puisque chacune des lignées a été testée sur quatre expériences de compétition par conditions ($n=4$ en condition 17°C, $n=4$ en condition 23°C, $n=4$ en conditions fluctuantes). Ainsi, pour chaque combinaison {Lignée $_i$ x Condition $_j$ }, l'estimation de fitness relative de la lignée i dans la condition j a été réalisée à partir de 4 x 20 photographies, soit un total de 80 valeurs Y_{ijk} . Un terme d'interaction entre les deux effets fixes est inclus. Enfin, un effet aléatoire – indiqué en *italique* – est utilisé pour modéliser l'effet « Expérience » ($k=12$ expériences indépendantes réalisées).

Le package R *multcomp* a été utilisé afin de tester la significativité des gains (ou pertes) de fitness en comparant la fitness relative des lignées évoluées à la valeur ancestrale (*i.e.* zéro par définition). De manière indépendante pour les deux fonds génétiques, les 12 contrastes statistiques (4 lignées évoluées, chacune testées dans 3 conditions) ont été implémentés manuellement d'après les coefficients du modèle et testés tous ensemble, avec une correction pour tests multiples de type *False Discovery Rate* à 5%.

Des tests ont également été réalisés afin de comparer les valeurs de fitness relative présentées par une même lignée évoluée dans les trois conditions testées. Cette approche est complémentaire de la précédente car elle permet de tester un différentiel de fitness relative, ce que ne permettaient pas les contrastes mentionnés ci-dessus, qui indiquaient uniquement si oui ou non la fitness par rapport à l'ancêtre avait changé significativement. Là encore, de manière indépendante pour les deux fonds génétiques, les 12 contrastes (3 par lignée évoluée de même fond génétique) ont été implémentés manuellement d'après les coefficients du modèle et testés tous ensemble, avec une correction pour tests multiples de type FDR à 5%.

Enfin, les valeurs de densité de cellules atteintes à l'issue des tests de compétition sont présentées pour chaque lignée (évoluées et ancêtres), afin d'obtenir un aperçu direct des conséquences des différences de fitness entre lignées, en termes d'effectif au bout de cinq jours de culture. Dans chacun des trois environnements testés, un test de Kruskal-Wallis (fonction *kruskal.test* de R) a été réalisé afin de déterminer l'effet « Lignée » (10 lignées au total : ancêtres #MGGP01 et #MGGP44 et 4 lignées évoluées issues de chacun). Dans chacun de ces

environnements, les comparaisons deux à deux entre lignées ont été réalisées avec la fonction *wilcox.test* de R suivi d'une correction de Holm.

3.2.5.4. Estimation des fitness relatives sur l'ensemble des tests de compétition, toutes conditions confondues

A l'aide du package *nlme* de R, les données de fitness relative estimées pour les différentes lignées évoluées ont été modélisées grâce au modèle mixte suivant :

$$Y_{ij} = \mu + L_i + (I|Exp_j) + \varepsilon_{ij}$$

Dans ce modèle, un effet fixe noté L_i correspondant à la lignée considérée a été modélisé, avec $i=8$ modalités différentes (*i.e.* autant que de lignées évoluées : MGGP01_Stable17 ; MGGP01_Stable23 ; MGGP01_12F ; MGGP01_13F ; MGGP44_Stable17 ; MGGP44_Stable23 ; MGGP44_441F ; MGGP44_443F). Sous chacune de ces modalités étaient regroupées les données obtenues sur l'ensemble des $n=12$ expériences de compétition réalisées au total par lignée (les données de fitness sont donc regroupées ici quelles que soient les conditions dans lesquelles a été mesurée la fitness lors du test). Le modèle est équilibré puisque toutes les lignées ont été mesurées lors des 12 répétitions. Ainsi, pour chaque des i lignées, l'estimation de fitness a été réalisée à partir 240 photographies. Enfin, un effet aléatoire – indiqué en *italique* – est utilisé pour modéliser l'effet « Expérience » ($j=12$ expériences indépendantes réalisées).

Le package R *multcomp* a été utilisé afin de tester si la fitness de chacune des lignées évoluées avait significativement changé lors de l'évolution par rapport à l'état ancestral et afin de tester les différences de fitness relative observées entre lignées évoluées dérivant d'un même ancêtre. Les contrastes statistiques pour ces 20 comparaisons (pour chaque fond génétique, 4 mesures de fitness relative par rapport à l'ancêtre et 6 comparaisons entre paires de lignées évoluées) ont été implémentés manuellement d'après les coefficients du modèle et testés tous ensemble, avec une correction pour tests multiples de type FDR à 5%.

3.2.5.5. Taille des cellules produites par les différentes lignées

La comparaison des tailles de spores produites par les différentes lignées a été menée à partir d'un modèle d'ANOVA à un facteur, comme suit :

$$S_{ij} = \mu + L_i + \varepsilon_{ij},$$

avec S la variable « Taille » à expliquer (*Size*) et L_i l'effet de la lignée considérée ($i=10$ modalités : MGGP01_Anc ; MGGP01_Stable17 ; MGGP01_Stable23 ; MGGP01_12F ; MGGP01_13F ; MGGP44_Anc ; MGGP44_Stable17 ; MGGP44_Stable23 ; MGGP44_441F ; MGGP44_443F). Le modèle est équilibré car pour chacune des 10 lignées, $j=12$ expériences indépendantes ont été réalisées.

La fonction *pairwise.t.test* de R a été utilisée afin d'effectuer l'ensemble de comparaisons. Les p-values ont été corrigées à 5% par la méthode FDR et nous reportons uniquement celles correspondantes aux comparaisons entre lignées de même fond génétique.

3.3.Résultats

3.3.1. Vérification préliminaire de la croissance exponentielle des deux souches ancestrales

Dans un premier temps, nous avons cherché à vérifier que les conditions et la durée des tests de fitness grâce auxquels nous allons estimer la fitness relative des différentes lignées correspondaient bien à la période de croissance exponentielle des populations. La cinétique de croissance des deux populations ancestrales est illustrée sur les panneaux **A** et **B** de la **Figure 1**. Les panneaux **C** et **D** montrent les données de comptage log-transformées en fonction du temps. L'analyse par régression linéaire du logarithme de la quantité de cellules révèle que la dynamique de croissance des deux populations ancestrales est bien expliquée par une croissance exponentielle, avec des valeurs de R^2 supérieures à 0.75 dans les deux fonds génétiques. L'adéquation à une croissance exponentielle est meilleure pour #MGGP01 que pour #MGGP44. Les équations des droites de régressions estimées sont, respectivement pour ces deux ancêtres, de : $Y = 1,539 * X + 1,284$ ($P < 0.0001$ pour la pente) et $Y = 1,457 * X + 2,312$ ($P = 0.0002$ pour la pente).

Notons que cette analyse préliminaire n'est basée que sur deux réplicas et cherchait simplement à vérifier le caractère exponentiel de la croissance des souches ancêtres seules, et non pas lorsqu'elles sont mises en compétition avec la lignée ancêtre exprimant la protéine GFP comme cela est le cas lors des tests de fitness.

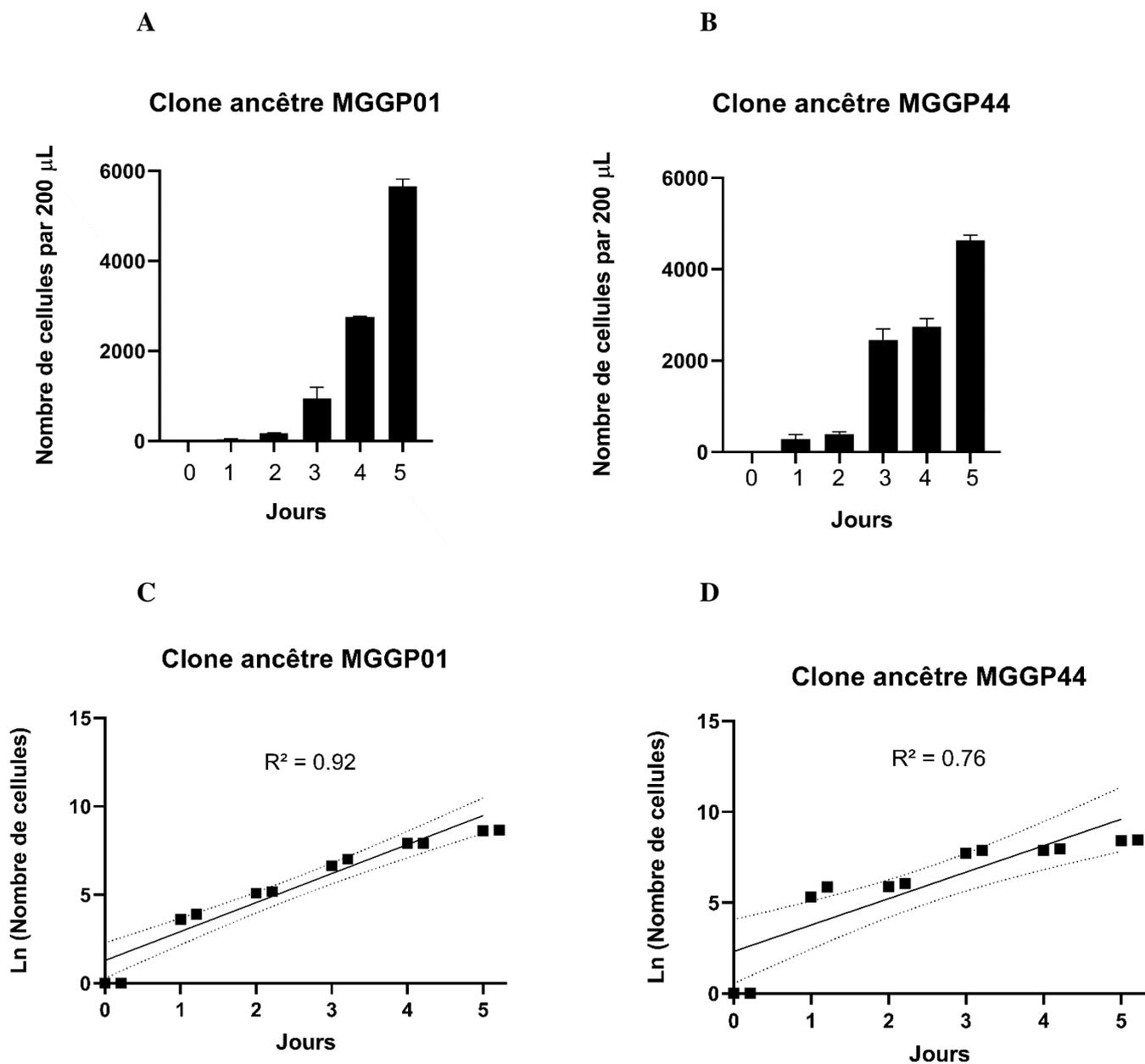


Figure II. 1 - Suivi de la dynamique de croissance des deux populations ancestrales sur six jours de culture à 23°C

Pour chacun des deux clones ancestraux, deux répliques biologiques indépendants ont été réalisés. Les panneaux **A** et **B** montrent, respectivement pour les clones ancêtres #MGGP01 et #MGGP44, l'évolution de la densité de cellules au cours du temps. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type. Au-dessous, les panneaux **C** et **D** montrent les données de comptage log-transformées. La droite correspond à la droite de régression estimée par la méthode des moindres carrés. L'enveloppe en pointillés correspond à l'intervalle de confiance à 95%.

3.3.2. Effet de la densité initialement inoculée sur le nombre final de cellules

Selon les tests de compétition, la quantité de cellules inoculées dans les 500 mL de PDB a varié entre 8 et 20 millions (voir *Matériels et Méthodes*). Pour les n=12 expériences réalisées au total, le nombre de cellules à l'issue des cinq jours de culture est représenté sur la **Figure 2**, pour les deux populations ancestrales, en fonction de la densité à laquelle elles avaient été inoculées.

Les régressions linéaires réalisées dans chacun des deux cas (ancêtres #MGGP01 et #MGGP44) montrent que la quantité de cellules obtenue à la fin des expériences n'est pas significativement liée à la quantité des cellules initialement introduites dans l'Erlenmeyer : les p-values des tests de nullité des pentes valent, respectivement, $P = 0.62$ et $P = 0.21$.

3.3.3. Croissance des ancêtres à partir des données obtenues lors des tests de fitness

La **Figure 3** présente les taux de croissance des souches ancestrales, estimés lors des tests de compétition. D'après les résultats obtenus sur l'ensemble des n=12 tests réalisés, le clone #MGGP44 présente un taux de croissance significativement supérieur à #MGGP01 (*unpaired t.test*, $P < 0.0001$) (**panneau A**). Si l'on s'intéresse au taux de croissance des deux clones ancestraux dans chacune des trois conditions environnementales testées, nous observons que ces dernières n'ont pas d'effet significatif sur la croissance de #MGGP01 (*F-test* : $P = 0.158$, **panneau B**) mais qu'elles en présentent un sur la croissance de #MGGP44 (*F-test* : $P < 0.0001$). Pour ce clone, le taux de croissance en conditions de fluctuations est significativement plus fort qu'aux deux conditions stables (les deux $P < 0.0001$, *Tukey's multiple comparisons test*, **panneau C**).

Ainsi, avant même le commencement de l'évolution expérimentale, nos deux isolats ancestraux de *Z. tritici* ne présentaient pas la même réponse aux fluctuations de température. D'ailleurs, nous noterons que la différence de croissance en conditions de fluctuations est assez élevée entre les deux populations ancestrales, puisque s'élève à 0.3 divisions par jour.

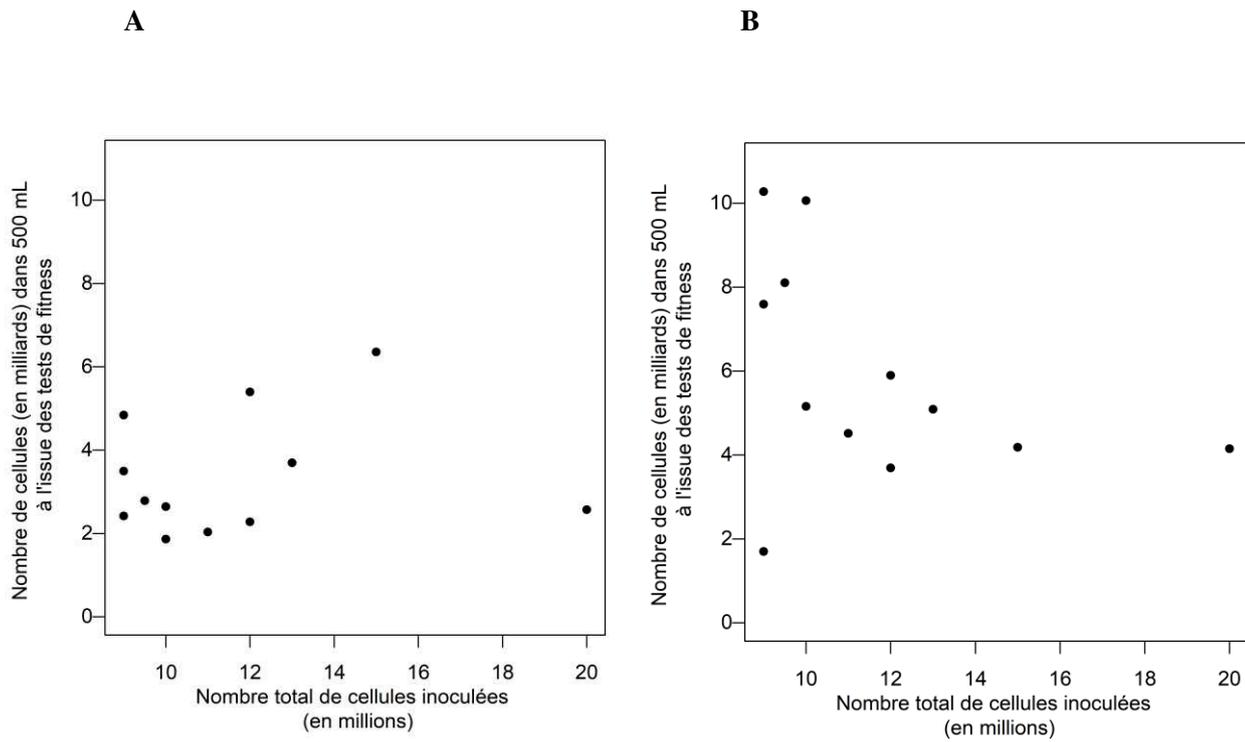


Figure II. 2 - Densité finale atteinte par les populations ancestrales lors des tests de compétition en fonction de la quantité initialement inoculée

A : données de comptage obtenues pour #MGGP01 ; **B** : données de comptage obtenues pour #MGGP44.

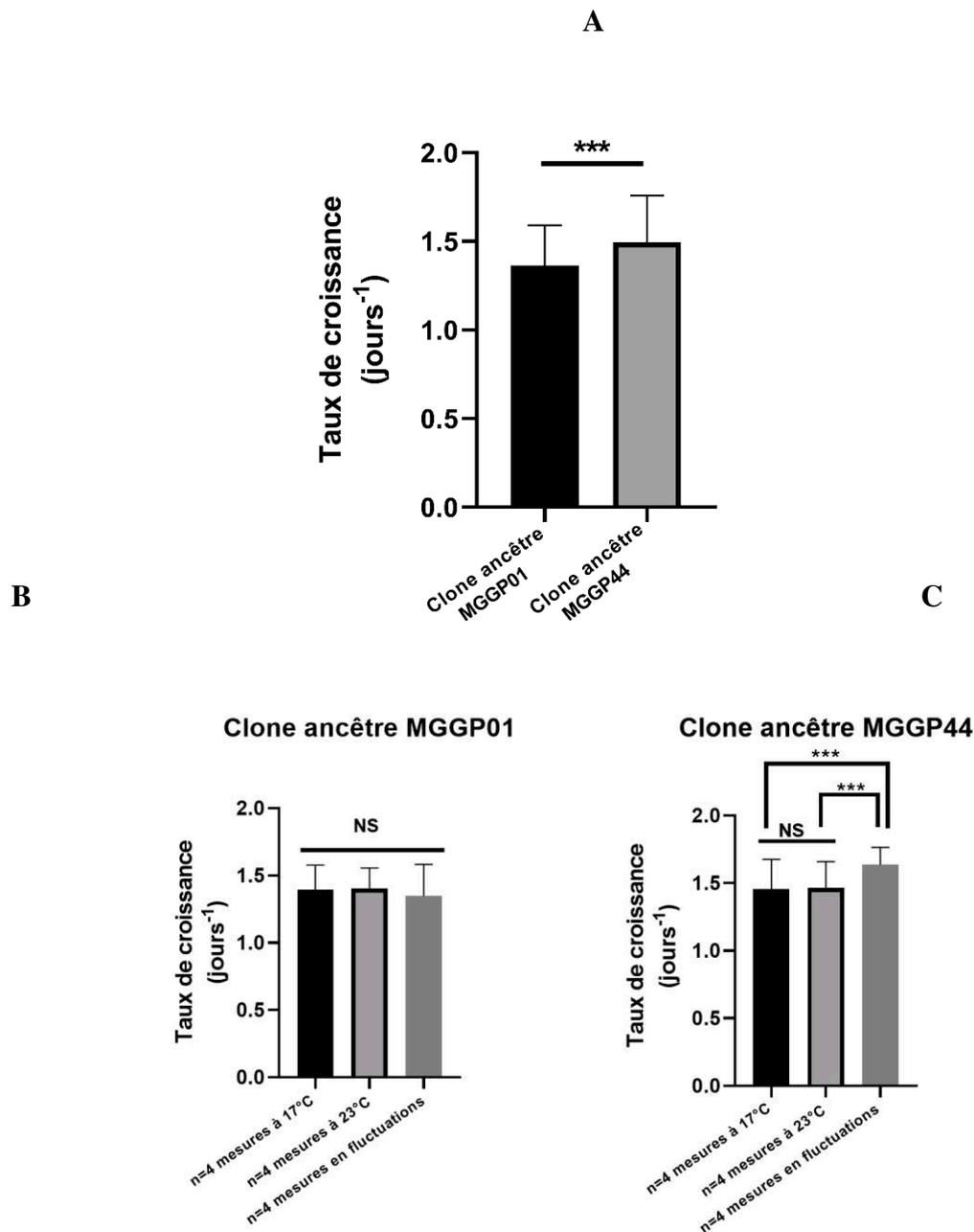


Figure II. 3 - Taux de croissance des deux clones ancestraux

Le panneau **A** représente les valeurs obtenues pour les deux souches ancestrales à partir des données de l'ensemble des n=12 expériences. Les panneaux **B** et **C** représentent, respectivement pour #MGGP01 et #MGGP44, les taux de croissance estimés à partir de chacun des n=4 tests réalisés dans les différentes conditions de température testées (barres noires : 17°C ; barres gris clair : 23°C ; barres gris foncé : fluctuations). Les barres d'erreur indiquent l'écart-type.

3.3.4. Estimation de la fitness relative des différentes lignées

Pour chacune des trois conditions testées, la fitness relative des différentes lignées évoluées est représentée sur la **Figure 4**.

Les fitness relatives moyennes des différentes lignées dans les différents environnements sont résumées dans le **Tableau 1**. Les résultats des tests statistiques sont présentés, sous le même format, en **Annexe 10**.

Pour chacune des quatre lignées évoluées de même fond génétique, les comparaisons de fitness relative dans les différents environnements sont présentées dans le **Tableau 2** (l'**Annexe 11** présente, sous le même format, les résultats des tests statistiques associés).

- Fitness relative des lignées dans leur condition d'évolution (Tableau 1) :

Les lignées Stable_23 issues des deux ancêtres ainsi que les deux lignées fluctuantes issues de #MGGP01 (12F et 13F) présentent des gains de fitness élevés dans leur environnement d'évolution respectif, allant de 25% et 33%.

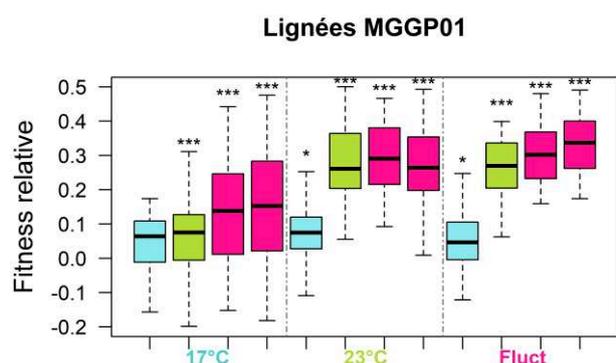
Concernant les lignées ayant évolué à 17°C, celle de fond génétique MGGP01 ne présente pas de gain de fitness significatif dans cette condition, tandis la lignée MGGP44 Stable_17 en présente un (bien qu'assez faible, de l'ordre de 7%).

Enfin, en conditions de fluctuation, les fitness relatives des deux lignées ayant évolué en température fluctuante à partir de l'ancêtre #MGGP44 (441F et 443F) ne sont pas significativement non-nulles.

- Fitness relative des lignées dans les différents environnements

D'après le **Tableau 1**, aucune des lignées n'a – par rapport à l'ancêtre – connu une diminution significative de fitness dans les deux environnements vis-à-vis desquels elle était naïve au regard de son évolution lors l'expérience. Ceci indique que l'adaptation au milieu d'évolution que nous avons observée dans certains cas ne s'est pas accompagnée de compromis (en termes de croissance) dans les autres environnements testés.

A



B

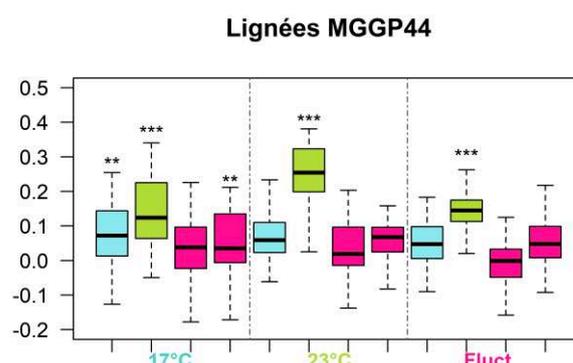


Figure II. 4 - Fitness relative des lignées évoluées

A : lignées évoluées de fond génétique MGGP01, **B** : lignées de fond génétique MGGP44. Pour chaque fond génétique, les valeurs de fitness relatives sont présentées dans les trois environnements thermiques testés, séparés par les lignes en pointillés : à 17°C (à gauche) ; à 23°C (au milieu) et en fluctuations (à droite). Dans chaque environnement, la couleur des boxplots indique le régime d'évolution : stable 17°C (bleu clair), stable 23°C (vert clair) ou fluctuations (rose fuchsia). Pour les lignées MGGP01 (resp. MGGP44), les deux boxplots roses fuchsia successifs correspondent, de gauche à droite, aux lignées 12F et 13 (resp. 441F et 443F). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Fond génétique	Conditions thermiques		
	17°C	23°C	Fluctuations
MGGP01			
Stable_17	+4.1% (NS)	+7.7% (*)	+4.8% (*)
Stable_23	+4.6% (***)	+28.1% (***)	+26.2% (***)
Fluct. 12F	+13.3% (***)	+29.6% (***)	+30.4% (***)
Fluct. 13F	+15.2% (***)	+27.6% (***)	+33.3% (***)
MGGP44			
Stable_17	+7.3% (**)	+5.9% (NS)	+4.9% (NS)
Stable_23	+14.2% (***)	+25.1% (***)	+14.4% (***)
Fluct. 441F	+3.5% (NS)	+3.4% (NS)	-1.2% (NS)
Fluct. 443F	+5.4% (**)	+5.7% (NS)	+5.7% (NS)

Tableau 1 - Gains de fitness des lignées évoluées

Chacune des huit lignées évoluées est représentée par une même ligne. Pour chacune d'entre elles, les gains de fitness moyens calculés à partir des tests menés à 17°C, à 23°C et en conditions de température fluctuante sont représentés. La valeur est précédée d'un signe « + » ou « - », selon que la fitness relative moyenne dans la condition considérée soit positive ou négative, respectivement. En gras sont indiquées les valeurs associées aux effets significatifs au seuil de 5%. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Les différences de fitness présentées par les lignées Stable_17 (quel que soit leur fond génétique) entre les environnements ne sont pas significatives (**Tableau 2**). En particulier, nos données ne permettent pas de détecter que la lignée MGGP44_Stable 17 croît mieux à 17°C que dans les autres conditions thermiques (*i.e.* 23°C et fluctuations thermiques).

Concernant la lignée Stable_23 de fond génétique MGGP44, celle-ci présente une tendance ($P = 0.075$) à mieux croître lorsqu'elle est soumise à l'environnement thermique dans lequel elle a évolué que dans les environnements vis-à-vis desquels elle est naïve (**Tableau 2**). Ceci ne s'observe pas pour la lignée Stable_23 de fond génétique MGGP01, qui croît de manière semblable à 23°C (fitness relative de 28.1%) et en conditions de fluctuations (fitness relative de 26.2%). En revanche, cette lignée croît moins bien à 17°C que lorsqu'elle est placée à 23°C ou en conditions fluctuantes (**Tableau 2**).

Nous observons, pour les deux lignées fluctuantes de fond génétique MGGP01 (12F et 13F), que la fitness relative est plus élevée en conditions de fluctuations qu'à 17°C et que, pour la lignée 13F, sa fitness relative à 23°C est supérieure à celle mesurée à 17°C (**Tableau 2**). Cela suggère qu'avoir expérimenté de manière intermittente un environnement à 23°C favorise l'adaptation aux températures élevées par rapport aux températures faibles. Néanmoins, cela n'empêche pas les lignées ayant évolué en conditions de fluctuations de présenter un gain de fitness significatif (de l'ordre de 14% en moyenne) à 17°C (**Tableau 1**). Nous noterons d'ailleurs, en dépit de la forte variance visible sur la **Figure 4**, que les lignées 12F et 13F sont les plus performantes à 17°C : leur fitness relative dans cet environnement est supérieure de plus d'un facteur 3 par rapport aux lignées MGGP01 Stable_17 et Stable_23 (**Tableau 1**).

Enfin, bien que nous détectons que la fitness relative de la lignée 443F soit significativement différente de zéro à 17°C uniquement, le **Tableau 2** nous informe que les gains de fitness de cette lignée dans les trois environnements testés sont tous statistiquement non-distinguables et restent modérés, d'environ 6% en moyenne.

Lignées	Comparaisons		
	23°C - 17°C	Fluct - 17°	23° - Fluct
MGGP01			
Stable_17	NS	NS	NS
Stable_23	*** (+)	*** (+)	NS
Fluct. 12F	* (+)	* (+)	NS
Fluct. 13F	NS	* (+)	NS
MGGP44			
Stable_17	NS	NS	NS
Stable_23	Tend. (+)	NS	Tend. (+)
Fluct. 441F	NS	NS	NS
Fluct. 443F	NS	NS	NS

Tableau 2 - Comparaisons des gains de fitness selon l'environnement thermique testé

Pour chacune des trois paires de comparaisons entre environnements testés, les différences de fitness relative sont indiquées pour chacune des lignées évoluées (1 lignée = 1 ligne). Lorsque les différences sont significatives, le sens de la différence (par rapport au sens choisi pour effectuer la comparaison) est présenté entre parenthèses. Par exemple, la lignée MGGP01_Stable 23 (ligne 2) présente une fitness très significativement supérieure lorsque testée à 23°C par rapport à 17°C. * p<0.05 ; ** p<0.01 ; *** p<0.001

- Régime de sélection et évolution de la fitness dans les différents environnements

En ce qui concerne les lignées ayant évolué en environnements stables, nous pouvons observer que, dans toutes les conditions thermiques testées et pour les deux fonds génétiques, la fitness relative de celles ayant évolué à 23°C est supérieure à la fitness de celles ayant évolué à 17°C (**Tableau 1**). Ceci est particulièrement vrai lorsque la fitness était mesurée à 23°C ou en fluctuations (différence alors d'un facteur 3 au minimum). Ceci suggère notamment qu'évoluer dans un environnement où les températures sont maintenues « élevées » (23°C) de manière continue permet de faire face de manière plus efficace – par rapport au cas où les températures sont maintenues constamment basses (17°C) – aux conditions de température alternant entre valeurs faibles et valeurs élevées.

Pour les deux lignées fluctuantes MGGP01, nous pouvons noter que celles-ci ont tendance à mieux se multiplier lorsqu'elles sont soumises à fluctuations que ne le fait la lignée ayant évolué à 23°C de même fond génétique lorsqu'elle est testée dans ces mêmes conditions de fluctuations (différentiel de fitness relative de l'ordre de 5.5% en moyenne, **Tableau 1**).

- Traduction des différences de fitness relative en termes de quantité de cellules

Finalement, la quantité de cellules atteinte par les différentes lignées dans les différents environnements est donnée en **Figure 5**. Ceci permet d'obtenir un aperçu direct des conséquences – en termes de nombre de cellules – des différences de fitness relative que présentent les lignées. Dans les trois conditions, nous trouvons un effet « Lignée » fortement significatif sur la densité de cellules atteintes à la fin des cinq jours de compétition (à 17°C – Panneau **A** – $P = 8,4 \cdot 10^{-9}$; à 23°C – Panneau **B** – $P < 2 \cdot 10^{-16}$; en fluctuations – Panneau **C** – $P = 5,3 \cdot 10^{-10}$). L'ensemble des comparaisons deux à deux de la densité atteinte par les différentes lignées de même fond génétique est donnée, dans les trois environnements thermiques testés, en **Annexe 12**. Globalement, ces résultats confirment ceux menés sur la fitness relative : de fortes différences de fitness relatives se traduisent pas des écarts importants à l'arrivée en termes de nombre de cellules.

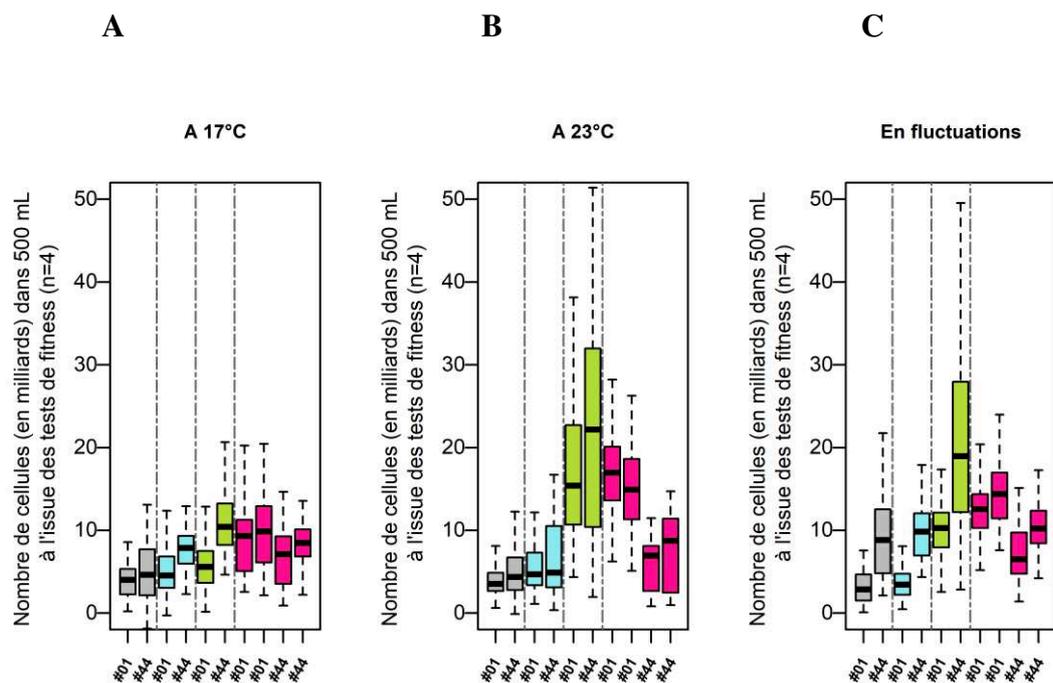


Figure II. 5 - Densité de cellules à l'issue des tests de compétition

Les panneaux **A**, **B** et **C** représentent respectivement les densités de cellules atteintes par les différentes lignées lors des tests à 17°C, à 23°C et en fluctuations. Pour chacun des graphes, le code couleur est le suivant pour les différentes lignées : ancêtres (gris), Stable_17 (bleu clair), Stable_23 (vert clair), fluctuant (rose fuschia). Sous chaque boxplot est indiqué le fond génétique des lignées : « #01 » pour MGGP01 et « #44 » pour MGGP44. Les quatre boxplots roses fuschia successifs correspondent, de gauche à droite, aux lignées 12F, 13F, 441F et 443F.

Enfin, la **Figure 5** montre que, malgré le fait qu'en conditions de fluctuations les lignées de fond génétique MGGP44 soient parties avec un net avantage en termes de croissance (voir également plus haut, **Figure 3**), les lignées fluctuantes MGGP44 atteignent à l'issue de l'évolution des densités moindres que les lignées fluctuantes MGGP01 (**Figure 5C**). Cette dernière observation s'explique par le fait que la différence (en faveur de MGGP44) initialement présentée par les ancêtres face aux fluctuations ne suffit pas à compenser les gains de fitness beaucoup plus importants que les lignées MGGP01 ont acquis au cours de leur évolution en conditions fluctuantes.

3.3.5. Estimation de la fitness relative des différentes lignées sur l'ensemble des tests réalisés

La fitness relative de chacune des lignées évoluées, estimée de manière globale sur l'ensemble des expériences de compétitions réalisées (toutes conditions de température confondues) est présentée sur la **Figure 6**.

D'après le **Tableau 3**, les gains de fitness significatifs s'échelonnent de 5% à 25%. Les résultats des tests statistiques correspondants sont présentés en **Annexe 13**. Seule l'une des lignées ayant évolué en fluctuations à partir de #MGGP44 (441F) ne présente pas de gain de fitness significatif. Le **Tableau 4** résume les différences en termes de fitness relative entre les différentes lignées issues d'un même ancêtre. Les résultats des tests statistiques correspondants sont donnés en **Annexe 14**.

D'après le **Tableau 4** et comme attendu d'après l'examen de la Figure 6, la plupart des comparaisons entre lignées évoluées issues d'un même ancêtre sont significatives. Les deux seules qui ne soient pas significativement différentes sont : celle comparant les deux lignées de fond génétique MGGP01 ayant évolué en conditions de fluctuations et celle comparant, chez les lignées MGGP44, l'une des lignée fluctuantes (443F) à la lignée ayant évolué à 17°C constant.

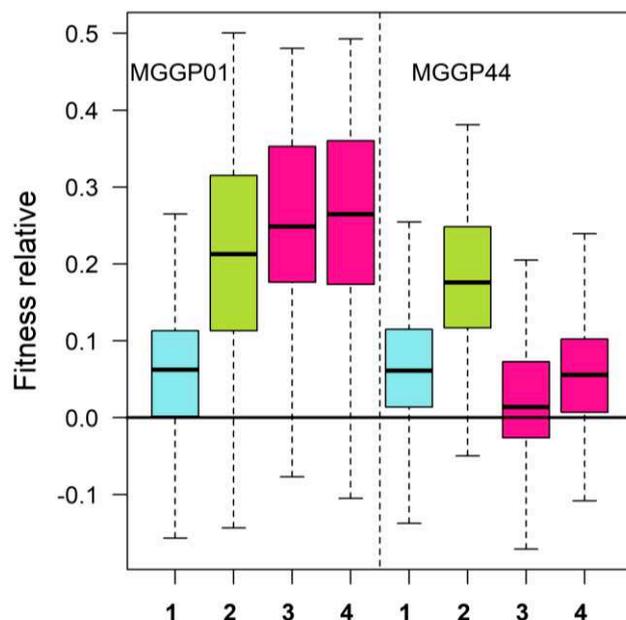


Figure II. 6 - Fitness relative des différentes lignées à partir de l'ensemble des conditions testées

Le code couleur permet de distinguer les lignées selon le régime dans lequel elles ont évolué : bleu clair pour les lignées Stable_17, vert clair pour les lignées Stable_23 et rose fuchsia pour les lignées fluctuantes. Les 4 boxplots à gauche de la ligne pointillée verticale correspondent aux lignées MGGP01 (12F est notée « 3 », 13F est notée « 4 ») et les 4 boxplots à droite correspondent aux lignées MGGP44 (441F est notée « 3 » et 443F est notée « 4 »). La ligne horizontale $Y=0$ représente la référence ancestrale (les ancêtres ont, par définition, une fitness relative nulle).

Fitness relative	MGGP01	MGGP44
Stable_17°C	+5.3%	+6.1%
Stable_23°C	+19.5%	+17.9%
Fluct. (noté 3)	+24.2%	+1.9%
Fluct. (noté 4)	+25.2%	+6.6%

Tableau 3 – Gains moyens de fitness présentés par les lignées ayant évolué dans les différents régimes

Les valeurs positives indiquent que la fitness a augmenté au cours de l'évolution. Les augmentations statistiquement significatives sont présentées en gras. La lignée fluctuante notée 3 indique 12F (resp. 441F) pour le fond génétique MGGP01 (resp. MGGP44) et la lignée notée 4 indique 13F (resp. 443F) pour le fond génétique MGGP01 (resp. MGGP44).

	Stable 23°C – Stable 17°C	Fluct (noté 4) – Fluct (noté 3)	Fluct (notés 3/4) – Stable 23°C	Fluct (notés 3/4) – Stable 17°C
MGGP01	+14.2%	NS (+1%)	+4.7% / +5.7%	+18.9% / +19.9%
MGGP44	+11.8%	+4.7%	- 16% / -11.3%	- 4.2 % / NS (+0.5%)

Tableau 4 - Différentiel de fitness relative selon le régime d'évolution expérimenté par les différentes lignées

Les différences sont mesurées dans l'ordre indiqué sur la première ligne. Un signe « + » (resp. « - ») indique que la différence testée est positive (resp. négative). La lignée fluctuante notée 3 indique 12F (resp. 441F) pour le fond génétique MGGP01 (resp. MGGP44) et celle notée 4 indique 13F (resp. 443F) pour le fond génétique MGGP01 (resp. MGGP44). En gras sont représentées les différences présentant un écart statistiquement significatif au seuil de 5%.

Les effets globaux qu'ont eus les différents régimes quant à l'évolution du taux de croissance moyenné sur les différents environnements – tels que sont présentés sur la **Figure 6** et le **Tableau 3** ci-dessus – offrent une vision synthétique des résultats obtenus. En particulier, nous observons que, pour les lignées de fond génétique MGGP44, la souche ayant évolué à 23°C croît mieux que toutes les autres. Pour les lignées issues de #MGGP01, nous trouvons que celles ayant évolué en conditions fluctuantes croissent mieux que celles ayant évolué en régimes stables.

3.3.6. Evolution de la taille moyenne des cellules et lien avec les gains de fitness mesurés

Nous avons enfin évalué la taille moyenne des cellules (spores) produites par les différentes lignées (**Figure 7**). Les résultats sont présentés – comme pour la partie ci-dessus – pour l'ensemble des lignées, indépendamment des conditions dans lesquelles ont été réalisés les tests de compétition (*i.e.* à partir de l'ensemble des données obtenues sur les n=12 expériences).

Le **Tableau 5** montre que la taille des spores a évolué au cours de l'expérience (colonne 2) : les spores produites par les lignées évoluées sont plus petites que celles produites par l'ancêtre dont elles dérivent, à l'exception de la lignée 441F (*i.e.* celle dont la fitness n'a pas augmenté significativement).

Parmi les lignées évoluées de fond génétique MGGP01, il y a une différence selon que le régime d'évolution ait été stable (soit 17°C, soit 23°C) ou fluctuant : les spores produites par les lignées ayant évolué en fluctuations sont significativement plus petites. Cela ne s'observe pas pour les lignées de fond génétique MGGP44. Pour ces dernières, nous observons que les tailles (réduites par rapport à l'état ancestral) des spores produites par les deux lignées ayant évolué en fluctuations ne sont pas différentes l'une de l'autre et que les lignées 443F et Stable_17 produisent également des spores de taille non-significativement différentes. La lignée Stable_23, qui est également la lignée dont la croissance est la plus forte, produit des spores plus petites que toutes les autres lignées évoluées issues de #MGGP44.

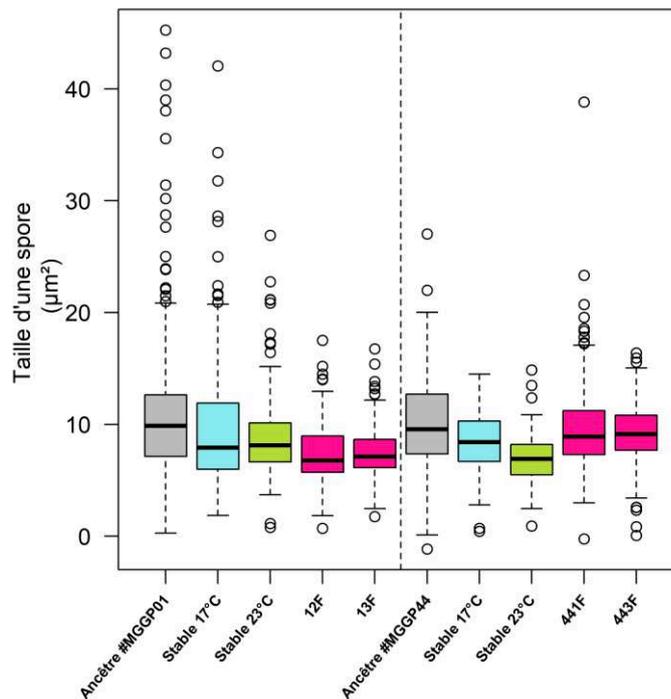


Figure II. 7 - Taille des spores produites par les différentes lignées

Pour chaque lignée, les boxplots indiquent la distribution des tailles de spores produites par la lignée correspondante, à partir de l'ensemble des n=12 tests réalisés, toutes conditions confondues. Les souches ancestrales sont représentées en gris. Le code couleur permet de distinguer les lignées selon le régime dans lequel elles ont évolué : bleu clair pour les lignées Stable_17, vert clair pour les lignées Stable_23 et rose fuchsia pour les lignées fluctuantes. Les 4 boxplots à gauche de la ligne pointillée verticale correspondent aux lignées de fond MGGP01 et les 4 boxplots à droite correspondent aux lignées de fond génétique MGGP44.

Lignées MGGP01	Ancêtre	Fluct 12F (noté 3)	Fluct 13F (noté 4)	Stable_17°C
Fluct 12F (noté 3)	< 2e-16			
Fluct 13F (noté 4)	< 2e-16	0.85		
Stable_17°C	2.9e-05	1.1e-07	2.1e-07	
Stable_23°C	3.3e-09	2.8e-04	5.3e-04	0.096
Lignées MGGP44	Ancêtre	Fluct 441F (noté 3)	Fluct 443F (noté 4)	Stable_17°C
Fluct 441F (noté 3)	0.21			
Fluct 443F (noté 4)	0.018	0.25		
Stable_17°C	1.2e-4	0.0093	0.20	
Stable_23°C	1.7e-14	1.1e-10	5.0e-07	1.9e-03

Tableau 5 - Comparaisons deux à deux de la taille des spores produites par les lignées de même fond génétique

Pour chaque fond génétique, le tableau donne les p-values des 10 paires de comparaisons possibles comparant la taille des spores produites par les différentes lignées (ancêtres inclus). En gras sont indiquées les p-values inférieures à 5%.

La **Figure 8** montre que la corrélation entre fitness relative des lignées et tailles spores qu'elles produisent est significativement négative ($\rho = -0.836$; $P = 2.6.10^{-3}$). La valeur relativement élevée du R^2 indique que la fitness de nos lignées pourrait être grossièrement prédite à partir de la taille des spores qu'elles produisent (ou inversement, possibilité de prédire la taille des spores produites à partir de la fitness). D'ailleurs, de manière intéressante et pour les deux fonds génétiques, l'ordre dans lequel se classent les lignées est le même selon que l'on considère la fitness relative ou la taille des spores.

3.3.7. Mise en évidence d'un biais technique

Nous avons observé un biais d'ordre technique dû à la procédure automatisée d'analyse d'images que nous avons utilisée pour traiter nos photographies. En effet, plus le nombre de cellules photographiées dans le champ était important, plus les cellules avaient tendance à apparaître superposées les unes au-dessus des autres. Cet effet se retrouvait principalement sur les photographies prises lors de l'excitation du calcofluor-blanc (qui, à la différence de ce qui se passe lors de l'excitation de la GFP, révèle l'ensemble des cellules en présence). Ainsi, les photographies prises en calcofluor-blancs présentaient par endroits des « amas » de cellules, et ce d'autant plus que les cellules étaient densément regroupées dans le champ photographié. Or, nous avons fixé une taille maximale pour qu'ImageJ considère une cellule et cela a eu pour effet, à haute densité, de surestimer artificiellement la proportion de cellules GFP par rapport aux cellules calcofluor. Certaines de ces dernières – celles superposées et apparaissant sous forme d'amas – étaient supprimées car considérées comme « trop grosses » pour être prises en compte, diminuant *in fine* le nombre de cellules calcofluor dénombrées. L'effet de ce biais est représenté sur la **Figure 9A**. Ce biais, dans la mesure où il tend à diminuer le nombre de cellules non-GFP lorsqu'elles sont très nombreuses dans la culture, conduit probablement à une sous-estimation de la fitness relative telle que nous l'avons estimée. Enfin, notons que ce biais n'affecte pas l'estimation de la taille des cellules, comme le montre la **Figure 9B**.

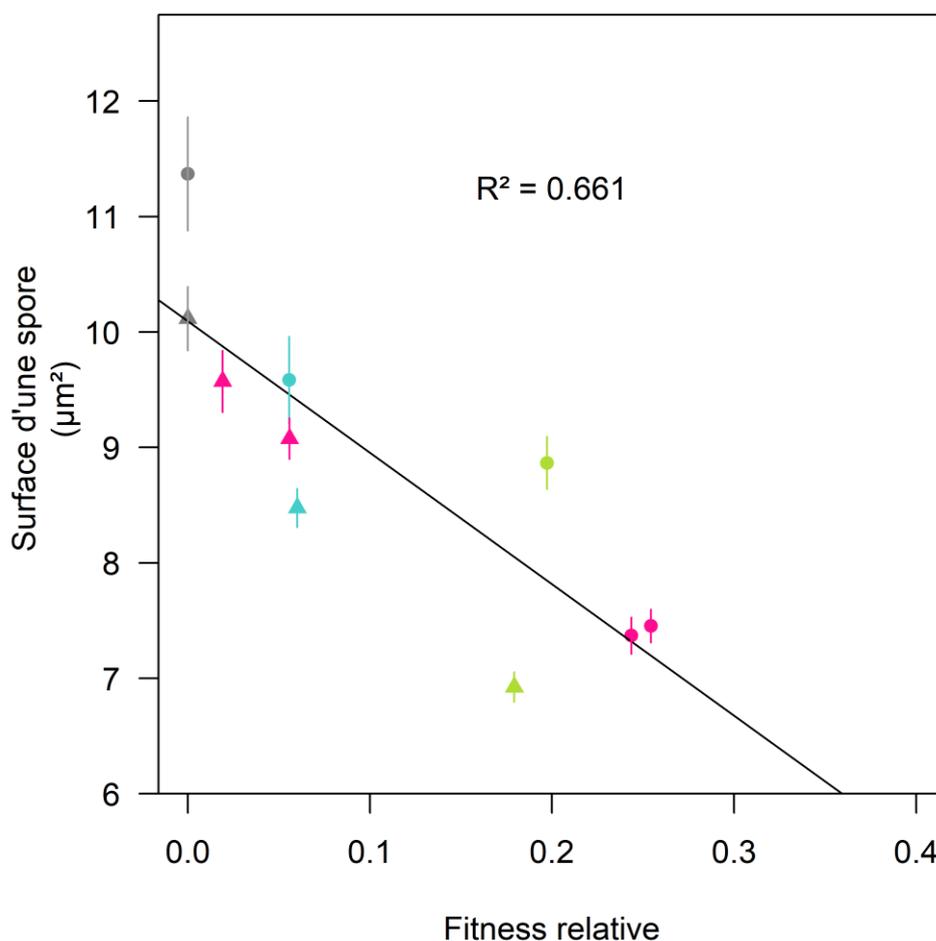
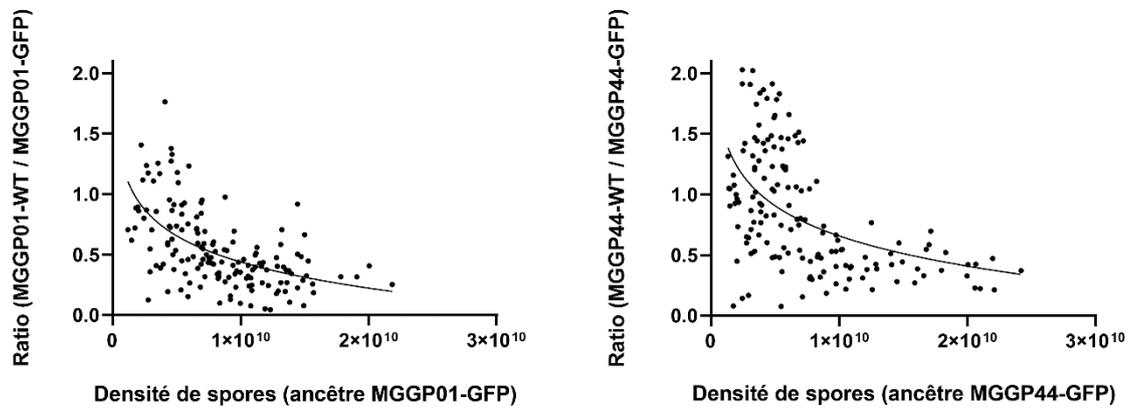


Figure II. 8 - Corrélation entre fitness relative et taille des spores

Les symboles correspondent au fond génétique (ronds = MGGP01 ; triangles = MGGP44). Les ancêtres sont représentés par des symboles gris et ceux correspondants aux lignées évoluées sont colorés en fonction du régime d'évolution : 17°C (bleu clair), 23°C (vert clair) ou fluctuations (rose fuchsia). Les valeurs de fitness relative (abscisses) et de taille (ordonnées) représentent les moyennes obtenues sur l'ensemble des n=12 expériences réalisées. Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards sur les tailles moyennes estimées. La droite représentée correspond à la droite de régression linéaire obtenue par la méthode des moindres carrés.

A



B

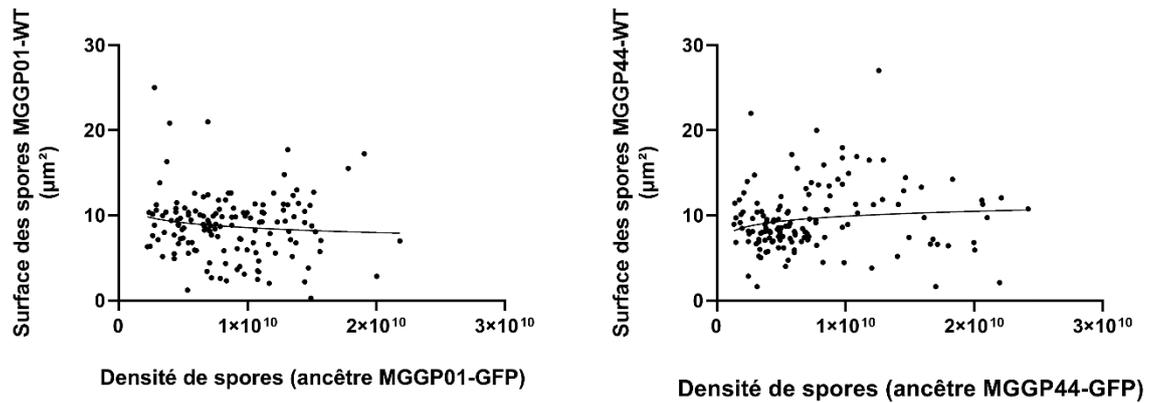


Figure II. 9 - Mise en évidence d'un biais technique lors de la procédure automatisée d'analyse d'images

Le panneau **A** montre comment varie le ratio « Ancêtre non-GFP/Ancêtre-GFP » en fonction de la quantité de cellules photographiées dans le champ (quantité donnée en abscisse, représentée par le nombre de spores de l'ancêtre GFP-transformé). Le panneau **B** montre que ce biais n'affecte pas l'estimation de la taille des cellules.

3.4. Discussion

La croissance de nos deux populations ancestrales était différente dans nos conditions de laboratoire et ceci était particulièrement vrai lorsqu'elle était testée en conditions de fluctuations de température : alors que les fluctuations entraînaient chez le clone #MGGP01 une tendance à moins bien croître, nous avons observé l'inverse pour le clone #MGGP44, ce dernier croissant significativement mieux en conditions fluctuantes qu'en conditions stables. Cette dernière observation suggère une préadaptation aux fluctuations thermiques chez #MGGP44. Nous ne nous attendions pas à de telles différences entre ancêtres car nous supposons qu'ils avaient des histoires évolutives en termes d'exposition récente à différentes températures très similaires dans la mesure où ils avaient été isolés au sein d'un même champ puis acclimatés de façon identique aux conditions de laboratoire.

Nous observons de plus que les lignées fluctuantes issues de #MGGP44 (*i.e.* celui des ancêtres dont la croissance en fluctuations était significativement favorisée) présentaient des gains de fitness faibles en conditions de fluctuations. A l'inverse, ces gains étaient beaucoup plus prononcés pour les lignées fluctuantes dérivant de #MGGP01 (*i.e.* l'ancêtre pour lequel les fluctuations semblaient induire une légère tendance à la diminution croissance). Ainsi, c'est finalement pour le clone qui semblait initialement pré-adapté aux fluctuations thermiques que l'évolution adaptative du taux de croissance à ce régime a été la moins importante. Cette pré-adaptation aurait *in fine* ralenti l'adaptation de #MGGP44 aux fluctuations lors de notre évolution expérimentale, par exemple en rendant plus difficile l'apparition de variants améliorant de manière significative la croissance sous fluctuations. A l'inverse, chez #MGGP01, la sélection naturelle aurait pu agir plus facilement dans la mesure où l'ancêtre était loin de l'optimum.

Nous avons trouvé des différences importantes quant à l'ampleur de l'adaptation mise en place lors de l'évolution à 17°C ou à 23°C, cette dernière température s'accompagnant d'un gain de fitness significativement plus important, et ceci au sein des deux fonds génétiques. Une telle différence de taux de croissance n'existait pas chez les ancêtres lorsqu'ils étaient testés à 17°C et 23°C et a donc dû se mettre en place au cours de l'évolution. En mesurant à haute résolution temporelle les dynamiques de consommation d'oxygène (mesure du métabolisme) et de la réplication de l'ADN (mesure du taux de croissance) dans différentes conditions chez *S. cerevisiae*, des travaux ont pu mettre en évidence un couplage entre la rapidité du métabolisme basal et la rapidité de l'entrée en divisions cellulaires (Burnetti et al. 2015). Dans

l'hypothèse probable d'un métabolisme plus rapide à 23°C qu'à 17°C, une telle explication pourrait expliquer pourquoi les lignées ayant évolué à ces deux températures ont divergé en termes de croissance : toute mutation altérant de manière bénéfique le métabolisme aurait eu un effet sur la croissance potentialisé à 23°C par rapport à 17°C, conduisant *in fine* à une plus forte croissance des lignées évoluant à 23°C.

Nos résultats (principalement ceux obtenus sur les lignées de fond génétique MGGP44) conduisent à considérer qu'il y a asymétrie dans la mise en place de la « spécialisation » à différents environnements : s'adapter à des températures « basses » ne permettrait pas de s'adapter à des températures « élevées », tandis que la réciproque de cette proposition ne serait pas vraie – comme le montre l'exemple de la lignée MGGP44 Stable_23 qui présente une fitness relative de 14% lorsque testée à 17°C. Une telle asymétrie, allant dans le même sens que celle observée au cours de notre expérience, a été mise en évidence lors de l'adaptation de populations d'*E. coli* à différents environnements thermiques. **Bennett & Lenski 1993** ont ainsi pu mettre en évidence que l'adaptation à 42°C des populations ayant évolué à cette température s'était réalisée sans perte de fitness à 20°C (par rapport à ce qu'elle était chez l'ancêtre), tandis que **Mongold et al. 1996** ont montré, au contraire, que l'adaptation à une température de 20°C s'accompagnait d'une perte de fitness à 42°C (par rapport à celle présentée par l'ancêtre). A la différence de cette étude, la nôtre n'a cependant pas mis en évidence de compromis adaptatifs : dans aucun des environnements vis-à-vis desquels elles étaient naïves, les lignées ne sont moins performantes par rapport à leur ancêtre. D'ailleurs, bien que souvent anticipée du fait des effets pléiotropes que peuvent présenter certains loci ayant été sélectionnés au cours des processus adaptatifs, la mise en place de compromis adaptatifs n'est pas systématique lors des expériences d'évolution en laboratoire (**Travisano 1997 ; Cooper 2002**).

Il est souvent admis que les fluctuations environnementales d'un paramètre abiotique puissent favoriser les individus « généralistes », c'est-à-dire performants lorsque confrontés aux différentes valeurs décrites par le paramètre qui fluctue (**Gilchrist 1995 ; Kassen 2002**), et notamment à ses valeurs extrêmes et moyennes. Cela a par exemple pu être prouvé chez *D. melanogaster* (**Condon et al. 2014**).

Nos résultats sont très contrastés selon le fond génétique considéré. Chez les lignées MGGP01, nous avons observé que les lignées fluctuantes sont très performantes dans tous les environnements testés et que, par rapport à la souche ayant évolué à 23°C, elles ont de plus tendance à mieux croître que cette dernière lorsqu'elles sont soumises à fluctuations. Des

résultats similaires ont pu être obtenus sur différents types de micro-organismes qui avaient été soumis à sélection fluctuante : la plupart du temps ces derniers présentaient un phénotype généraliste tandis que les populations contrôles ayant évolué en environnements stables étaient devenues des spécialistes. Ainsi, chez *E. coli*, l'exposition alternée à différents types de stress a rendu les populations ayant évolué dans l'environnement alternant tout aussi tolérantes à chacun des stress que les populations soumises à l'unique type de stress dans lequel elles avaient évolué. (Karve et al. 2016). De même, chez *Paramecium caudatum*, les populations qui avaient évolué en environnement alternant entre 23°C et 35°C se trouvaient être meilleures aux deux températures que les populations qui y avaient chacune évolué de manière constante (Duncan et al. 2011). A l'inverse de ce « généralisme sans coût », les paramécies qui avaient évolué en températures stables s'étaient spécialisées à leur environnement et souffraient d'un coût de fitness lorsque mises dans l'autre environnement. Une interrogation qui émerge de nos résultats obtenus sur les lignées fluctuantes MGGP01 est de savoir si ces dernières se sont adaptées sur toute la gamme de température allant de 17°C à 23°C, et notamment à la température moyenne de 20°C. Cela semble en tout cas possible, comme l'a démontré la meilleure adaptation de la bactérie *S. marcescens* à 31°C lorsqu'elle avait évolué en environnement alternant entre 24°C et 38°C par rapport à une évolution constante à 31°C (Ketola et al. 2013).

De manière tout à fait inattendue, nos résultats montrent une corrélation négative significative entre la fitness relative des populations et la taille des spores produites : plus les gains de fitness avaient été forts, plus les lignées produisaient de petites spores. A l'inverse de ce que nous avons observé, les données obtenues sur les douze populations de bactéries évoluées au sein de l'équipe de Richard Lenski ont montré que le volume des cellules de chacune des populations avait significativement augmenté, et ce d'au moins 50% en 10,000 générations (Lenski & Travisano 1994). Chez *E. coli*, il a été montré que la taille des cellules peut être directement sélectionnée sans pour autant nuire à la croissance de cellules (Yoshida et al. 2014), indiquant qu'une variation de taille ne s'accompagne pas nécessairement d'un coût de fitness et que la taille peut donc évoluer – de manière directe ou indirecte – sans trop de contraintes. Néanmoins, l'augmentation de la taille de cellules avec l'évolution adaptative des populations observée par Lenski & Travisano 1994 fait plutôt figure d'exception. En effet, aussi bien chez la levure *S. cerevisiae* (Spor et al. 2014) que chez la bactérie *P. fluorescens* (Gounand et al. 2016), il a pu être montré par des approches d'évolution expérimentale que, respectivement, l'accroissement adaptatif de la production de biomasse par fermentation ou du

taux de croissance s'accompagnait d'une diminution significative de la taille des cellules. De même des résultats obtenus sur l'eucaryote unicellulaire *Actinosphaerium sp.* ont montré que la plus forte croissance associée à une élévation de température s'accompagnait d'une diminution de la taille des cellules (**DeLong 2012**). De plus, la théorie de la diffusion implique que plus une cellule possède un rapport surface sur volume élevé, plus les solutés nécessaires à sa croissance lui parviendront de manière efficace (**Young 2006**). Pour des cellules approximativement sphériques, ce rapport surface sur volume est d'autant plus important que les cellules possèdent un petit diamètre : ainsi la croissance des cellules serait favorisée lorsque ces dernières sont petites. Nos données obtenues sur *Z. tritici*, dont les spores ont des formes de bâtonnets, tendent à supporter cette théorie de la diffusion. Quant au fait de savoir si l'évolution de la taille des spores que nous avons observée est une conséquence indirecte d'une sélection sur le taux de croissance (co-variation entre traits) ou relève d'une sélection plus directe, cela reste sujet à débat (**Amir 2017**). Pour répondre à cette question, nous aurions pu dans un premier temps étudier comment variait la taille des cellules produites par nos populations ancestrales en conditions de fluctuations, sachant que ces conditions altéraient le taux de croissance des populations par rapport aux températures stables. Il est possible enfin que l'évolution de la taille fasse intervenir des mutations modifiant la paroi cellulaire, comme cela a été montré par **Philippe 2009** chez *E. coli*.

4. CHAPITRE 3 : Consequences of *in vitro* evolution on the virulence of the pathogen *Zymoseptoria tritici*

4.1. Introduction

Etudier la base génétique des interactions plantes-pathogènes présente un intérêt majeur, et ceci à deux niveaux. Cela permet d'une part de comprendre comment est maintenue, à l'échelle moléculaire, l'adaptation du pathogène à un hôte mettant perpétuellement en place des mécanismes de défense lui permettant de se protéger des infections. Identifier les loci impliqués dans cette coévolution moléculaire – ainsi que la dynamique de leurs variations dans le temps et dans l'espace – éclaire donc par quels mécanismes les organismes pathogènes (et leurs génomes) évoluent en réponse aux pressions de sélection exercées par l'hôte. D'autre part, cette compréhension fondamentale peut trouver des applications pratiques en agronomie, dans la mesure où la lutte génétique, *via* l'introduction de gènes de résistance dans les populations d'hôtes cultivés, reste l'une des principales stratégies pour combattre les épidémies.

Comme pour tous les patho-systèmes impliquant la coévolution entre un hôte et un pathogène, les interactions entre *Z. tritici* et *Triticum aestivum* dépendent en partie des génotypes des individus qui interagissent. Initialement, le modèle dit « gène pour gène » – au cours duquel le produit d'un gène de résistance exprimé par la plante hôte interagit avec sa cible côté pathogène (le facteur d'avirulence) (Jones & Dangl 2006) – a été établi afin de conceptualiser les différentes étapes qui aboutissent à la mise en place de l'immunité de type qualitative présentée par les végétaux en réponse à une agression. Cependant, dans bien des cas, la résistance est en réalité plutôt de type quantitative et implique de nombreux loci ayant individuellement de petits effets (Poland et al. 2009). D'un point de vue méthodologique, les déterminants génétiques de la pathogénie peuvent être identifiés par *Quantitative Trait Locus mapping* (QTL mapping) ou par génétique d'association (GWAS en anglais, pour *Genome-Wide Association Studies*).

Globalement, il existe dans la littérature encore relativement peu de données concernant les interactions moléculaires entre *Z. tritici* et son hôte (Duba et al. 2018, mais voir Cousin et al. 2006 et Mehrabi et al. 2007). Par rapport à celles ayant cherché à identifier les bases génétiques de la résistance du blé à la septoriose (revues dans Brown et al. 2015), les études

des bases génétiques de la virulence chez *Z. tritici* sont relativement peu nombreuses. Elles ont cependant permis de révéler un déterminisme génétique complexe concernant les traits liés à l'agressivité du pathogène vis-à-vis de l'hôte. Ainsi le niveau de pathogénicité de *Z. tritici* possède une composante quantitative importante (**Stewart & McDonald 2014**). Soulignons ici une des rares études ayant identifié des QTLs pour certains traits liés à la pathogénie qui étaient étudiés (surface foliaire recouverte par des lésions d'origine fongique, densité de pycnides, taille des pycnides et mélanisation des pycnides) (**Lendenmann et al. 2016**). Cette étude a notamment permis d'identifier un QTL à effet fort au niveau du chromosome 7. Ce QTL semble avoir un effet pléiotrope puisqu'il ressort lors de l'analyse de la plupart des phénotypes mentionnés ci-dessus. Enfin, il comprend 38 gènes annotés, dont certains codent pour des petites protéines – classiquement moins de 300 résidus – riches en cystéines qui sont exprimées lors de l'infection et sécrétées dans l'apoplasme et qui constituent donc de bons candidats en tant qu'effecteurs de la virulence (**Stergiopoulos & de Wit 2009**).

La faible quantité de travaux menés sur la base génétique de la pathogénie chez *Z. tritici* est également une réalité en ce qui concerne les études de génétique d'association qui, bien que représentant une approche puissante et prometteuse en phytopathologie, reste encore relativement peu explorée (**Bartoli & Roux 2017 ; Genissel et al. 2017**). A l'heure actuelle, seules trois études de génétique d'association (parfois couplées à du *QTL mapping*) ont été publiées à partir de données phénotypiques et génomiques obtenues sur des isolats de populations naturelles de *Z. tritici*. Les résultats de ces études impliquent dans tous les cas des loci codant des petites protéines sécrétées et qui sont donc, au moins en partie, responsables de la variation quantitative de pathogénie présentée par les différentes souches de *Z. tritici*. L'une de ces études (**Zhong et al. 2017**) a révélé un facteur d'avirulence appelé *AvrStb6* (d'après le contournement de résistance que certains isolats de *Z. tritici* présentaient face à des blés porteurs du gène *Stb6* conférant un niveau de résistance). Au locus en question, de nombreux variants (16 substitutions non-synonymes et 2 synonymes) ont été identifiés et ce locus est flanqué par des éléments transposables, ce qui pourrait expliquer son évolution. Une seconde étude (**Hartmann et al. 2017**) a identifié un polymorphisme de présence-absence d'un gène comme étant associé à la pathogénie de *Z. tritici* vis-à-vis d'un certain génotype de blé : les souches présentant la délétion au locus considéré étaient davantage pathogènes vis-à-vis de ce génotype hôte. Là encore ce locus se situe au sein d'un groupe d'éléments transposables. Finalement la dernière étude (**Meile et al. 2018**) a pu identifier un facteur d'avirulence baptisé *Avr3DI* dont certaines versions alléliques ségrégeant au sein des populations naturelles permettent une

évasion de la reconnaissance par le blé hôte. Le gène codant pour *Avr3D1* se situe dans une région génomique particulière ayant été interprétée par certains auteurs comme étant le résultat de la fusion entre un chromosome essentiel et un chromosome accessoire de *Z. tritici* (**Schotanus et al. 2015**). Le fait que les trois études mentionnées aient révélé des loci situés dans des zones génomiques riches en éléments transposables ou hautement dynamiques supporte la vision selon laquelle les remaniements structuraux pourraient alimenter la variabilité potentiellement adaptative. Des résultats obtenus au sein de notre équipe ont identifié des candidats proches des télomériques (riches en éléments transposables), suggérant là encore un lien entre pathogénie et remaniements structuraux associés à la présence d'éléments transposables.

Les expériences de croisement entre souches sexuellement compatibles ont depuis longtemps révélé que la méiose lors de reproduction sexuée s'accompagne chez *Z. tritici* d'un polymorphisme de présence-absence de chromosomes accessoires (**Wittenberg et al. 2009 ; Goodwin et al. 2011 ; Fouché et al. 2018**). Il a donc été souvent considéré que le polymorphisme de présence-absence que présentaient les isolats issus de populations naturelles s'expliquait de manière plus ou moins exclusive par la reproduction sexuée ayant cours dans les champs de blé. Cependant il a récemment été montré en laboratoire que la production de pycnidiospores par voie asexuée pouvait entraîner la production au sein de la plante de spores dont certains avaient perdu des chromosomes accessoires par rapport à la souche initialement inoculée (**Möller et al. 2018**). Cette même étude a par ailleurs montré que de telles pertes ne sont pas spécifiques à la reproduction asexuée de *Z. tritici* au sein de la plante mais surviennent également *in vitro* lorsque le champignon se reproduit par mitoses. Plus précisément il a été montré que dans des conditions non-stressantes de température (18°C), jusqu'à 7% des cellules produites avaient perdu un chromosome accessoire à l'issue de seulement quatre semaines de croissance. De plus, une température élevée (28°C) s'accompagnait d'une plus forte fréquence de perte de chromosomes accessoires, et plus uniquement d'un seul par spore comme cela était le cas à 18°C. Ainsi, au cours de notre évolution expérimentale, outre la présence de mutations à petite échelle (de types SNPs ou petites insertions/délétions) qui ont pu s'accumuler dans le génome des lignées de *Z. tritici* ayant évolué, il est également envisageable que des événements structuraux de plus grande ampleurs aient pu survenir *in vitro* et qu'ils aient potentiellement des conséquences en termes de virulence vis-à-vis de l'espèce hôte. Notons cependant qu'à la différence de la plupart des autres laboratoires travaillant sur *Z. tritici*, les séquençages NGS de la souche de référence IPO-323 stockée au laboratoire depuis 2011 (le plus récent datant de

2016) n'ont révélé aucune perte de chromosomes accessoires. Cela suggère que les conditions de culture et/ou le milieu utilisés au sein de notre laboratoire sont très peu propices à de telles pertes.

Dans ce dernier chapitre, nous allons chercher à quantifier le niveau de pathogénicité des différentes lignées évoluées de *Z. tritici* en les inoculant sur différents génotypes de blé, présentant des niveaux variables de susceptibilité à la septoriose.

L'une des particularités de l'expérience d'évolution expérimentale qui fait l'objet de cette thèse réside dans le fait que nous avons fait évoluer pendant plus de 500 générations un organisme pathogène entièrement *in vitro*, c'est-à-dire en l'absence de son hôte. Nous avons vu au chapitre précédent que, pour la majorité des lignées évoluées, cela a conduit à une adaptation au milieu (abiotique) au sein duquel s'était déroulée l'évolution. La question qui vient naturellement par la suite est donc la suivante : comment a évolué le pouvoir pathogène des lignées ayant évolué dans les différents régimes thermiques testés ? Une autre question est de déterminer si les trois régimes de sélection testés lors de l'évolution expérimentale (17°C, 23°C ou régime fluctuant) ont affecté de manière différente le niveau de pathogénicité de nos lignées de *Z. tritici*. Nous chercherons également à déterminer s'il existe un lien, qu'il soit positif ou négatif, entre la croissance *in vitro* résultant de processus adaptatifs et la pathogénicité des différentes lignées. Enfin, nous examinerons les liens entre changements survenus au niveau des séquences d'ADN et évolution du niveau de pathogénie, afin d'effectuer un premier pas vers les bases génétiques des changements de virulence que nous aurons observés.

Chez *Z. tritici*, il a récemment été montré que, sur un hôte sensible à la septoriose, la température moyenne du site où les souches avaient été isolées était négativement corrélée à leur niveau d'agressivité *in planta* (**Chen et al. 2017**). Cette relation reste marginalement significative, et ne s'est pas vérifiée sur un hôte davantage résistant testé également par les auteurs. Cependant les auteurs suggèrent que l'adaptation à un environnement « chaud » (légèrement inférieur à 25°C dans l'article) pourrait se faire au détriment du pouvoir pathogène. Un tel compromis adaptatif pourrait, entre autres, s'expliquer par le fait que des loci aux effets pléiotropes et antagonistes contribuent aux processus biologiques nécessaires à l'adaptation de *Z. tritici* à son environnement thermique et à sa capacité à infecter et se reproduire au sein de la plante hôte. Il a d'ailleurs pu être démontré, par une approche de *QTL mapping*, l'existence de régions génomiques impliquées à la fois dans la réponse (en termes de croissance *in vitro*) à différentes températures et dans la morphologie et la mélanisation des spores *in vitro* (**Lendenmann et al. 2016**). Or le cycle infectieux de *Z. tritici* au sein de son hôte requiert des

changements morphologiques (Steinberg 2015), notamment des transitions entre forme de croissance de types hyphes mycéliens et spore de type levure. Le rôle de la mélanisation au cours de l'infection par *Z. tritici* n'est quant à lui pas aussi clair que pour certaines espèces de champignons (Liu & Nizet 2009) – notamment ceux pénétrant au sein de leurs hôtes en traversant directement l'épiderme – mais il n'est pas exclu que ce processus permette d'améliorer sa survie face à différents types de stress rencontrés en conditions naturelles (radiations UV, certains génotypes d'hôtes, interactions avec d'autres pathogènes présents sur l'hôte) (Krishnan et al. 2018). Enfin, il a pu être montré à partir d'un petit échantillon l'existence d'une corrélation positive entre taux de croissance *in vitro* et agressivité au sein de l'hôte ($0.002 < p < 0.009$), suggérant une contribution de la capacité à croître sous forme levure dans le degré de pathogénie que présente le champignon (Zhan, F. et al., 2016). Cependant cette corrélation n'a pas pu être confirmée sur de larges échantillons de *Z. tritici* à différentes températures dans notre laboratoire.

4.2. Article : Consequences of *in vitro* evolution on the virulence of the pathogen *Zymoseptoria tritici*

Prepublication:

Consequences of *in vitro* evolution on the virulence of the pathogen *Zymoseptoria tritici*

Jallet^{1,2} AJ, Robert-Siegwald¹ G, Genissel¹ A

Author's affiliation:

¹ UMR BIOGER, INRA, AgroParisTech, Université Paris Saclay, Thiverval-Grignon, France

² Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Orsay, France

Authors' email address: arthur.jallet@inra.fr, guillaume.rbt@gmail.com, anne.genissel@inra.fr

Corresponding author: Anne Genissel, anne.genissel@inra.fr, (33) 130815359

Abstract:

- All species are living in variable environments. The effect of changing environments should be more integrated to plant-pathogen studies to expand our knowledge on the evolutionary dynamic of plant-pathogen interactions.
- Following an experimental evolution *in vitro* during 500 generations with different temperature regimes, we investigated the virulence level of *Zymoseptoria tritici* evolved lineages on 6 wheat cultivars and whole-genome sequenced 10 evolved lineages to seek accumulated mutations.
- Our study evidenced a decrease of virulence for several evolved lineages, depending on the host genotype. Our results evidenced trans-lineage segregating mutations in the genome, including synonymous and non-synonymous mutations in the secretome. Surprisingly, no loss of dispensable chromosomes occurred during the experimental evolution after 500 generations.
- These results suggest that abiotic environment can influence the dynamic evolution of the plant pathogen *Z. tritici*.

Key words: abiotic environment, genome integrity, de novo mutation, plant-pathogen evolution, secretome.

Introduction

Understanding how species are able to respond to environmental changes remains a challenge in Evolutionary Biology. In the quest to understand the dynamic arms race between plants and their pathogens, the effect of changing environments has been rarely considered, despite its ubiquitous effect on plant-pathogen evolution (Velasquez et al., 2018). Studies in laboratory controlled conditions hence represent a first step towards understanding the complexity of plant pathogens in the context of global change. In the present study our model is the ascomycete fungus *Zymoseptoria tritici*, a pathogen responsible for Septoria Tritici Blotch (STB), one of the most important foliar diseases of wheat (Fones and Gurr, 2015; O’Driscoll et al., 2014).

Knowledge on the complex molecular interactions between the wheat and this fungal pathogen is still growing (Kettles and Kanyuka, 2016). So far there are 21 known resistance genes and many more other QTLs with the continuous deployment of resistant cultivars in wheat by breeders (Brown et al., 2015), but investigations on the genetic basis of fungal pathogen virulence have been largely neglected (Bartoli and Roux, 2017; Genissel 2017). There has been no study on the genetic basis underlying virulence of *Z. tritici* but a few recent ones, advanced by NGS technologies which open new opportunities for non-model species. Since the publication of the first complete genome of *Z. tritici* (Goodwin et al., 2011), two main approaches are thus employed to dissect the genotype-phenotype link for the quantitative variation of virulence among *Z. tritici* populations: bi-parental QTL mapping using RADseq and Association Genetics using whole genome sequencing. Two QTL mapping studies have been published thus far, revealing QTLs (or genes) of large effect on chromosome 7 (Stewart et al., 2017; Meile et al., 2018). Genome-Wide Association Studies (GWAS) using a sample size > 100 individuals have also identified two effector proteins (gene *Avrstb6* on chromosome 5 by Zhong et al., 2017; Hartmann et al., 2017). It is now becoming quite clear from these

studies that small secreted proteins are key components in the hide-and-seek evolutionary game between the pathogen and its host. In addition, each of these candidate effectors is located near transposable elements (TE) or in AT-rich regions. This might suggest that chromosomal rearrangements caused by TE are setting up the stage for rapid mutation accumulation in functionally relevant genes. Indeed despite the lack of evidence for their contribution to phenotypic variation many other effector genes are fast evolving and are located in regions with a high recombination rate (Poppe et al., 2015; Croll et al., 2015).

In this study we report the virulence level of evolved populations in the laboratory starting from a single clone, after being exposed to *in vitro* environment for many generations. We wanted to test the hypothesis that evolution *in vitro* for one year could affect the ability of the pathogen to invade its host. Pervasive transcriptome rewiring has been previously reported among the evolved strains, highlighting candidate genes which transcription level could be involved in temperature fluctuations adaptation. In addition, we observed more gene expression evolution at tips of core chromosomes as well as on accessory chromosome. In the present study, we used NGS to examine the genetic changes that could be linked to the phenotypic changes. Disease level of 18 evolved strains and the two founder clones (called MGGP01 and MGGP44) was assessed on six cultivars of wheat, which represent a large spectrum of resistance to STB. Main results highlight (i) a more frequent loss of symptoms for the lineages that evolved under fluctuating selection (ii) accessory chromosomes were not lost during the experimental evolution (iii) several mutations were identified among the evolved lineages and resulted in amino-acid changes, including in effector genes.

Materials and methods

Biological material

Z. tritici strains used in this study resulted from an experimental evolution, testing for three different temperature regimes: stable at 17°C, stable at 23°C and a fluctuating regime between these two temperatures. Evolved lineages and ancestral clones used in this study are described in **Figure 1**. The two ancestors correspond to the strains MGGP01 and MGGP44 isolated in 2010 from lesions on cultivar Caphorn and cultivar Apache, respectively. Both strains were collected at the same location (South of France, Auzeville-Tolosane) (43° 53' N - 1° 48' W). Each strain was stored in 30% glycerol at -80°C. For sequencing, 10 strains were used (both ancestors and four evolved lineages derived from each, see **Figure 1**). Since the experimental evolution was conducted at two different temperatures (17°C and 23°C), cell multiplication for NGS was performed at 17°C and 23°C, in 500mL of liquid Potato Dextrose Broth medium, for each of the 10 strains, in the same conditions as for the experimental evolution (Jallet et al., 2019). Prior to phenotyping, aliquots from -80°C stocks were multiplied on petri dishes using Potato Dextrose Agar medium, at 20°C.

For *in planta* experiments we used six bread wheat cultivars which are known to manifest different resistance level against STB in the French fields: Caphorn, Apache, Premio, Courtot, Obelisk and Taichung29 (**Figure 2A**).

Plant infection

Six days prior to inoculation fungal samples were multiplied *in vitro* on PDA medium at 20°C. Spores were diluted to a concentration of 10^7 cells per mL in distilled water, using repeated counting with microglass chambers (Kova Glasstic R Slide 10). Tween 20 was added to the cell suspension to favour the fungal adherence at the leaf surface (0.1% v/v). One negative control (a leaf inoculated with water), was used within each pot, to check for the quality of leaf

development and verify the absence of cross-contaminations of fungal cell suspension between leaves.

We planted 5 seeds, negative control included, per fungal genotype for each experiment. Five independent replicated experiments were conducted, thus totalizing 25 plants for each plant genotype-by-fungal genotype interaction. Before and after inoculation, plants were maintained in a large growth chamber (16h/8h day/night, 22°C/18°C, 80%/95% relative humidity). Leaf inoculation was performed on 14 days-old seedlings by painting cell suspensions onto a segment of 7 cm of the first true leaf. To enable fungal dispersion at the leaf surface, plants were maintained for 2.5 days at a higher humidity rate of 100%. At 12 days post inoculation (dpi), plants were watered with nutritive solution (*PlantProd* fertilizer). At 21 dpi, we monitored the quantitative variation of symptoms by visual inspection using binoculars. We annotated for each inoculated leaf the percentage of leaf area covered with lesions (pycnidia) (PLACL).

Genomic DNA extraction

DNA was isolated for 10 lineages (**Figure 1**). Since the experimental evolution was conducted at two different temperatures, cell suspension and whole genome sequencing were also conducted at 17°C and 23°C. Snap frozen lyophilized mycelium (LYOVAC™, Steris) was grinded and vortexed in 14mL Lysis buffer at 65°C and incubated for 30 minutes at 65°C. Then samples were gently mixed in 3M Sodium Acetate pH5.2, incubated on ice for 30min and centrifuged at 10,000G for 15min at 4°C. Supernatant was transferred onto 0.7 volume of cold absolute isopropanol. Samples were centrifuged at 6,000G for 10min at 4°C, and pellets were washed in 4mL of cold 70% ethanol. Air-dried pellets were re-suspended in 4.3 mL of Tris-EDTA. After RNase treatment, nucleic acids were extracted using Phenol *chloroform*. DNA

precipitation was done using Ammonium Acetate 7.5M and absolute ethanol. Each sample was re-suspended in very low Tris-EDTA buffer.

Illumina sequencing and variant calling procedure

Genomic DNA was sequenced via the Illumina HiSeq 2000 (Genewiz, Leipzig). Short sequence reads were trimmed using Trimmomatic v0.32 (Bolger et al., 2014) and aligned to the masked reference genome (Goodwin et al., 2011), using BWA v0.7.15 (Li et al., 2009). Alignments were converted to BAM using SAMtools v0.1.4 (Li et al., 2009). The percentage of IPO323 chromosomes covered by reads for each sample was calculated via BEDtools genomecov (Quinlan and Hall, 2010).

In order to identify SNPs and short indels segregating among the different lineages used in this study, we extracted variants from each sample using the GATK v-3.3-1-0 (McKenna et al., 2010) HaplotypeCaller with the following parameters: Samples were pooled using GenomeAnalysisTK with the following parameters: `-T genotypeGVCFs GVCF --variant_index_type LINEAR --max_alternated_alleles 4 -ploidy 1`. Identified SNPs and short indels were filtered using VariationFiltration `--filterExpression "QD < 2.0 || FS > 60.0 || MQ < 40.0"`. The impact of each variable site on annotated genes was estimated using SnpEff v 4.3 (Cingoolani et al., 2012), and variant effects on the secretome were obtained using SnpSift v4.3 (Cingoolani et al., 2012) and a bed file from Morais Do Amaral et al., 2012.

Statistics

To estimate the significance of symptom differences among the fungal lineages we analyzed symptoms independently for each wheat cultivar. We used the following mixed linear model with the R package *nlme*:

$$D \sim B_i + S_j + B_i * S_j + \text{RegREP}(\text{Vir}(L)),$$

where D is the disease symptoms, B_i is the fixed effects of the genetic background ($i = \text{MGGP01}$ or MGGP44), S_j is the fixed effect of the evolutionary status of fungal samples ($j = \text{ancestral, evolved at } 17^\circ\text{C, evolved at } 23^\circ\text{C}$ or evolved under fluctuations), $B_i * S_j$ the interaction term. For each genetic background, the three lineages per selection regime were included (see **Figure 1**). This level of replication was considered random (*RegREP*), and both virulence assay (*Vir*) and leaf (*L*) were nested random effects within the regime replicate effect.

For each genetic background, we calculated the contrasts between the evolutionary status S_j effect using *mutlcomp* R package and FDR threshold at 5% (Benjamini-Hochberg, 1995).

Results

Quantitative variation of disease symptoms among wheat cultivars

Knowledge on the genetic basis of resistance level among wheat cultivars is incomplete (Brown et al., 2015). In the present panel comprising six cultivars, only 4 resistance QTLs have been identified so far: *Stb4* and *Stb11* in Apache (Ghaffari et al. 2011), *Stb6* in Caphorn (Zhong et al. 2017), and *Stb9* in Courtot (Chartrain et al., 2009) (**Figure 2B**).

Although phenotypic distribution of disease symptoms was sometimes dispersed (see for example boxplots of ancestors *MGGP01* and *MGGP44* on cultivar *Premio*), we still detected significant differences of symptom between ancestors and the evolved lineages.

Significant decrease of virulence of evolved lineages

For the *in vitro* regimes of evolution, the significant effects we detected were exclusively associated with a reduced ability to make symptoms. The decrease of symptom was highly dependent on the wheat cultivar and on the fungal genetic background (MGGP01 or MGGP44). The **Figure 3** illustrates the symptom distribution of each cultivar separately. For the most susceptible cultivars Obelisk and Taichung29, significant loss of symptoms was varying between regimes and background genotypes, but on both cultivars, the strains MGGP01 that evolved under fluctuation were much less virulent than the ancestor. For the cultivar Premio, lineages from MGGP01 genetic background that evolved under fluctuations made significantly less symptoms than their ancestor. Likewise, lineages from MGGP44 genetic background that evolved at 17°C made significantly less symptoms. For the cultivar Apache, we found that evolving under thermal fluctuations or at 17°C resulted in a significant decrease of symptoms for MGGP44 genetic background.

When comparing the two stable regimes of evolution, more significant loss of symptoms were found after evolution at 17°C rather than after evolution at 23°C (7 out of 10 comparisons) (**Table 1**). Although not significant, two out of the three remaining comparisons displayed a similar tendency ($P \leq 0.1$) between these two selection regimes. The same pattern was observed when we compared the symptoms between fluctuation and 23°C selection regimes, with 8 out of 10 comparisons with a greater loss of symptoms after evolution under fluctuation rather than after evolution at 23°C (**Table 1**). This suggests that both evolution at 17°C and under temperature alternating between 17°C and 23°C affected the disease level more severely compared to a stable temperature of 23°C. In addition, while the fluctuating selection regime caused rarely significantly less symptoms the selection at 17°C (3 cases, all for genetic background MGGP01), the opposite pattern was not observed.

No loss of accessory chromosomes

We estimated the coverage along the whole genome to check whether the number of accessory chromosomes was variable after the experimental evolution *in vitro*. Our data suggest, despite visible polymorphism between the two genetic backgrounds, that there is no loss of accessory chromosomes among the sequenced lineages (**Figure 4**).

Pattern of mutation accumulation between the evolved lineages:

We observed on average 0.06% of the genome with mutations that were identified among the evolved lineages (**Table 2**). Since we used only one tool in our bioinformatics pipeline we have to be cautious with the interpretation of these results. Further bioinformatics investigation is required. Likewise, further validation using Sanger sequencing for a subset of the mutations will be helpful to confirm these results. Nonetheless the distribution of SNPs along the genome is rather peculiar with a repeated pattern between genotypes and regimes, for the most part (**Figure 5A**). For small insertion-deletions, the distribution of variable sites appeared to be more random (**Figure 5B**). A combined search of small scale with large scale mutations using tools dedicated to identifying structural rearrangements should provide more insights into the nature and the distribution of accumulated mutations during the experimental evolution.

Effect of mutation accumulation on the secretome.

Considering the predicted secretome annotation defined by Morais Do Amaral et al. (2012), we identified mutations within genes which are predicted proteins to play a key role by counteracting the host immune response. Our results show a few mutations accumulated in some of these genes, which are dispersed across the genome. **Figure 6** reports the total number of these mutations by category of functional effect of the nucleotide substitution, either located in exons (synonymous or non-synonymous), introns, 5 prime- and 3 prime-untranslated regions (UTRs) (no stop codon mutation were detected) (**Figure 6A** and **6B**). We see a large number

of non-synonymous mutations for both backgrounds (**A** and **B**) and also a large number of mutations in introns for MGGP44. While effectors are expected to cumulate variants due to positive or diversifying selection due the host immune system selection pressure, the observation of a greater number of non-synonymous than synonymous after *in vitro* evolution is rather surprising. In addition, we report the mutational effects of identified small insertion deletions that were also located in this set of coding regions (**Figure 6C** and **6D**). We detected a few disruptive effects of indels. For both backgrounds, we found an excess of intronic and frameshift mutations. In conclusion, first we need to validate the nature and location of these variants before pursuing in the quest of understand rather these mutations play a role for adaptive evolution during our experiment.

Discussion

This work represents the first attempt towards understanding the influence of the selection under variable environment on the virulence level of the fungus *Z. tritici*, using experimental evolution. Using a panel of six wheat cultivars which are gradually different for their resistance level against *Z. tritici*, our results support a loss of virulence although the phenotypic response between evolved lineages is often heterogeneous. Our results also suggest that a complex genetic basis is underlying the quantitative variation of pycnidiae produced by the pathogen, in agreement with former studies, also suggesting that many unknown molecular factors – most likely of small or moderate effect– contribute to the phenotype (Stewart et al., 2017). Due to the lack of power in our study we did not investigate the link between genotype and phenotype through association tests. However we were still interested to seek new mutations in the evolved lineages that could be of strong relevance regarding to their function. To reach this goal, we annotated all mutations in the secretome, and found a few sites and small indels that were variable between the evolved lineages and their ancestor. The nature of these

mutations (such as amino-acid substitutions or for example mutations disrupting the reading frame of genes) highlights the high potential of this fungal species for rapid evolution. Whether they are truly associated with the observed decrease of virulence remains to be elucidated. These new alleles were either unique to a lineage, or shared between lineages. Trans-lineage polymorphism is not an expected result if we consider that mutations accumulated following a random walk during the process of evolution.

A recent study evidenced a loss of entire chromosomes belonging to the dispensome after a few transfer of *Z. tritici in vitro* (Möller et al., 2018). The opposite result found in our experiment is rather surprising. Our analysis on genome reads thus require a more thorough approach by combining different bioinformatics tools such as Delly2, SNVator which can reveal large structural rearrangements (SV). These SV are well known in *Z. tritici* from studies comparing natural population samples. The extent of coverage difference along the genome between the two strains that were used as ancestors for our experimental evolution is indeed another illustration that SV are ubiquitous in *Z. tritici* populations. It is known that many rearrangements occur during meiosis (Croll et al., 2015; Fouché et al., 2018). In conclusion our results suggest that during mitosis this type of rearrangements may occur less frequently. An explanation for the discrepancy on the maintenance of the genome integrity between studies is the genotype effect. Maybe some strains are more prone than others to lose their accessory chromosomes during *in vitro* conditions. An alternative explanation we want to propose is the effect of the medium on which the fungus is fed during the course of the experiments. Indeed a recent paper where the authors compared the differences of transposable element expression between nutrient-rich and nutrient-deprived culture mediums (Fouche et al, preprint). These results suggest that culture medium can affect structural rearrangements driven by TE transpositional activity.

We focused this study on genes belonging to the secretome. However, many other variable sites were detected when the allele in evolved lineages were compared to the ancestor alleles. We cannot exclude that some of these mutations are also contributing to the decrease of the disease observed among the evolved lineages. First, all effector proteins are likely not yet annotated (including genes that could be present in our two ancestor but absent from the reference genome of the strain IPO-323 (Plissonneau et al., 2018)). Second, other mutations in the genome could affect the level of virulence. Whether these mutations are regulatory or coding, on effector genes or not, this suggest there might antagonistic pleiotropy for some genes that contribute both to the growth *in vitro*, and the development of the *pathogen in planta*. A former QTL study on *Z. tritici* identified several candidate genes with pleiotropic effect, affecting both melanisation and morphology (Lendenmann et al. 2016).

Conclusion

Overall, these results suggest that the abiotic environment can influence the course of evolution of the pathogen *Z. tritici* and thus is very important to consider for the management strategies to control the pathogen populations.

References

- Bartoli C and Roux F, 2017 Genome-Wide Association Studies In Plant Pathosystems: Toward an Ecological Genomics Approach. *Frontiers Plant Sci.* 8:763.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30: 2114–2120.
- Brown JK, Chartrain L, Lasserre-Zuber P, Saintenac C. 2015 Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding. *Fungal Genet Biol.* 2015 Jun; 79:33-41.
- Cheng, C, Gao X, Feng B, Sheen J, Shan L, He P 2013. Plant immune response to pathogens differs with changing temperatures *Nat Commun.* 4:2530. doi: 10.1038/ncomms3530
- Cingolani P, Platts A, Wang le L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin).* 2012 6:80–92. doi:10.4161/fly.19695
- Croll D, Lendenmann MH, Stewart E, McDonald BA. 2015. The impact of recombination hotspots on genome evolution of a fungal plant pathogen. *Genetics* 201:1213–28
- Fones H, Gurr S. 2015. The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: an EU perspective. *Fungal Genet Biol* 79: 3–7
- Fouché S, Badet T, Oggenfus U et al. preprint Stress-driven transposable element de-repression dynamics in a fungal pathogen
- Fouché S, Plissonneau C, McDonald BA, 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(6):1416–1429.
- Genissel A, Confais J, Lebrun M-H, Gout L. 2017 Association Genetics in Plant Pathogens: Minding the Gap between the Natural Variation and the Molecular Function. *Front Plant Sci.* 8: 1301.
- Goodwin SB, Ben M'Barek S, Dhillon B, Wittenberg AHJ, Crane CF, Hane JK et al. 2011. Finished genome of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* reveals dispensome structure, chromosome plasticity, and stealth pathogenesis. *PLoS Genet* 7: e1002070–17.
- Hartmann FE, Sánchez-Vallet A, McDonald BA, Croll D. 2017. A fungal wheat pathogen evolved host specialization by extensive chromosomal rearrangements. *The ISME Journal* 11: 1189.

Jallet AJ Le Rouzic A A Genissel (20 August 2019). Evolution and plasticity of the transcriptome under temperature fluctuations in the fungal plant pathogen *Zymoseptoria tritici*. bioRxiv 720510.

Kettles GJ, Kanyuka K. 2016. *Front Plant Sci.* 2016; 7:508. Dissecting the Molecular Interactions between Wheat and the Fungal Pathogen *Zymoseptoria tritici*.

Li H, Durbin R. 2009 Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform, *Bioinformatics*, 25:14, 1754–1760

Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009 25:2078–2079.

McKenna, A et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010 20 : 1297-303.

Meile L., Croll D., Brunner P. C., Plissonneau C., Hartmann F. E., McDonald B. A., & Sanchez-Vallet A. (2018). A fungal avirulence factor encoded in a highly plastic genomic region triggers partial resistance to septoria tritici blotch. *New Phytologist*, 219(3), 1048–1061.

Morais do Amaral A, Antoniw J, Rudd JJ, Hammond-Kosack KE. 2012. Defining the predicted protein secretome of the fungal wheat leaf pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS One* 7: e49904.

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*, Volume 19, Issue 9, 602 – 610

Plissonneau C, Hartmann FE, Croll D. 2018 Pangenome analyses of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* reveal the structural basis of a highly plastic eukaryotic genome. *BMC Biol.*16:5.

Poppe S, Dorsheimer L, Happel P, Stukenbrock EH. 2015. Rapidly evolving genes are key players in host specialization and virulence of the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*). *PLoS Pathogens* 11: e1005055.

Quinlan AR, Hall IM, BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features, *Bioinformatics*. 2010 26: 841–42.

R Core Team. 2014 R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, Available at <http://www.R-project.org/>.

Stewart E. L., Croll D., Lendenmann M. H., Sanchez-Vallet A., Hartmann F. E., Palma-Guerrero J. et al. 2017. QTL mapping reveals complex genetic architecture of quantitative virulence in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Molecular Plant Pathology*, 19, 201–216

Upton JL, Zess EK, Bialas A, Wu C-h and Kamoun S 1 The coming of age of EvoMPMI: evolutionary molecular plant-microbe interactions across multiple timescales. *Current opinion in plant biology* 44:108-116.

Velasquez AC, Castroverde CD, He SY 2018 plant-pathogen warfare under changing climate conditions *Current Biology* 28, R619-R634

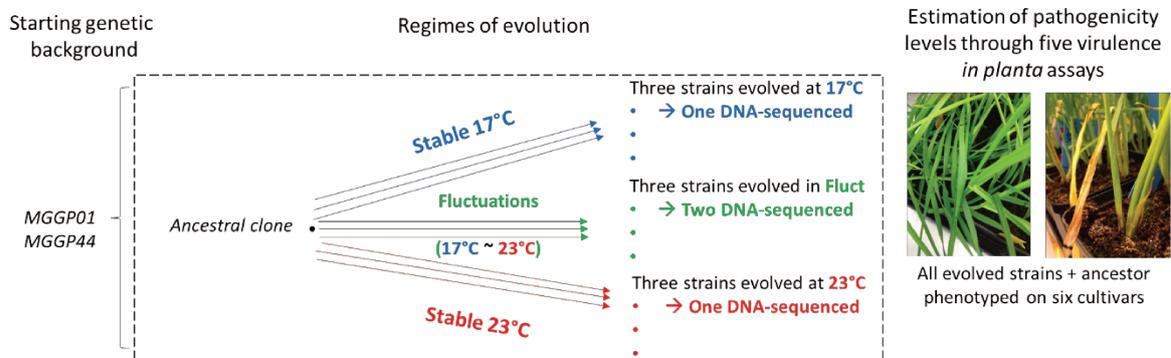


Figure 1 - Experimental evolution design prior to *in planta* phenotyping

From each of the two clonal ancestors (MGGP01 and MGGP44), three replicates per regime evolved in the following conditions: at 17°C, at 23°C and under temperature fluctuations. All evolved lines plus the two ancestors were phenotyped on six wheat cultivars by measuring their ability to cause symptoms *in planta*. In addition, the two ancestors and four evolved lineages from each of them (one Stable_17°C, one Stable_23°C and two fluctuating) were whole-genome sequenced.

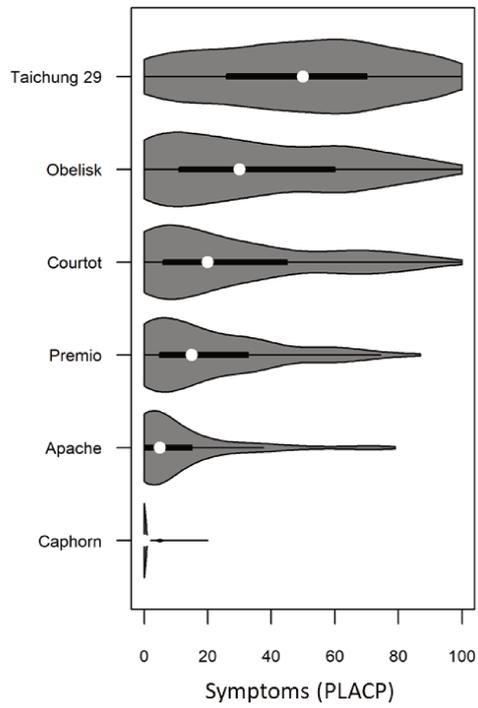
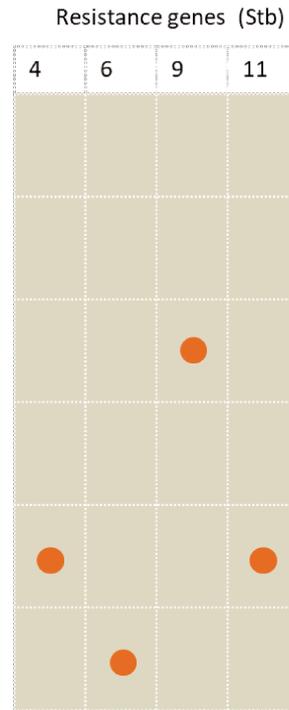
A**B**

Figure 2 - Overall disease symptom distribution for the six bread wheat cultivars

A. Overall distribution across all fungal genotypes (2 ancestors and 18 evolved lineages). **B.** Orange dots indicate the presence of known resistance genes (Stb genes) in the genome of each wheat cultivar (Taichung29, Obelisk, Courtot, Premio, Apache, Caphorn).

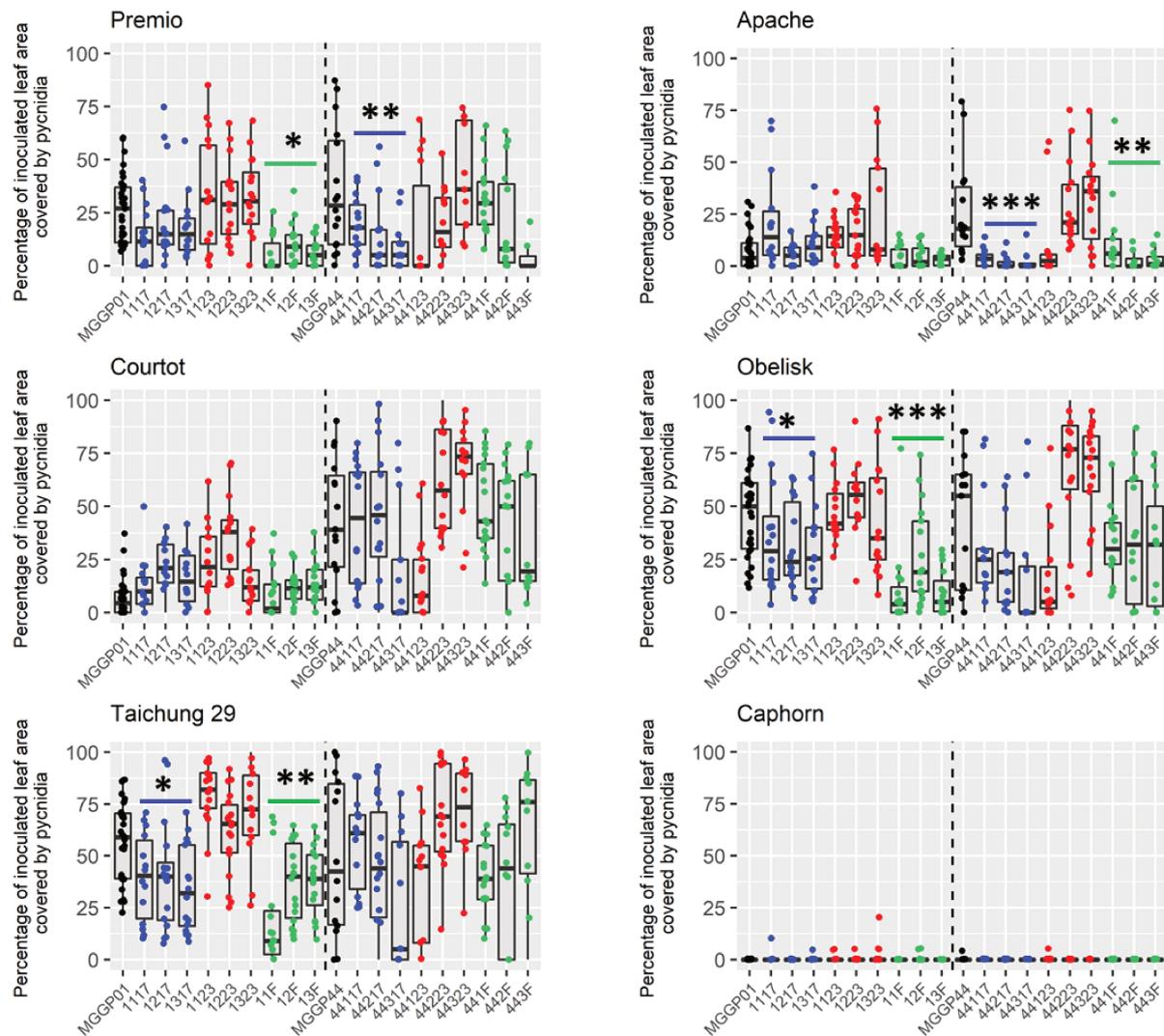


Figure 3 - Symptoms for each wheat cultivar-fungal genotype interaction

Boxplots of the distribution of the percentage of leaf area covered with pycnidia (PLACP) is shown for each wheat-fungus interaction. Selection regimes are indicated by color: ancestors (black); Stable 17°C (blue); Stable 23°C (red); fluctuating (green). Significance level of symptom changes in evolved lineages compared to their ancestor are indicated: * ($p < 0.05$); ** ($p < 0.1$), *** ($p < 0.01$). The vertical dashed line separates lineages of MGGP01 genetic background (*left*) and MGGP44 genetic background (*right*).

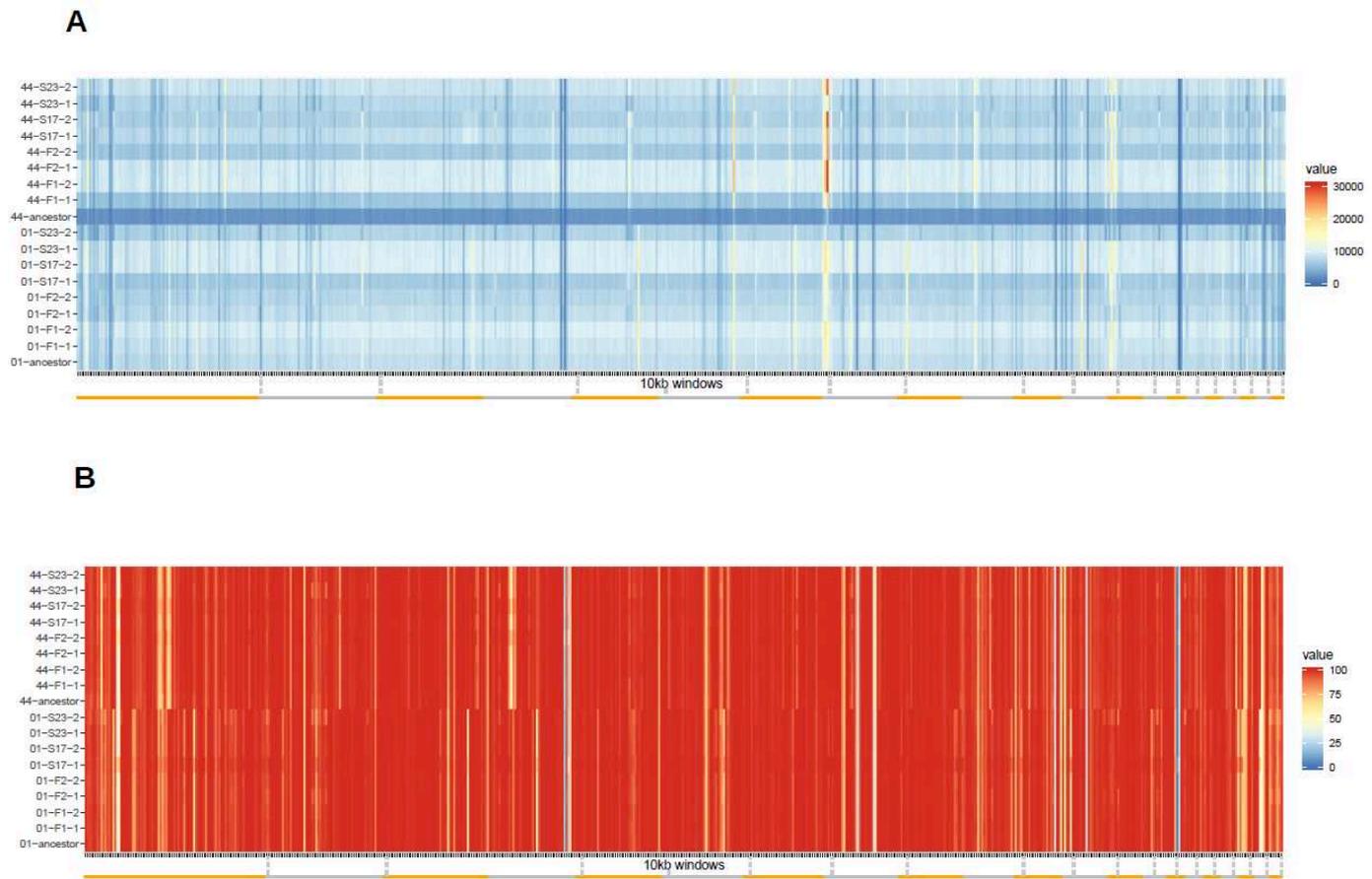


Figure 4 - Whole genome sequencing confirms the presence of 21 chromosomes for all lineages

Coverage heatmaps for all samples showing most of coverage differences are between the two ancestral strains MGGP01 and MGGP44 and the 8 evolved lineages grown at 17°C and 23°C. **A.** Average coverage along the genome (10kb windows) **B.** Percentage of very low coverage (<2X) along the genome (10kb windows). Orange and grey bars under each graph are delimiting the 21 chromosomes.

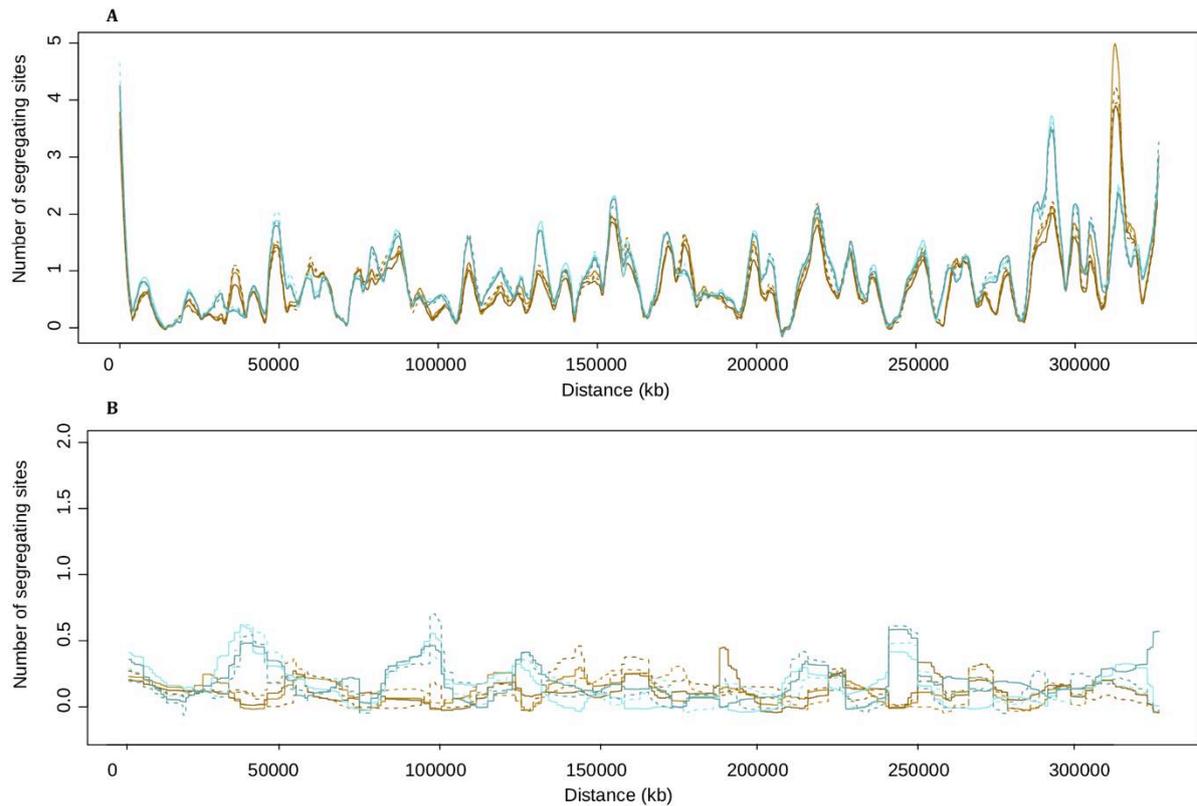
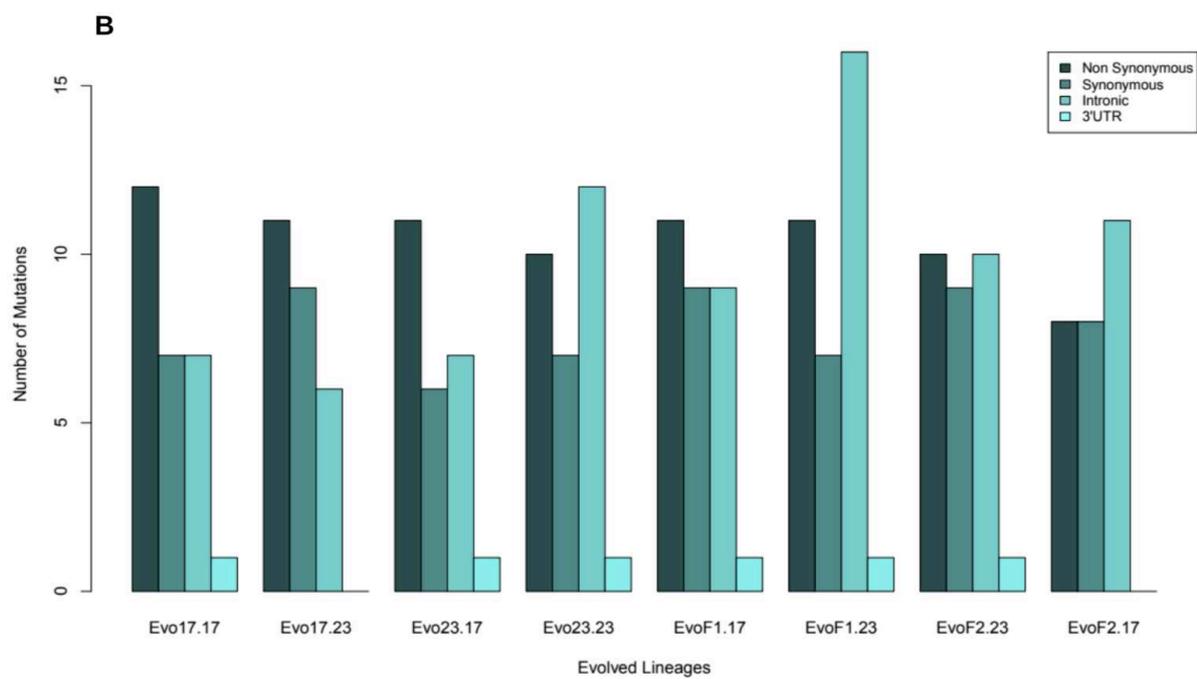
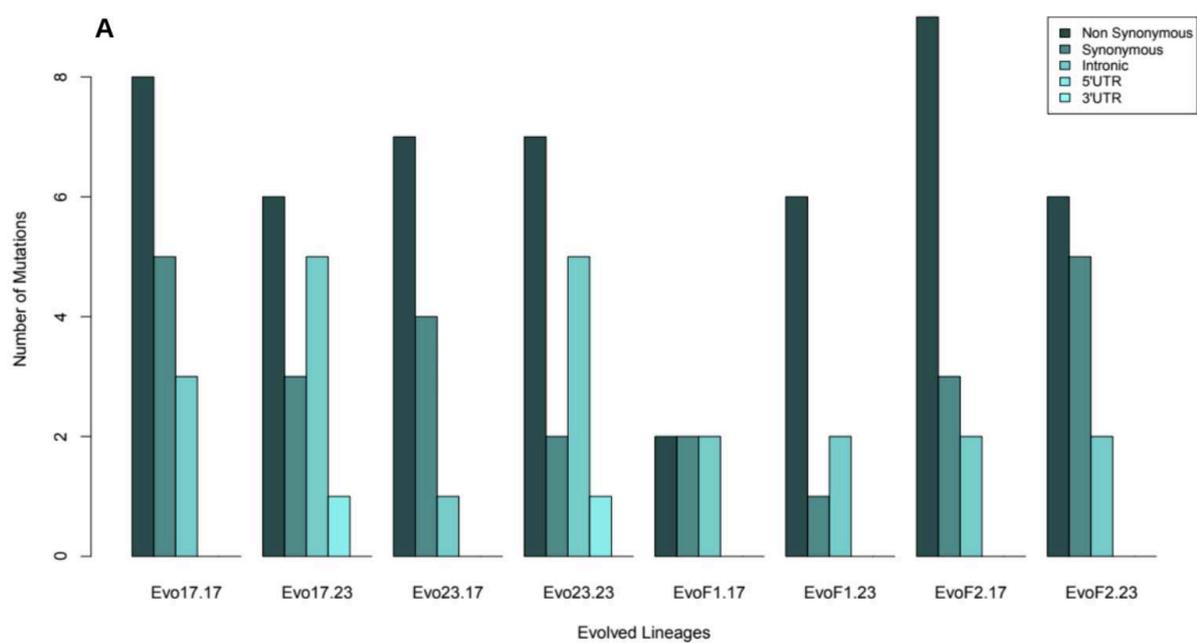


Figure 5 - Number of variable SNPs and short insertion deletions in 10kb sliding windows, with an overlap of 100bp

In total 8 groups of samples are represented: in brown, dashed brown, dark brown and dashed dark brown are for Stable 17°C + ancestor, Stable23°C + ancestor, Fluctuating-1+ancestor and Fluctuating-2 + ancestor, for background MGGP01; the same palette but blue was used for the lineages from the genetic background MGGP44. Note that the presence of the ancestor in each group allows us to identify SNPs that could be monomorphic among all evolved lineages but different from their ancestors. **A**: SNPs ; **B**: short indels.



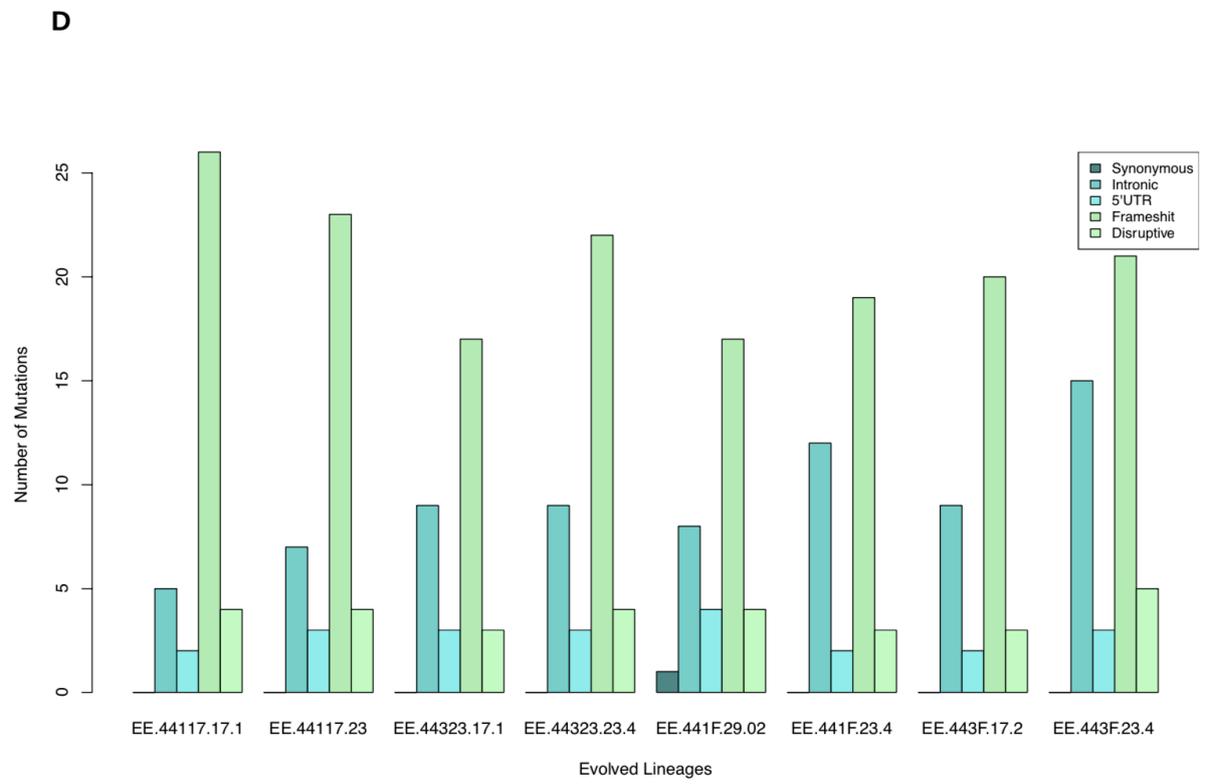
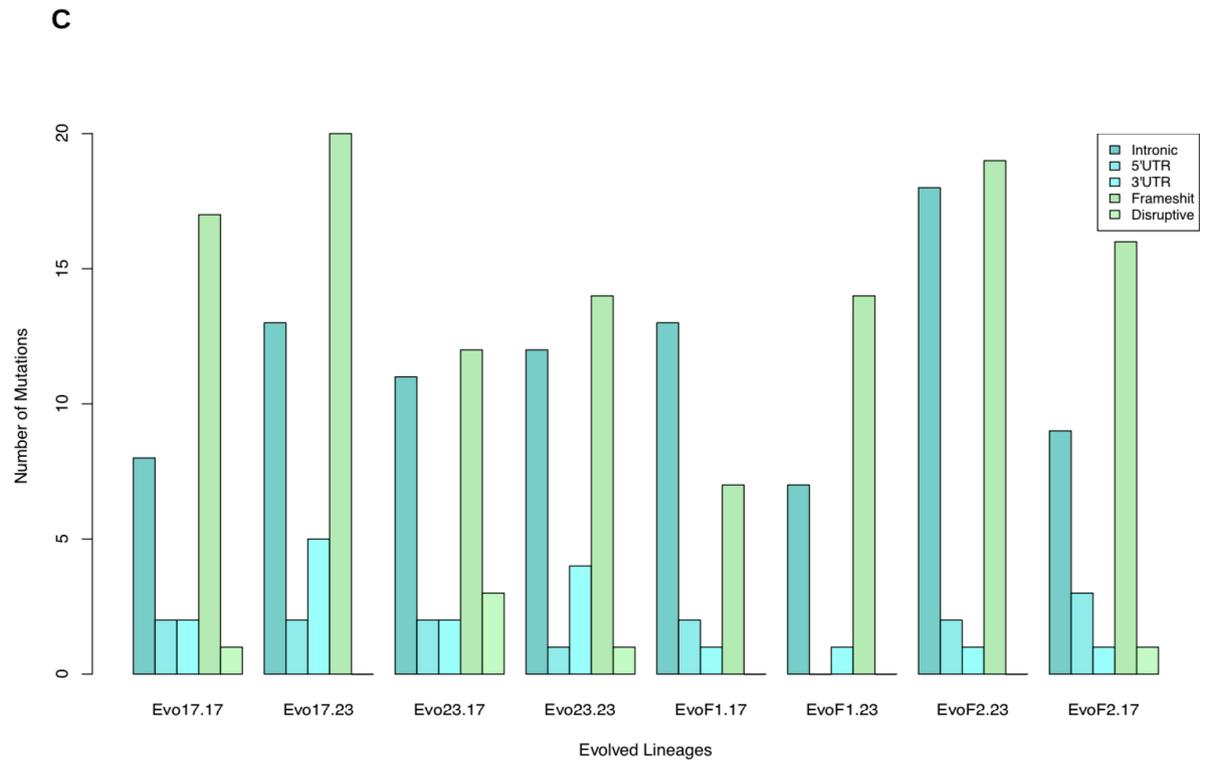


Figure 6 - Number of mutations in genes annotated in *Z. tritici* secretome for the genetic background MGGP01 and MGGP44

Categories of variant annotation were identified using snpSift (Cingolani et al., 2012) **A**: SNPs for MGGP01 **B**: SNPs for MGGP44; **C**: indels for MGGP01; **D**: indels for MGGP44. The location and functional consequences of the mutations are color-coded (see Figure legends).

	23°C vs 17°C		Fluctuations vs 23°C		Fluctuations vs 17°C	
	<i>MGGP01</i>	<i>MGGP44</i>	<i>MGGP01</i>	<i>MGGP44</i>	<i>MGGP01</i>	<i>MGGP44</i>
Premio	3.9 x 10⁻⁴	0.027	4.7 x 10⁻¹⁰	0.49	0.021	0.11
Apache	0.10	2.2 x 10⁻¹⁰	3.2 x 10⁻⁵	8.1 x 10⁻⁷	0.018	0.27
Courtot	0.39	0.090	0.038	0.65	0.44	0.39
Obelisk	6.0 x 10⁻³	1.2 x 10⁻⁶	3.3 x 10⁻¹⁰	8.8 x 10⁻⁴	7.1 x 10⁻⁴	0.17
Taichung	2.2 x 10⁻⁹	6.0 x 10⁻³	3.0 x 10⁻¹³	0.021	0.37	0.64

Table 1 - Comparisons of symptom development between the lineages exposed to different selection regimes

Three selection regimes were used during the experimental evolution: Stable 17°C, Stable 23°C and fluctuating temperature. All comparisons for each genetic background are presented and were tested independently for each wheat cultivars (Premio, Apache, Courtot, Obelisk, Taichung29). FDR adjusted p-values below the 5% threshold are indicated in bold.

MGGP01				MGGP44			
17°C	23°C	F-1	F-2	17°C	23°C	F-1	F-2
26011	25923	23617	25420	29820	29974	28983	29319

Table 2 - Total number of small scale mutations identified per evolved lineage

5. DISCUSSION GENERALE

5.1. Discussion des principaux résultats

5.1.1. Implication de certains gènes lors de l'adaptation aux fluctuations

1/ Existe-t-il des gènes candidats pouvant être responsables des gains de fitness lors de l'évolution en conditions fluctuantes ?

Parmi les gènes que nous avons identifiés lors de l'approche transcriptomique présentée au Chapitre 1, certains sont centraux dans les modules de co-expression auxquels ils appartiennent. C'est le cas notamment de certains gènes impliqués dans la transduction de signaux et que nous avons identifiés parmi les modules contenant des gènes ayant spécifiquement évolué en conditions de fluctuation chez les lignées de fond génétique MGGP01. Concernant ces gènes, quatre d'entre eux issus du module MGGP01_red regroupant des gènes spécifiquement sous-exprimés après évolution en fluctuations, ont retenu notre attention. Ces quatre gènes (*gene_2407*, *gene_2657*, *gene_817*, *gene_9648*) sont tous centraux dans la mesure où leur corrélation à l'eigengène du module est respectivement de 0.93, 0.97, 0.87 et 0.98.

Deux de ces gènes (*gene_2407* et *gene_2657*) codent des protéines dites GAP (*GTPases Activating Proteins*). Celle codée par le gène *gene_2657* appartient à la famille des IQGAP, protéines qui régulent de manière spécifique les GTPases RAS et qui sont connues pour être impliquées, notamment chez la levure, dans la régulation de la dynamique du cytosquelette lors de la division cellulaire (**Epp & Chant 1997** ; rôle de cette famille de protéines dans la régulation du cytosquelette revu dans **Briggs & Sacks 2003**). Ceci est d'autant plus intéressant que nous avons identifié, parmi les gènes ayant spécifiquement évolué en conditions de fluctuations, un enrichissement en termes fonctionnels liés au cytosquelette et que nous savons que les lignées fluctuantes issues de l'ancêtre #MGGP01 présentent une fitness de 30% supérieure à celle de leur ancêtre et qu'elles se divisent donc rapidement (*cf.* Chapitre 2).

Les deux autres protéines identifiées appartiennent à la voie métabolique dite de l'inositol-phosphate, voie connue pour produire – à partir de lipides membranaires – des seconds messagers permettant de répondre à divers types de signaux (**Berridge & Irvine 1984**), notamment chez la levure (**Mutlu & Kumar 2019**). Plus précisément, nous avons identifié une phospholipase C phosphoinositides-spécifique (*gene_9648*) ainsi qu'une phosphatidylinositol-

kinase (*gene_817*). Il est intéressant de noter que le rôle des phosphatidylinositol-kinases dans la prolifération cellulaire est très conservé (Engelman et al. 2006) et que les phospholipases peuvent intervenir en tant que régulateurs de la croissance et de la virulence chez les Eumycètes (Barman et al. 2018).

Finalement, ces quatre gènes dont l'expression est fortement corrélée à beaucoup d'autres gènes du module pourraient jouer un rôle central dans la régulation des divisions cellulaires et constituent donc de bons candidats pour de futures investigations.

2/ Vers la caractérisation de gènes acquérant de la robustesse d'expression lors de l'évolution en conditions fluctuantes

Nos résultats montrent que, de manière globale, l'évolution en conditions thermiques fluctuantes a favorisé la mise en place d'une robustesse du niveau d'expression en réponse aux changements de température. La robustesse du niveau d'expression permet aux cellules d'assurer leur bon fonctionnement en dépit des conditions adverses dans lesquelles certains changements environnementaux peuvent les conduire (López-Maury et al. 2009). Chez les micro-organismes notamment, différents programmes transcriptionnels peuvent être mis en place en cas de stress environnementaux et les gènes répondant à ces derniers possèdent essentiellement des promoteurs avec des boîtes TATA (López-Maury et al. 2009). De plus, il a pu être montré qu'au sein des réseaux de gènes, ce sont les gènes les plus centraux qui confèrent la plus forte robustesse aux changements environnementaux (Cooper et al. 2006). Il serait donc très intéressant de tester sur nos lignées de *Z. tritici* si les gènes ayant spécifiquement acquis de la robustesse d'expression lors de l'évolution en fluctuations sont appauvris en boîtes TATA dans leurs promoteurs et/ou s'ils sont centraux au sein des modules de co-expression que nous avons identifiés.

5.1.2. Répétabilité de l'évolution du niveau d'expression des gènes et mécanismes moléculaires sous-jacents au parallélisme observé entre répliques d'évolution

Lors de l'analyse transcriptomique, nous avons pu observer un parallélisme d'évolution du niveau d'expression de gènes chez les deux lignées ayant évolué en conditions de fluctuations à partir de leur ancêtre respectif : le recouvrement entre répliques d'évolution pour les gènes dont l'expression avait changé significativement était de l'ordre de 70%. Bien que

seuls deux des trois réplicas aient pu être séquencés, ce parallélisme suggère que le niveau d'expression n'a pas uniquement évolué sous l'effet de processus aléatoires (telle la dérive génétique) mais qu'au moins une partie de ces changements répétables soient adaptatifs et résultent des pressions de sélection similaires qui ont été exercées sur les réplicas lors de l'évolution (**Travisano et al. 1995**). Les données transcriptomiques issues d'évolution expérimentale sont relativement rares, mais aussi bien chez *E. coli* que chez *S. cerevisiae*, il a pu être montré un fort parallélisme de l'évolution du niveau d'expression entre réplicas, respectivement entre deux populations après 20 000 générations d'évolution à partir d'un même clone (**Cooper et al. 2003**) et entre trois populations après 250 générations issues d'un même clone ancêtre (**Ferea T. L. et al. 1999**).

Enfin, il serait intéressant de déterminer si la répétabilité observée dans l'évolution du niveau d'expression est associée aux mêmes variants génétiques (qu'ils soient *cis* ou *trans*) et, si oui, à quelle échelle ces changements sont répétables : au niveau du gène, d'une certaine région promotrice, de l'exon et ou de l'intron affecté, du nucléotide ? (**Tenaillon et al. 2012 ; Woods et al. 2006**). Néanmoins, il semble improbable que les changements du niveau d'expression acquis indépendamment fassent intervenir les mêmes mutations, l'accumulation de mutations au cours de l'évolution favorisant l'épistasie et conduisant *in fine* à prévenir la fixation de mutations bénéfiques identiques entre réplicas (**Good et al. 2017**).

5.1.3. Aspects génétiques de l'adaptation de *Z. tritici* en conditions de laboratoire

1/ Des possibilités d'évolution rapide favorisées par la présence d'éléments transposables ?

Nos données RNA-seq montrent que l'évolution du niveau d'expression n'est pas homogène le long du génome. Cette dernière a été particulièrement importante au niveau des régions télomériques des chromosomes essentiels, ainsi que dans certains chromosomes accessoires. Plus précisément, nous trouvons une co-localisation entre évolution du niveau d'expression et présence d'éléments transposables au sein du génome de *Z. tritici*. Le rôle joué par les éléments transposables dans la régulation du niveau d'expression est actuellement reconnu (pour une revue, voir **Cowley & Oakey 2013**).

Chez *Z. tritici*, il a pu récemment être montré que l'insertion d'un élément transposable en amont de la séquence codante d'un facteur de transcription jouait un rôle dans la variation naturelle de la mélanisation présentée par différentes souches (**Krishnan et al. 2018**). De même, un événement d'insertion d'un transposon dans la région promotrice d'un gène codant

un transporteur d'efflux a été identifié comme étant responsable d'un phénotype de résistance à de multiples classes de fongicides ségrégant au sein des populations naturelles (**Omrane et al. 2017**). Enfin, toujours chez *Z. tritici*, une étude de génétique d'association a mis en évidence qu'une délétion liée à l'excision d'un groupe d'éléments transposables était associée à la virulence de *Z. tritici* (**Hartmann et al. 2017**).

Notre analyse génomique, basée sur la technologie Illumina produisant de petits *reads*, ne nous permettait pas d'analyser de manière optimale les événements structuraux (larges indels, translocations, inversions). Nous avons donc tenté d'utiliser une technologie de 3^{ème} génération de type Nanopore (*MinION device*, Oxford Nanopore Technologies®) mais la quantité de *long reads* produits était faible. Notre analyse transcriptomique a toutefois permis de mettre en lumière le fait que les régions riches en éléments transposables du génome de *Z. tritici* évoluent particulièrement rapidement en termes de régulation du niveau d'expression.

2/ Une évolution de *Z. tritici* au laboratoire sans perte de chromosomes accessoires ?

Nos résultats tendent à montrer qu'aucune perte de chromosomes accessoires n'est survenue lors des 48 semaines qu'a duré l'évolution expérimentale, et ce quels que soient le fond génétique et les régimes considérés. En effet, à part dans les chromosomes pour lesquels nous n'observons aucune expression à l'état ancestral (chromosomes 16 et 21 chez #MGGP01 et chromosomes 18 et 21 chez #MGGP44), l'ensemble des autres chromosomes portaient encore, à l'issue de l'évolution, des gènes exprimés. Nos données de séquençage ADN (analyse de couverture) confirment cette vraisemblable absence de perte de chromosomes accessoires. Même si ces résultats sont assez indirects et nécessiteraient, pour être pleinement confirmés, des vérifications plus directes telle qu'une migration en champ pulsé, ils suggèrent que les divisions de *Z. tritici* lors de notre évolution en laboratoire ne se sont pas accompagnées d'une forte instabilité du génome accessoire. Ceci contraste avec une étude récente qui a montré que quatre semaines étaient suffisantes pour que des chromosomes soient perdus lors de cultures *in vitro* (**Möller et al. 2018**). Cette étude a cependant été menée sur un milieu *Yeast-Malt-Sucrose* alors que nous avons utilisé du *Potato-Dextrose-Browth*, rendant les comparaisons non nécessairement pertinentes. D'ailleurs, en ce qui concerne le lien entre milieu de culture et mutations accumulées *in vitro* chez des micro-organismes, une récente étude menée chez *S. cerevisiae* montre que le taux de mutation (et le spectre de leurs effets) varie de manière substantielle selon les milieux de culture, et même entre milieux couramment utilisés en

microbiologie (**Liu & Zhang 2019**). Les auteurs ont également observé ces effets pour les remaniements structuraux de grande ampleur, tels que les pertes/gains de chromosomes.

Dans la communauté européenne travaillant sur *Z. tritici*, il est connu que les stocks de la souche de référence IPO-323 des différents laboratoires présentent une instabilité au niveau du génome accessoire. De manière contradictoire, une telle instabilité n'est pas observée dans notre laboratoire : des séquençages Illumina d'IPO-323 réalisés en 2014 et 2016 montrent que notre souche possède autant de chromosomes accessoires que la souche de référence dont le génome a été publié en 2011 (**Goodwin 2011**). Il est finalement envisageable que certains milieux considérés comme « bénins » soient en réalité plus ou moins stressant pour *Z. tritici* et puissent être associés à des occurrences plus ou moins importantes de remaniements structuraux, allant peut-être jusqu'à des pertes de chromosomes accessoires. D'ailleurs, il a pu être mis en évidence que les stress induit par un manque de carbone pouvaient conduire à l'activation de certains éléments transposables chez *Z. tritici* (**Fouché et al. 2019**, *preprint BioRxiv*, doi:10.1101/633693).

3/ Un effet important du fond génétique dans la réponse aux fluctuations de température

Nos résultats obtenus en transcriptomique soulignent l'importance du fond génétique initial dans la mise en place des différents changements que nous avons pu observer. Ainsi, les trois régimes testés ont conduit à des effets très différents selon l'ancêtre de départ. Cela était d'autant plus vrai lorsque nous nous intéressions à l'effet des fluctuations, ces dernières ayant eu un effet fort et spécifique pour les lignées issues du clone #MGGP01 mais moins fort et surtout non spécifique pour celles issues de #MGGP44. De même, en ce qui concerne la perte de plasticité d'expression après évolution en conditions fluctuantes, celle-ci était nettement plus marquée pour les lignées de fond génétique MGGP01 que pour celles de fond génétique MGGP44. Nous avons aussi noté que la direction préférentielle de plasticité du niveau d'expression présentée par les lignées fluctuantes était opposée entre les deux fonds génétiques.

L'ensemble de ces éléments obtenus au Chapitre 1 montre la très forte variabilité du niveau d'expression en réponse à des changements environnementaux présentée par des souches issues d'une même population. Nos résultats montrent d'ailleurs que, même avant le début de l'évolution, le transcriptome était déjà très différent chez nos deux ancêtres, expliquant en partie la forte interaction génotype-par-environnement que nous avons observée par la suite lors de l'évolution dans les différents régimes. Le rôle éventuel des interactions épistatiques dans le fort effet du fond génétique reste cependant à déterminer. Seules quelques études,

portant essentiellement sur les interactions épistatiques que peuvent entretenir différents effecteurs de la virulence présents au sein du génome, ont pour l'heure été menées sur des champignons phytopathogènes (**Phan et al. 2016 ; Plissonneau et al. 2016**).

5.1.4. Plasticité du transcriptome en réponse aux changements de température

1/ Plasticité ancestrale du transcriptome en réponse aux changements de température : une action ralentissant l'adaptation aux fluctuations thermiques ?

D'après les résultats obtenus au Chapitre 2, les deux clones ancestraux #MGGP01 et #MGGP44 se distinguaient quant à l'effet des fluctuations thermiques sur leur croissance. Chez #MGGP44 la croissance était significativement favorisée en conditions de fluctuations alors que les fluctuations n'avaient pas d'effet significatif sur la croissance de #MGGP01 (la tendance observée était d'ailleurs plutôt à une moindre croissance).

Les mécanismes moléculaires par lesquels #MGGP44 était davantage performant en conditions fluctuantes qu'en conditions stables restent à déterminer. Cependant, les données transcriptomiques du Chapitre 1 peuvent être mises à profit pour tenter d'expliquer les différences que présentent les deux clones ancestraux en réponse aux fluctuations de température. En effet, une proportion bien plus large du transcriptome était plastique en réponse aux changements de température chez #MGGP44 par rapport à #MGGP01 : 1348 gènes (dont 699 DE d'un facteur d'au moins 2 entre les températures 17°C et 23°C) contre 648 gènes (dont 501 DE d'un facteur d'au moins 2). Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que les nombreux changements de niveaux d'expression induits par les variations de température soient en partie responsables de la « pré-adaptation » de #MGGP44 aux fluctuations. Cette pré-adaptation permise par plasticité à l'état ancestral aurait conduit à ralentir l'adaptation de #MGGP44 aux fluctuations lors de notre évolution expérimentale (*cf.* faibles gains de fitness des lignées fluctuantes MGGP44 présentés au Chapitre 2). Cette hypothèse, si elle s'avère vraie, conduit à considérer la plasticité phénotypique davantage comme un frein que comme un moteur à l'évolution, comme cela a pu être proposé (**Price et al. 2003**). En ce qui concerne la divergence transcriptomique des lignées fluctuantes par rapport à leur ancêtre, nous observons en tout cas que celle-ci est moindre (en termes de nombre de gènes différentiellement exprimés) dans le cas de l'évolution été initiée à partir de l'ancêtre le plus plastique : alors que les lignées issues de #MGGP01 présentaient environ 740 gènes DE, celles issues de #MGGP44 en présentaient environ 500.

Ce lien entre plasticité transcriptomique ancestrale et pré-adaptation de #MGGP44 ayant finalement conduit à une moindre évolution adaptative reste cependant à confirmer. Afin d'étudier cela plus en profondeur, il serait nécessaire d'exploiter la variabilité de plasticité d'expression entre différentes souches de *Z. tritici* et d'établir si les différences de plasticité d'expression se traduisent en différences de fitness en conditions fluctuantes. Enfin, il serait également intéressant de mesurer la fitness des lignées dans des conditions de fluctuations exactement similaires à celles qu'elles ont expérimentées lors de leur évolution. Ceci permettrait notamment de confirmer que la plus forte croissance observée pour le clone #MGGP44 n'est pas spécifique aux seules fluctuations de 24h que nous avons pu tester au Chapitre 2.

2/ Plasticité ancestrale du niveau d'expression et évolution du transcriptome lors de l'adaptation : des effets opposés ?

Le fait que la robustesse du niveau d'expression ait majoritairement évolué lors de l'évolution en conditions fluctuantes pourrait suggérer que la plasticité ancestrale présentée par les ancêtres de nos lignées de *Z. tritici* en réponse aux changements de température était essentiellement mal-adaptative. Ci-dessus, nous venons d'envisager que la forte plasticité du transcriptome présentée par l'ancêtre #MGGP44 ait pu limiter son adaptation au régime de températures fluctuantes. Nous allons ici nous intéresser plus spécifiquement à déterminer comment le sens de la plasticité d'expression présentée par les ancêtres a évolué au cours de l'expérience, et notamment au cours de l'adaptation.

Pour les deux fonds génétiques, nous avons vu au Chapitre 2 que la fitness relative des lignées ayant évolué à 23°C était plus élevée lorsqu'elle était estimée en condition de croissance à 23°C qu'à 17°C, et ce de manière significative ou marginalement significative (cas des lignées Stable_23 de fond génétique MGGP01 et MGGP44, respectivement). A 23°C, les fitness relatives des lignées Stable_23 étaient alors supérieures à 25%. Compte tenu de cet effet, nous avons fait l'hypothèse que les changements de niveau d'expression identifiés chez les lignées Stable_23 entre 17°C et 23°C pouvaient être adaptatifs, hypothèse qui par la suite nous a permis d'aller plus loin dans l'étude de la plasticité : pour les gènes présentant un tel différentiel d'expression, nous avons comparé la direction de la plasticité ancestrale avec celle de l'évolution du niveau d'expression lors de l'adaptation à 23°C. En effet, deux situations sont possibles concernant la plasticité ancestrale : soit elle conduit les ancêtres à se rapprocher de

l'optimum d'expression (dans ce cas, la plasticité va dans le « bon sens ») ; soit elle les fait s'éloigner de l'optimum (cas où la plasticité est mal-adaptative). Ici, nous avons donc défini le niveau optimal d'expression comme étant celui présenté par les lignées Stable_23 à la température de 23°C.

Nos résultats montrent que dans 80% des cas la plasticité qui était mise en place chez les ancêtres conduisait à s'éloigner de l'optimum. Cette observation suggère que la plasticité du niveau d'expression des gènes chez les ancêtres était majoritairement mal-adaptative. Ceci est visible sur l'**Annexe 15**, où l'on voit que l'essentiel des points sont situés dans les quadrants « Nord-Ouest » et « Sud-Est » du repère. De plus, comme l'illustrent les droites de régression, plus les changements plastiques étaient intenses dans une certaine direction chez l'ancêtre, plus ces changements étaient fortement « réversés » dans l'autre direction à l'issue de l'adaptation à 23°C.

Ces résultats ne sont évidemment pas une démonstration formelle de la valeur mal-adaptative de la plasticité du niveau d'expression présentée par nos ancêtres et notre définition de l'optimum n'est certainement pas idéale, sans compter que l'ensemble des changements d'expression lors du passage vers un environnement auquel un individu est mieux adapté soit tous nécessairement adaptatifs comme nous en avons fait l'hypothèse ici. Cependant, nos résultats vont dans le sens d'une littérature grandissante montrant que l'essentiel de la plasticité du niveau d'expression en réponse à des changements environnementaux serait plutôt mal-adaptative (**Ghalambor et al. 2015 ; Huang & Agrawal 2016 ;** et voir **Ho & Zhang 2018** pour une méta-analyse de données transcriptomiques obtenues à partir d'évolutions en laboratoire menées notamment sur *E. coli* et *S. cerevisiae*).

5.1.5. Vers une intégration des données transcriptomiques et des données de fitness relative

1/ Divergence transcriptomique des lignées par rapport à leur ancêtre et lien éventuel avec l'adaptation

L'évolution du transcriptome et de la fitness peuvent être deux processus fortement découplés. Ainsi, une étude menée sur *E. coli* a démontré qu'une convergence vers une augmentation adaptative du taux de croissance pouvait faire intervenir des changements transcriptomiques très différents (**Fong et al. 2015**). Chez le nématode *Caenorhabditis*

remanei, il également a pu être montré que le nouveau type de réponse que des individus évolués en laboratoire présentaient face à un stress thermique ne s'accompagnait d'aucune évolution dans la manière dont leur transcriptome était affecté par des changements de température (Sikkink et al. 2014). Examinons ci-dessous si les données du Chapitre 1 et du Chapitre 2 nous permettent d'établir des liens entre divergence transcriptomique et évolution de la fitness relative ou si, comme dans les deux études mentionnées, elles suggèrent plutôt un découplage entre ces deux processus.

Pour les lignées de fond génétique MGGP01, nous observons clairement que le degré de divergence transcriptomique par rapport à l'ancêtre (en termes de nombre de gènes DE) et l'augmentation de la fitness relative sont positivement corrélés. Cette corrélation est significative (*Pearson's correlation coefficient test*, $P = 0.011$). Ainsi, pour les deux phénotypes étudiés ici (divergence d'expression par rapport à l'ancêtre et fitness relative des lignées), nous retrouvons la classification suivante entre lignées : Stable_17 < Stable_23 < Lignées_Fluctuantes. La figure présentée en **Annexe 16** illustre cette corrélation.

Les données obtenues à partir des lignées de fond génétique MGGP44 ne montrent pas cette corrélation (**Annexe 17**, $P = 0.53$ sur le 1^{er} axe ; $P = 0.29$ sur le 2^{ème} axe). Ainsi, bien que la lignée MGGP44 Stable_23 présente une fitness relative bien plus élevée que les trois autres lignées, elle ne se distingue pas particulièrement en transcriptomique.

2/ Croissance en environnements fluctuants et plasticité du transcriptome en réponse aux changements de température

Concernant le lien entre plasticité du niveau d'expression et fitness relative à l'issue de l'évolution, nos données montrent certaines associations intéressantes. Un tableau résumant les fitness relatives des différentes lignées en conditions de fluctuations ainsi que la plasticité d'expression qu'elles présentent en réponse à un changement de température est fourni en **Annexe 18**.

Nous observons que la plasticité du transcriptome en réponse à la température est très contrastée entre lignées de fond génétique MGGP01: la lignée Stable_17 contient plus de 2000 gènes dont l'expression varie avec la température, tandis que les lignées fluctuantes en contiennent environ dix fois moins. Or, en conditions de fluctuations de température, la fitness des lignées fluctuantes est nettement plus élevée que celle de la lignée Stable_17. La lignée MGGP01 Stable_23 se situe quant à elle, autant en termes de fitness relative en conditions de

fluctuations qu'en termes de nombre de gènes dont l'expression est plastique, entre la lignée MGGP01 Stable_17 et les lignées fluctuantes. En faisant l'hypothèse que la plasticité du transcriptome est mal-adaptative, nous comprenons alors que les lignées dont le transcriptome est robuste vis-à-vis des changements de température soient les plus performantes lorsque l'environnement varie.

Pour les lignées de fond génétique MGGP44 en revanche, il n'y a pas de lien évident entre plasticité du transcriptome en réponse aux changements de température et fitness relative en environnement fluctuant : les lignées ayant évolué à 17°C et à 23°C présentent toutes les deux environ 900 gènes dont l'expression est plastique, mais leur fitness relative diffère presque d'un facteur trois.

5.2.Perspectives

5.2.1. Une caractérisation de la dynamique et de la répétabilité de l'évolution à poursuivre

1/ De l'intérêt d'exploiter les échantillons stockés au cours de l'expérience

Une option envisageable pour tenter d'établir des liens entre les changements observés pour les différents phénotypes auxquels nous nous sommes intéressés serait d'exploiter le matériel biologique qui a été régulièrement stocké à -80°C au cours de l'expérience (*i.e.* le « registre fossile » de notre évolution expérimentale). Cela permettrait par exemple de déterminer la séquence temporelle d'apparition de certains phénotypes liés à la croissance des lignées et de voir si ces derniers sont précédés par certains changements transcriptomiques particuliers.

2/ Des résultats appelant la caractérisation du transcriptome des lignées non séquencées

Afin de supporter davantage le caractère adaptatif des changements d'expression répétables que nous avons observés pour les deux lignées fluctuantes séquencées, il serait nécessaire de caractériser la troisième et dernière de ces lignées, qui n'a pas pu être séquencée. Des résultats préliminaires de qPCR menées sur quelques gènes tendent à montrer que le 3^{ème} réplica d'évolution a bien évolué dans le même sens que les deux lignées dont le transcriptome a pu être caractérisé au Chapitre 1. Pour ces gènes, nous avons observé que l'évolution en

conditions stables semble également assez répétable. Ces résultats restent bien évidemment insuffisants pour conclure quant à la répétabilité de l'évolution du niveau d'expression que présentent les répliques d'évolution, mais rendent pertinente la caractérisation par RNA-seq du transcriptome des lignées non séquencées pour l'heure.

5.2.2. Stratégies envisagées pour décrypter le rôle des changements génétiques dans l'évolution du niveau d'expression

1/ Détermination de la base génétique des changements transcriptomiques observés

La base génétique des changements d'expression que nous avons détectés reste entièrement à élucider. Une première approche serait de combiner les données RNA-seq (Chapitre 1) avec celles de génomique obtenues au Chapitre 3. Cela nous permettrait par exemple de déterminer si certains gènes différentiellement exprimés ont des mutations dans leurs régions cis-régulatrices (5', 3', introns). Cependant, cela ne signifierait pas pour autant que les mutations identifiées soient responsables (*i.e. drivers*) des changements d'expression des gènes en question, dans la mesure où il n'y a pas de recombinaison dans notre expérience, ce qui rend délicat l'établissement d'un lien génotype-phénotype. Pour établir ce lien, des croisements entre souches de *Z. tritici* pourraient être effectués, suivis d'une approche de cartographie de *QTL* d'expression. Au laboratoire, la reproduction sexuée de *Z. tritici* en conditions semi-naturelles peut en effet être utilisée pour étudier l'architecture génétique de différents traits quantitatifs (Stewart et al. 2017). Malheureusement les différentes lignées générées lors de notre évolution expérimentale possèdent toutes le même locus sexuel et cette approche n'est donc pas envisageable.

2/ Au-delà RNA-seq en population hétérogène : vers la caractérisation de l'effet individuel des mutations

De manière plus générale, une des limites de l'analyse transcriptomique que nous avons menée est qu'il s'agit d'une analyse en mélange (population hétérogène, ou *bulk* en anglais) ne permettant pas de considérer la variation individuelle du niveau d'expression au sein de la population. Notamment, lorsque plusieurs sous-populations clonales sont en compétition au sein du mélange, il n'est pas possible de distinguer à partir de nos données RNA-seq, ce qui parmi les changements d'expression observés est imputable à un clone plutôt qu'à un autre. Il

est ainsi par exemple possible, en dépit de ce que laissent supposer nos données transcriptomiques et génomiques, qu'une certaine proportion d'individus dans nos populations ait en réalité perdu un (ou plusieurs) chromosome(s) accessoire(s) mais que cela soit passé inaperçu à l'échelle du *bulk*. Seule une approche d'isollements de clones à partir de nos populations évoluées pourrait nous permettre d'aborder cette question. Dans ce cadre, j'ai encadré un étudiant en première année de Master qui a pu isoler, multiplier et stocker plus d'une soixantaine de clones pour chacune des lignées évoluées.

Une méthode couramment utilisée en biologie moléculaire pour déterminer l'effet d'une mutation consiste à effectuer un remplacement d'un allèle par un autre (par une approche de recombinaison homologue). De tels outils existent chez *Z. tritici* (Meile et al. 2018) et nous aurions pu, par exemple, envisager de remplacer une région cis-régulatrice dans laquelle une mutation est apparue lors de l'évolution par la version ancestrale de cette séquence et observer si le niveau d'expression des gènes tel qu'il était chez l'ancêtre était restauré par ce remplacement. Au laboratoire, des approches d'édition du génome par CRISPR-Cas9 sont en développement et permettent également d'envisager la validation – potentiellement au nucléotide près – de l'effet phénotypique de certaines mutations. Enfin, une méthode *single-cell* dite de génotypage de transcriptomes (GoT en anglais, pour *Genotyping of Transcriptomes*) a été développée récemment et permet – à condition d'avoir une connaissance *a priori* des loci impliqués dans la variation du niveau d'expression – d'associer la présence d'une mutation particulière avec certains états transcriptomiques (Nam et al. 2019).

5.2.3. Un rôle des processus épigénétiques qui reste à déterminer lors de notre expérience

Concernant l'origine des modifications transcriptomiques que nous avons identifiées, l'implication d'éventuelles modifications épigénétiques hérissables qui se seraient mises en place au cours de l'évolution dans les différents régimes reste une possibilité qu'il serait intéressant d'explorer. Les variations épigénétiques (*e.g.* méthylations d'ADN et d'histones ; acétylations d'histones), dont certaines sont induites par des stress environnementaux, peuvent en effet altérer le niveau d'expression des gènes – y compris chez les Eumycètes phytopathogènes (Jeon et al. 2014). Nous savons en revanche que les gènes différentiellement exprimés ne sont pas organisés en clusters physiques de gènes tous co-régulés de manière semblable et donc qu'un scénario au cours duquel l'état de compaction de la chromatine se

serait modifié sur de larges régions génomiques est peu crédible pour expliquer nos observations.

5.2.4. Caractérisation des gènes dont l'expression est plastique : des questions encore en suspens

Explorer plus en profondeur l'évolution de la plasticité du niveau d'expression semble intéressant et permettrait d'aborder les questions suivantes : *i*). Y a-t-il un lien général qui se dégage entre évolution du niveau moyen d'expression d'un gène et évolution de sa plasticité d'expression ? *ii*). Au-delà de la simple analyse qualitative de pertes ou de gains de plasticité du niveau d'expression au cours de l'évolution présentée au Chapitre 1, comment se distribuent les amplitudes des gains et pertes de plasticité que nous avons pu identifier et comment varient-elles selon le régime d'évolution ? *iii*). Les gènes dont l'expression est plastique présentent-ils, à une température donnée, une plus forte stochasticité de leur niveau d'expression ? (**Bajić & Poyatos 2012**)

5.2.5. Vers une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents aux pertes de pathogénicité observées

1/ Des pertes de pouvoir pathogène pouvant survenir à différents stades de l'infection du blé par *Z. tritici*

Lors des tests *in planta*, nous avons identifié une perte de pouvoir pathogène parmi les lignées évoluées. Afin de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents aux différences de pathogénicité observées, nous avons réalisé des tests préliminaires en cytologie *in planta*. Nous avons observé le développement des pycnidiospores à la surface des feuilles de blé par coloration au calcofluor-blanc, à une période de quatre jours post-inoculation. Il semble que ni la capacité de germination des spores ni leur pénétration au travers des stomates n'aient été affectées suite à l'évolution *in vitro*. Cela laisse penser que la plus faible quantité de symptômes causée par certaines de nos lignées soit associée à des altérations survenant plus tardivement lors du processus infectieux, après la pénétration du champignon dans la feuille de blé.

2/ Rôle de la température lors de l'infection dans la virulence des lignées et différences selon le régime d'évolution *in vitro*

Enfin, toujours en ce qui concerne le pouvoir pathogène de nos différentes lignées, il serait extrêmement intéressant de voir s'il varie selon l'environnement thermique dans lequel se déroule l'infection. En effet, nous n'avons pas pu tester l'effet des variations de température lors de nos tests *in planta*. Or, nos lignées ont évolué dans des environnements thermiques différents et il aurait été intéressant de savoir si certaines d'entre elles sont plutôt favorisées par certaines températures lors de l'infection. Cela est d'autant plus important que nous aurions alors pu comparer ces résultats avec nos résultats de fitness relative *in vitro* qui, eux, ont été obtenus à différentes températures. Enfin, la façon dont le système immunitaire de la plante met en place des mécanismes de défense lors de l'infection par un pathogène peut être différente selon les conditions de température (Venkatesh & Kang 2019 ; Nobori & Tsuda 2019) et une étude *in planta* menée à différentes températures, bien que complexe, pourrait permettre de mieux appréhender l'interaction entre environnement abiotique, plante hôte et pathogène.

5.2.6. De l'intérêt de développer des approches de génomique en laboratoire chez *Z. tritici*

1/ De nombreuses données génomiques issues d'isolats naturels de *Z. tritici* à exploiter : les études en laboratoire offrent-elles des fenêtres sur l'évolution en conditions naturelles ?

Concernant les mutations que nous avons identifiées dans le Chapitre 3, il pourrait être intéressant de voir si elles ségrégent dans les populations naturelles. En effet, la question de savoir si la sélection en laboratoire peut favoriser des événements survenant en conditions naturelles est encore peu explorée. Nous disposons actuellement de plusieurs centaines de génomes d'isolats de *Z. tritici* et cette importante source d'informations pourrait être mise à profit en comparant ces génomes au set de mutations que nous avons identifié à l'issue de notre évolution expérimentale.

2/ *Zymoseptoria tritici* : une communauté dynamique en génomique mais une espèce qui reste non-modèle

De manière générale, *Z. tritici* est encore loin d'être une espèce dont les outils en génomique sont aussi avancés que pour certaines autres espèces d'Eumycètes (*S. cerevisiae* et *N. crassa*, en particulier). Ainsi, les modèles de gènes proposés par les différentes annotations sont parfois en contradiction, avec des divergences importantes notamment en ce qui concerne les jonctions d'épissage et les coordonnées des régions UTR (*Untranslated 5' and 3' regions*). Des approches telles que le séquençage du transcriptome en *long-reads* permettraient de lever ces ambiguïtés et d'envisager des études transcriptomiques plus fines, notamment en ce qui concerne la production de différentes isoformes d'épissage dans différentes conditions.

6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

<https://www.passioncereales.fr/dossier-thematique/les-c%C3%A9r%C3%A9ales-en-chiffres>

<https://www.ers.usda.gov/topics/crops/wheat/>

<https://planet-vie.ens.fr/article/2597/qu-est-ce-qu-champignon>

https://www.mycosphere.org/pdf/Mycosphere_7_11_5.pdf

Aharoni, A., Gaidukov, L., Khersonsky, O., McQ Gould, S., Roodveldt, C. & Tawfik, D.S. The ‘evolvability’ of promiscuous protein functions. *Nat. Genet.* **37**, 73–76 (2005).

Amarasekare, P. & Johnson, C. Evolution of Thermal Reaction Norms in Seasonally Varying Environments. *The American Naturalist*. **189**, 3:31–45 (2017)

Ames, R. M. & Lovell, S. C. Diversification at transcription factor binding sites within a species and the implications for environmental adaptation. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 3331–3344 (2011).

Amir, A. Is cell size a spandrel? *Elife* **6**, 1–8 (2017).

Anderson, J. B., Sirjusingh, C., Parsons, A.B., Boone, C., Wickens, C., Cowen, L.E. & Kohn, L.M. Mode of Selection and Experimental Evolution of Antifungal Drug Resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **163**, 1287–1298 (2003).

Arribas M. Kubota, K., Cabanillas, L. & Lázaro, E. Adaptation to fluctuating temperatures in an RNA virus is driven by the most stringent selective pressure. *PLoS One* **9**, (2014).

Auld, J. R., Agrawal, A. A. & Relyea, R. A. Re-evaluating the costs and limits of adaptive phenotypic plasticity. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **277**, 503–511 (2010).

Bajić, D. & Poyatos, J. F. Balancing noise and plasticity in eukaryotic gene expression. *BMC Genomics* **13**, 1–20 (2012).

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

Barman, A., Gohain, D., Bora, U. & Tamuli, R. Phospholipases play multiple cellular roles including growth, stress tolerance, sexual development, and virulence in fungi. *Microbiol. Res.* **209**, 55–69 (2018).

Barrett, R. D. H. & Hoekstra, H. E. Molecular spandrels: Tests of adaptation at the genetic level. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 767–780 (2011).

Barrick, J. E., Yu, D. S., Yoon, S. H., Jeong, H., Oh, T.K., Schneider, D., Lenski, R.E. & Kim, J.F. Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. *Nature* **461**, 1243–1247 (2009).

Barrick, J. E. & Lenski, R. E. Genome dynamics during experimental evolution. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 827–839 (2013).

- Bartoli, C. & Roux, F. Genome-Wide Association Studies In Plant Pathosystems: Toward an Ecological Genomics Approach. *Front. Plant Sci.* **8**, (2017).
- Beldade, P., Mateus, A. R. A. & Keller, R. A. Evolution and molecular mechanisms of adaptive developmental plasticity. *Mol. Ecol.* **20**, 1347–1363 (2011).
- Bennett, A. F., Lenski R. E., & Mittler J. E. Evolutionary Adaptation to Temperature. I. Fitness Responses of *Escherichia Coli* to Changes in Its Thermal Environment. *Evolution* **1**, 16-30 (1992).
- Bennett A. F. & Lenski R. E. Evolutionary adaptation to temperature. II. Thermal niches of experimental lines of *Escherichia coli*. *Evolution* **47**:1–12 (1993).
- Bennett, A. F. & Lenski R.E. Evolutionary adaptation to temperature. V. Adaptive mechanisms and correlated responses in experimental lines of *Escherichia coli*. *Evolution* **50**:493-503 (1996).
- Bennett, A. F. & Lenski, R. E. An experimental test of evolutionary trade-offs during temperature adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 8649–8654 (2007).
- Bennett A.F. & Hughes B.S. Microbial Experimental Evolution. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **297**: 17–25 (2009).
- Berridge, M. J. & Irvine, R. F. Inositol triphosphosphate, a novel second messenger in cellular transduction. *Nature* **312**, 315–321 (1984).
- Bertazzoni, S., Williams, A.H., Jones, D.A., Syme, R.A., Tan, K.C. & Hane, J.K. Accessories Make the Outfit: Accessory Chromosomes and Other Dispensable DNA Regions in Plant-Pathogenic Fungi. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **31**, 779–788 (2018).
- Blount, Z. D., Borland, C. Z. & Lenski, R. E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 7899–7906 (2008).
- Blount, Z. D., Barrick, J. E., Davidson, C. J. & Lenski, R. E. Genomic analysis of a key innovation in an experimental *Escherichia coli* population. *Nature* **489**, 513–518 (2012).
- Bódi, Z. *et al.* Phenotypic heterogeneity promotes adaptive evolution. *PLoS Biol.* **15**, 1–26 (2017).
- Boggs, C. L. The fingerprints of global climate change on insect populations. *Curr. Opin. Insect Sci.* **17**, 69–73 (2016).
- Boixel, A. L., Delestre, G., Legeay, J., Chelle, M. & Suffert, F. Phenotyping Thermal Responses of Yeasts and Yeast-like Microorganisms at the Individual and Population Levels: Proof-of-Concept, Development and Application of an Experimental Framework to a Plant Pathogen. *Microb. Ecol.* **78**, 42–56 (2019).
- Bono, L. M., Smith, L.B. Jr., Pfennig, D.W., Burch, C.L. The emergence of performance trade-offs during local adaptation : insights from experimental evolution. *Molecular Ecology* **26**, 1720–1733 (2017).
- Brem, R. B., Yvert G., Clinton R., & Kruglyak L. Budding Yeast Genetic Dissection of Transcriptional Regulation in Budding Yeast. *Science* **296**: 752:755 (2002).
- Brem, R. B. & Kruglyak, L. The landscape of genetic complexity across 5,700 gene expression traits in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 1572–1577 (2005).
- Briggs, M. W. & Sacks, D. B. IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. *EMBO Rep.* **4**, 571–574 (2003).

- Brown, J. K. M., Chartrain, L., Lasserre-Zuber, P. & Saintenac, C. Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding. *Fungal Genet. Biol.* **79**, 33–41 (2015).
- Brunner, P. C., Stefanato, F. L. & McDonald, B. A. Evolution of the CYP51 gene in *Mycosphaerella graminicola*: Evidence for intragenic recombination and selective replacement. *Mol. Plant Pathol.* **9**, 305–316 (2008).
- Burke, M. K., Dunham, J. P., Shahrestani, P., Thornton, K. R., Rose, M. R. & Long, A. D. Genome-wide analysis of a long-term evolution experiment with *Drosophila*. *Nature* **467**, 587–590 (2010).
- Burke, M. K., Liti, G. & Long, A. D. Standing genetic variation drives repeatable experimental evolution in outcrossing populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Evol.* **31**, 3228–3239 (2014).
- Burnetti, A. J., Aydin, M. & Buchler, N. E. Cell cycle Start is coupled to entry into the yeast metabolic cycle across diverse strains and growth rates. *Mol. Biol. Cell* **27**, 64–74 (2015).
- Chakraborty, S. Migrate or evolve: Options for plant pathogens under climate change. *Glob. Chang. Biol.* **19**, 1985–2000 (2013).
- Chan, Y. F. *et al.* Adaptive Evolution of Pelvic Reduction. *Science* **327**, 302–305 (2010).
- Chen, I. C., Hill, J. K., Ohlemüller, R., Roy, D. B. & Thomas, C. D. Rapid range shifts of species associated with high levels of climate warming. *Science* **333**, 1024–1026 (2011).
- Chen, F., Duan, G. H., Li, D. L. & Zhan, J. Host resistance and temperature-dependent evolution of aggressiveness in the plant pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Front. Microbiol.* **8**, 1–10 (2017).
- Chevin, L. M., Lande, R. & Mace, G. M. Adaptation, plasticity, and extinction in a changing environment: Towards a predictive theory. *PLoS Biol.* **8**, (2010).
- Chou, H. H., Chiu, H. S., Delaney, N. F., Segrè, D. & Marx, C. J. Diminishing returns epistasis among beneficial mutations decelerates adaptation. *Science* **332**, 1190–1193 (2011).
- Condon, C., Cooper, B. S., Yeaman, S. & Angilletta, M. J. Temporal variation favors the evolution of generalists in experimental populations of *Drosophila melanogaster*. *Evolution*. **68**, 720–728 (2014).
- Cooper, V. S. Quantifying the fundamental and realized niche. *BMC Evol. Biol.* **9**, 1–9 (2002).
- Cooper, T. F., Rozen, D. E. & Lenski, R. E. Parallel changes in gene expression after 20,000 generations of evolution in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 1072–1077 (2003).
- Cooper, T. F., Morby, A. P., Gunn, A. & Schneider, D. Effect of random and hub gene disruptions on environmental and mutational robustness in *Escherichia coli*. *BMC Genomics* **7**, 1–11 (2006).
- Corl, A., Bi, K., Luke, C., Challa, A. S., Stern, A. J., Sinervo, B. & Nielsen, R. The Genetic Basis of Adaptation following Plastic Changes in Coloration in a Novel Environment. *Curr. Biol.* **28**, 2970–2977.e7 (2018).
- Couce, A. & Tenaillon, O. A. The rule of declining adaptability in microbial evolution experiments. *Front. Genet.* **6**, 1–6 (2015).
- Cousin, A., Mehrabi, R., Guilleroux, M., Dufresne, M., Van de Lee, T., Waalwijk, C., Langin, T. & Kema G. H. 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 (2006).
- Cowley, M. & Oakey, R. J. Transposable Elements Re-Wire and Fine-Tune the Transcriptome. *PLoS Genet.* **9**, (2013).
- Crawford, D. L. & Oleksiak, M. F. The biological importance of measuring individual variation. *J. Exp. Biol.* **210**, 1613–1621 (2007).
- Croll, D. & McDonald, B. A. The accessory genome as a cradle for adaptive evolution in pathogens. *PLoS Pathog.* **8**, 8–10 (2012).
- Croll, D., Lendenmann, M. H., Stewart, E. & McDonald, B. A. The impact of recombination hotspots on genome evolution of a fungal plant pathogen. *Genetics* **201**, 1213–1228 (2015).
- Cvijović, I., Good, B. H., Jerison, E. R. & Desai, M. M. Fate of a mutation in a fluctuating environment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, E5021–E5028 (2015).
- Dahlhoff, E. P., Fearnley, S.L., Bruce, D.A., Gibbs, A.G., Stoneking, R., McMillan, D.M., Deiner, K., Smiley, J.T. & Rank, N.E. Effects of temperature on physiology and reproductive success of a montane leaf beetle: Implications for persistence of native populations enduring climate change. *Physiol. Biochem. Zool.* **81**, 718–732 (2008).
- Dalal, C. K., Zuleta, I. A., Mitchell, K. F., Andes, D. R., El-Samad, H. & Johnson A.D. Transcriptional rewiring over evolutionary timescales changes quantitative and qualitative properties of gene expression. *Elife* **5**, 1–24 (2016).
- Daverdin, G., Rouxel, T., Gout, L., Aubertot, J.N., Fudal, I., Meyer, M., Parlange, F., Carpezat, J. & Balesdent M.H. Genome Structure and Reproductive Behaviour Influence the Evolutionary Potential of a Fungal Phytopathogen. *PLoS Pathog.* **8**, (2012).
- Dean, R., Van Kann J.A., 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. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* **13**, 414–430 (2012).
- Dean, A. M., Lehman, C. & Yi, X. Fluctuating selection in the Moran. *Genetics* **205**, 1271–1283 (2017).
- DeLong, J. P. Experimental demonstration of a ‘rate-size’ trade-off governing body size optimization. *Evol. Ecol. Res.* **14**, 343–352 (2012).
- Desai, M. M., Fisher, D. S. & Murray, A. W. The Speed of Evolution and Maintenance of Variation in Asexual Populations. *Current Biology* **17**, 385–394 (2007).
- Desai, M. M. & Fisher, D. S. The balance between mutators and nonmutators in asexual populations. *Genetics* **188**, 997–1014 (2011).
- Dewitt, T. J., Sih, A., & Wilson D. S. Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends Ecol. Evol.* **10**, 77–81 (1998).
- Dey, S., Proulx, S. R. & Teotónio, H. Adaptation to Temporally Fluctuating Environments by the Evolution of Maternal Effects. *PLoS Biol.* **14**, (2016).
- Dhar, R., Sägeser, R., Weikert, C. & Wagner, A. Yeast adapts to a changing stressful environment by evolving cross-protection and anticipatory gene regulation. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 573–588 (2013).

- Dhillon, B., Gill, N., Hamelin, R. C. & Goodwin, S. B. The landscape of transposable elements in the finished genome of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *BMC Genomics* **15**, 1–17 (2014).
- Draghi, J. & Wagner, G. P. The evolutionary dynamics of evolvability in a gene network model. *J. Evol. Biol.* **22**, 599–611 (2009).
- Duba, A., Goriewa-Duba, K. & Wachowska, U. A review of the interactions between wheat and wheat pathogens: *Zymoseptoria tritici*, *fusarium* spp. and *parastagonospora nodorum*. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1–21 (2018).
- Duncan, A. B., Fellous, S., Quillery, E. & Kaltz, O. Adaptation of *Paramecium caudatum* to variable conditions of temperature stress. *Res. Microbiol.* **162**, 939–944 (2011).
- Dutreux, F. *et al.* De novo assembly and annotation of three leptosphaeria genomes using oxford nanopore minion sequencing. *Sci. Data* **5**, 1–11 (2018).
- Earl, D. A. & vonHoldt, B. M. STRUCTURE HARVESTER: A Website and Program for Visualizing STRUCTURE Output and Implementing the Evanno Method. *Conservation Genetics Resources* **4**, 359–61 (2011).
- Ehrenreich, I. M. & Pfennig, D. W. Genetic assimilation: A review of its potential proximate causes and evolutionary consequences. *Ann. Bot.* **117**, 769–779 (2016).
- Engelman, J. A., Luo, J. & Cantley, L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 606–619 (2006).
- Epp, J. A. & Chant, J. An IQGAP-related protein controls actin-ring formation and cytokinesis in yeast. *Curr. Biol.* **7**, 921–929 (1997).
- Estep, L. K., Zala, M., Anderson, N.P., Sackett, K.E., Flowers, M., McDonald, B.A. & Mundt, C.C. 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(11)**:1511 (2013)
- Estep, L. K., Torriani S. F. F., Zala, M., Anderson, N. P., Flowers, M. D., McDonald, B. A., Mundt, C. C & Brunner, P. C. Emergence and early evolution of fungicide resistance in North American populations of *Zymoseptoria tritici*. *Plant Pathol.* **64**, 961–971 (2015).
- Etterson, J. R. & Shaw, R. G. Constraint to adaptive evolution in response to global warming. *Science* **294**, 151–154 (2001).
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. Detecting the Number of Clusters of Individuals Using the Software Structure: A Simulation Study. *Mol. Ecol.* **14**, 2611–20 (2005).
- Eyal Z., Schare A.L., Prescott J.M., van Ginkel M. (1987) The Septoria Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management. Mexico, DF: CIMMYT.
- Eyre-Walker, A. & Keightley, P. D. The distribution of fitness effects of new mutations. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 610–618 (2007).
- Falconer, D.S. & Mackay, T.F.C. Introduction to Quantitative Genetics. 4th Edition, *Addison Wesley Longman, Harlow* (1996).

- Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J. K. Inference of population structure using multi locus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**, 1567-87 (2003).
- Fay, J. C. & Wittkopp, P. J. Evaluating the role of natural selection in the evolution of gene regulation. *Heredity (Edinb)*. **100**, 191–199 (2008).
- Feder, M. E. Evolvability of physiological and biochemical traits: evolutionary mechanisms including and beyond single-nucleotide mutation. *J. Exp. Biol.* **210**, 1653–1660 (2007).
- Ferea T. L., Botstein, D., Brown, P. O. & Rosenzweig, R. F. Systematic changes in gene expression patterns following. *Evolution* **96**, 9721–9726 (1999).
- Figueroa, M., Hammond-Kosack, K. E. & Solomon, P. S. A review of wheat diseases—a field perspective. *Mol. Plant Pathol.* **19**, 1523–1536 (2018).
- Fisher, K. J. & Lang, G. I., Experimental evolution in fungi: An untapped resource. *Fungal Genet. Biol.* **94**, 88–94 (2016)
- Fones, H. & Gurr, S. The impact of Septoria tritici Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genet. Biol.* **79**, 3–7 (2015).
- Fong, S. S., Joyce, A. R. & Palsson, B. Ø. Parallel adaptive evolution cultures of Escherichia coli lead to convergent growth phenotypes with different gene expression states. *Genome Res.* **15** 1365–1372 (2005).
- Fouché, S., Plissonneau, C., McDonald, B. A. & Croll, D. 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 (2018).
- Fouché, S., Badet, T., Oggenfuss, U., Plissonneau, T., Francisco, C. S. & Croll, D. Stress-driven transposable element de-repression dynamics in a fungal pathogen. *bioRxiv* 633693 (2019). doi:10.1101/633693
- Francisco, C. S., Ma, X., Zwyssig, M. M., McDonald, B. A. & Palma-Guerrero, J. Morphological changes in response to environmental stresses in the fungal plant pathogen Zymoseptoria tritici. *Sci. Rep.* **9**, 9642 (2019).
- Fudal, I., Ross, S., Brun, H., Besnard, A.L., Ermel, M., Kuhn, M.L., Balesdent, MH. & Rouxel, T. Repeat-Induced Point Mutation (RIP) as an Alternative Mechanism of Evolution Toward Virulence in Leptosphaeria maculans. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **22**, 932–941 (2009).
- Garland, T. & Rose, M. Experimental evolution: concepts, methods, and applications of selection experiments. UNIVERSITY OF CALIFORNIA PRESS, *Berkeley Los Angeles London* (2012).
- Genissel, A., Confais, J., Lebrun, MH. & Gout, L. Association Genetics in Plant Pathogens: Minding the Gap between the Natural Variation and the Molecular Function. *Front. Plant Sci.* **8**, 8–11 (2017).
- Gerrish, P. J. & Lenski, R. E. The fate of competing beneficial mutations in an asexual population. *Genetica* **102**, 127–144 (1998).
- Ghalambor, C. K., McKay, J. K., Carroll, S. P. & Reznick, D. N. Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Funct. Ecol.* **21**, 394–407 (2007).

- Ghalambor, C. K., Hoke, K. L., Ruell, E. W., Fischer, E.K., Reznick, D. N. & Hughes, K. A. Non-adaptive plasticity potentiates rapid adaptive evolution of gene expression in nature. *Nature* **525**, 372–375 (2015).
- Gibson, G. & Dworkin, I. Uncovering cryptic genetic variation. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 681–690 (2004).
- Gibson, G. & Weir, B. The quantitative genetics of transcription. *Trends Genet.* **21**, 616–623 (2005).
- Gibson G. The environmental contribution to gene expression profiles. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 575–581 (2008).
- Gilchrist, G. W. Specialists and generalists in changing environments. I. Fitness landscapes of thermal sensitivity. *Am. Nat.* **146**, 252–270 (1995).
- Goddard M. R., Godfray H. C. J. & Burt A. Sex increases the efficacy of natural selection in experimental yeast populations. *Nature* **434**, 636–640 (2005).
- Gomez-Mestre, I. & Jovani, R. A heuristic model on the role of plasticity in adaptive evolution: Plasticity increases adaptation, population viability and genetic variation. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **280**, (2013).
- Good, B. H., McDonald, M. J., Barrick, J. E., Lenski, R. E. & Desai, M. M. The dynamics of molecular evolution over 60,000 generations. *Nature* **551**, 45–50 (2017).
- Goodwin, S. B. *et al.* Finished genome of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* reveals dispensome structure, chromosome plasticity, and stealth pathogenesis. *PLoS Genet.* **7**, (2011).
- Gouand, I., Daufresne, T., Gravel, D., Bouvier, C., Bouvier, T., Combe, M., Gougat-Barbera, C., Poly, F., Torres-Barceló, C. & Mouquet, N. Size evolution in microorganisms masks trade-offs predicted by the growth rate hypothesis. *Proc. R. Soc. B* **283** : 20162272 (2016).
- Grandaubert, J., Bhattacharyya, A. & Stukenbrock, E. H. RNA-seq-Based Gene Annotation and Comparative Genomics of Four Fungal Grass Pathogens in the Genus *Zymoseptoria* Identify Novel Orphan Genes and Species-Specific Invasions of Transposable Elements. *G3: Genes|Genomes|Genetics* **5**, 1323–1333 (2015).
- Grandcolas, P., Nattier, R. & Trewick, S. Relict species: A relict concept? *Trends Ecol. Evol.* **29**, 655–663 (2014).
- Graves, J. L., Hertweck, K.L., Phillips, M.A., Han, M.V., Cabral, L.G., Barter, T.T., Greer, L.F., Burke, M.K., Mueller, L.D. & Rose M.R. Genomics of parallel experimental evolution in drosophila. *Mol. Biol. Evol.* **34**, 831–842 (2017).
- Gurung, S., Goodwin, S. B., Kabbage, M., Bockus, W. W. & Adhikari, T. B. Genetic Differentiation at Microsatellite Loci Among Populations of *Mycosphaerella graminicola* from California, Indiana, Kansas, and North Dakota. *Phytopathology* **101**, 1251–1259 (2011).
- Habig, M., Quade, J. & Stukenbrock, E. H. Forward genetics approach reveals host genotype-dependent importance of accessory chromosomes in the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *MBio* **8**, 1–16 (2017).
- Hagai, T. *et al.* Gene expression variability across cells and species shapes innate immunity. *Nature* **563**, 197–202 (2018).

- Hartmann, F. E., Sánchez-Vallet, A., McDonald, B. A. & Croll, D. A fungal wheat pathogen evolved host specialization by extensive chromosomal rearrangements. *ISME J.* **11**, 1189–1204 (2017).
- Haueisen, J., Möller, M., Eschenbrenner, C. J., Grandaubert, J., Seybold, H., Adamiak, H. & Stukenbrock, E.H. Highly flexible infection programs in a specialized wheat pathogen. *Ecol. Evol.* **9**, 275–294 (2019).
- Ho, W. C. & Zhang, J. Evolutionary adaptations to new environments generally reverse plastic phenotypic changes. *Nat. Commun.* **9**, 1–11 (2018).
- Hodgins-Davis, A. & Townsend, J. P. Evolving gene expression: from G to E to $G \times E$. *Trends Ecol. Evol.* **24**, 649–658 (2009).
- Hofmann, E. P., Rautsaw, R. M., Strickland, J. L., Holding, M. L., Hogan, M. P., Mason, A. J., Rokyta, D. R. & Parkinson, C.L. Comparative venom-gland transcriptomics and venom proteomics of four Sidewinder Rattlesnake (*Crotalus cerastes*) lineages reveal little differential expression despite individual variation. *Sci. Rep.* **8**, 1–15 (2018).
- Huang, Y. & Agrawal, A. F. Experimental Evolution of Gene Expression and Plasticity in Alternative Selective Regimes. *PLoS Genet.* **12**, 1–23 (2016).
- Huerta-Sanchez, E., Durrett, R. & Bustamante, C. D. Population genetics of polymorphism and divergence under fluctuating selection. *Genetics* **178**, 325–337 (2008).
- Huey, R. B., Hertz, P. E. & Sinervo, B. Behavioral Drive versus Behavioral Inertia in Evolution: A Null Model Approach. *Am. Nat.* **161**, 357–366 (2003).
- Hudson, R. R., Slatkin M. & Maddison W.P. Estimating levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* **13**, 583–589 (1992).
- Hufford, L., Gomulkiewicz, R., Schlichting, C. D. & Pigliucci, M. Phenotypic Evolution: A Reaction Norm Perspective. *Syst. Bot.* **24**, 686 (2006).
- Hughes, B. S., Cullum, A. J. & Bennett, A. F. An Experimental Evolutionary Study on Adaptation to Temporally Fluctuating pH in *Escherichia coli*. *Physiol. Biochem. Zool.* **80**, 406–421 (2007a).
- Hughes, B. S., Cullum A. J., and Bennett A.F. Evolutionary adaptation to environmental acidity in experimental lineages of *Escherichia coli*. *Evolution* **61**:1725–1734 (2007b).
- Idnurm, A. & Howlett, B. J. Analysis of loss of pathogenicity mutants reveals that repeat-induced point mutations can occur in the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*. *Fungal Genet. Biol.* **39**, 31–37 (2003).
- Jacob, F. & Monod, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* **3**, 318–356 (1961).
- Jeon, J., Kwon, S. & Lee, Y. H. Histone acetylation in fungal pathogens of plants. *Plant Pathol. J.* **30**, 1–9 (2014).
- Jones J. D. G and Dangl J.L. The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329 (2006).
- Kao, K. C. & Sherlock, G. Molecular characterization of clonal interference during adaptive evolution in asexual populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Genet.* **40**, 1499–1504 (2008).

- Karve, S. M., Bhave, D., Nevgi, D. & Dey, S. Escherichia coli populations adapt to complex, unpredictable fluctuations by minimizing trade-offs across environments. *J. Evol. Biol.* **29**, 2545–2555 (2016).
- Kassen, R. The experimental evolution of specialists, generalists, and the maintenance of diversity. *J. Exp. Biol.* **15**, 2:173-190 (2002).
- Kawecki T. J. The evolution of genetic canalization under fluctuating selection. *Evolution* **54**: 1-12 (2000).
- Kawecki, T. J., Lenski, R.E., Ebert, D., Hollis, B., Olivieri, I., Whitlock, M. C. Experimental evolution. *Trends Ecol. Evol.* **27**, 547–560 (2012).
- Kellner, R., Bhattacharyya, A., Poppe, S., Hsu, T. Y., Brem, R. B. & Stukenbrock, E. H. Expression profiling of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* reveals genomic patterns of transcription and host-specific regulatory programs. *Genome Biol. Evol.* **6**, 1353–1365 (2014).
- Kema, G. H., Yu, D.Z., Rijkenberg, F.H.J., Shaw, M.W. & Baayen, R.P. Histology of the Pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in Wheat. *Phytopathology* **86**, 777-786 (1996a).
- Kema, G. H. J., Verstappen, E. C. P., Todorova, M. & Waalwijk, C. Successful crosses and molecular tetrad and progeny analyses demonstrate heterothallism in *Mycosphaerella graminicola*. *Curr. Genet.* **30**, 251–258 (1996b).
- Kenkel, C. D., Setta, S. P. & Matz, M. V. Heritable differences in fitness-related traits among populations of the mustard hill coral, *Porites astreoides*. *Heredity (Edinb)*. **115**, 509–516 (2015a).
- Kenkel, C. D., Almanza, A. T. & Matz, M. V. Fine-scale environmental specialization of reef-building corals might be limiting reef recovery in the Florida Keys. *Ecology* **96**, 3197–3212 (2015b).
- Kenkel, C. D. & Matz, M. V. Gene expression plasticity as a mechanism of coral adaptation to a variable environment. *Nat. Ecol. Evol.* **1**, 1–6 (2017).
- Ketola, T., Mikonranta, L., Zhang, J., Saarinen, K., Örmälä, AM., Friman, V. P., Mappes, J. & Laakso, J. Fluctuating temperature leads to evolution of thermal generalism and preadaptation to novel environments. *Evolution*. **67**, 2936–2944 (2013).
- Ketola, T., Kellermann, V. M., Loeschke, V., López-Sepulcre, A. & Kristensen, T. N. Does environmental robustness play a role in fluctuating environments? *Evolution*. **68**, 587–594 (2014).
- Kettles, G. J. & Kanyuka, K. Dissecting the molecular interactions between wheat and the fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Front. Plant Sci.* **7**, 1–7 (2016).
- Kimura M. The neutral theory of molecular evolution. *Cambridge University Press, Cambridge* (1983).
- Kingsolver, J. G. & Pfennig, D. W. Patterns and Power of Phenotypic Selection in Nature. *Bioscience* **57**, 561–572 (2007).
- Kirschner, R. & Gerhart J. Evolvability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 8420–8427 (1998).
- Koeck, M., Hardham, A. R. & Dodds, P. N. The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. *Cell. Microbiol.* **13**, 1849–1857 (2011).

- Koenig, D. *et al.* Comparative transcriptomics reveals patterns of selection in domesticated and wild tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, E2655–E2662 (2013).
- Krenz, J. E., Sackett, K. E. & Mundt, C. C. Specificity of Incomplete Resistance to *Mycosphaerella graminicola* in Wheat. *Phytopathology* **98**, 555–561 (2008).
- Krishnan, P., Meile, L., Plissonneau, C., Ma, X., Hartmann, F. E., Croll, D., McDonald, B. A. & Sánchez-Vallet, A. Transposable element insertions shape gene regulation and melanin production in a fungal pathogen of wheat. *BMC Biol.* **16**, 1–18 (2018).
- Kubrak, O. I., Nylin, S., Flatt, T., Nässel, D. R. & Leimar, O. Adaptation to fluctuating environments in a selection experiment with *Drosophila melanogaster*. *Ecol. Evol.* **7**, 3796–3807 (2017).
- Lafuente, E., Duneau, D. & Beldade, P. Genetic basis of thermal plasticity variation in *Drosophila melanogaster* body size. *PLoS Genet.* **14**, 1–24 (2018).
- Lang, G. I., Rice, D. P., Hickman, M. J., Sodergren, E., Weinstock, G. M., Botstein, D. & Desai, M.M. Pervasive genetic hitchhiking and clonal interference in forty evolving yeast populations. *Nature* **500**, 571–574 (2013).
- Le Cunff, Y. & Pakdaman, K. Phenotype-genotype relation in Wagner’s canalization model. *J. Theor. Biol.* **314**, 69–83 (2012).
- Leder, E. H., Scott McCairns, R. J., Leinonen, T., Cano, J. M., Viitaniemi H. M., Nikinmaa, M., Primmer, C. R. & Merilä, J. The evolution and adaptive potential of transcriptional variation in sticklebacks - Signatures of selection and widespread heritability. *Mol. Biol. Evol.* **32**, 674–689 (2015).
- Lemmon, Z. H., Bukowski, R., Sun, Q. & Doebley, J. F. The Role of cis Regulatory Evolution in Maize Domestication. *PLoS Genet.* **10**, (2014).
- Lendenmann, M. H., Croll, D., Palma-Guerrero, J., Stewart, E. L. & McDonald, B. A. 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 (2016).
- Lenski R. E., Rose M. R., Simpson S. C. & Tadler S. C. Long-Term Experimental Evolution in *Escherichia Coli*. I. Adaptation and Divergence During 2,000 Generations. *The American Naturalist* **138**, 6: 1315-341 (1991).
- Lenski, R. E. & Travisano, M. Dynamics of adaptation and diversification: A 10,000-generation experiment with bacterial. *Proc. Nati. Acad. Sci.* **91**, 6808–6814 (1994).
- Lenski, R. E. & Mongold, J. A. Experimental rejection of a nonadaptive explanation for increased cell size in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**, 5333–4 (1996).
- Leroi A. M., Lenski, R. E., & Bennett, A. F. Evolutionary adaptation to temperature. III. Adaptation of *Escherichia coli* to a temporally varying environment. *Evolution* **48**, 1222–1229 (1994).
- Le Rouzic, A. & Carlborg, Ö. Evolutionary potential of hidden genetic variation. *Trends Ecol. Evol.* **23**, 33–37 (2008).
- Levis, N. A. & Pfennig, D. W. Evaluating ‘Plasticity-First’ Evolution in Nature: Key Criteria and Empirical Approaches. *Trends Ecol. Evol.* **31**, 563–574 (2016).

- Levy, S. F., Blundell, J. R., Venkataram, S., Petrov, D. A., Fisher, D. S. & Sherlock, G. Quantitative evolutionary dynamics using high-resolution lineage tracking. *Nature* **519**, 181–186 (2015).
- Li, A., Li, L., Wang, W., Song, K. & Zhang, G. Transcriptomics and fitness data reveal adaptive plasticity of thermal tolerance in oysters inhabiting different tidal zones. *Front. Physiol.* **9**, 1–12 (2018).
- Linde, C. C., Zhan, J. & McDonald, B. A. Population Structure of *Mycosphaerella graminicola* : From Lesions to Continents. *Phytopathology* **92**, 946–955 (2002).
- Liu, G. Y. & Nizet, V. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends Microbiol.* **17**, 406–413 (2009).
- Liu, H. & Zhang, J. Yeast Spontaneous Mutation Rate and Spectrum Vary with Environment. *Curr. Biol.* **29**, 1584-1591.e3 (2019).
- Loison, L. Canalization and genetic assimilation: Reassessing the radicality of the Waddingtonian concept of inheritance of acquired characters. *Semin. Cell Dev. Biol.* **88**, 4–13 (2019).
- López-Maury, L., Marguerat, S. & Bähler, J. Tuning gene expression to changing environments: From rapid responses to evolutionary adaptation. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 583–593 (2008).
- Lynch, M., Sung, W., Morris, K., Coffey, N., Landry, C.R., Dopman, E.B., Dickinson, W.J., Okamoto, K., Kulkarni, S., Hartl, D.L. & Thomas, W. K. A genome-wide view of the spectrum of spontaneous mutations in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 9272–9277 (2008).
- Maddamsetti, R., Lenski, R. E. & Barrick, J. E. Adaptation, clonal interference, and frequency-dependent interactions in a long-term evolution experiment with *Escherichia coli*. *Genetics* **200**, 619–631 (2015).
- Majewski, J. & Pastinen, T. The study of eQTL variations by RNA-seq: From SNPs to phenotypes. *Trends Genet.* **27**, 72–79 (2011).
- Mäkinen, H., Papakostas, S., Vøllestad, L.A., Leder E.H. & Primmer C.R. Plastic and evolutionary gene expression responses are correlated in European grayling (*Thymallus thymallus*) subpopulations adapted to different thermal environments. *J. Hered.* **107**, 82–89 (2016).
- Marshall, R., Kombrink, A., Motteram, J., Loza-Reyes, E., Lucas, J., Hammond-Kosack, K.E., Thomma, B.P. & Rudd J.J. 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 (2011).
- McDonald, B. A. and Martinez J. P. DNA Restriction Fragment Length Polymorphisms Among *Mycosphaerella graminicola* (Anamorph *Septoria tritici*) Isolates Collected from a Single Wheat Field. *Experimental Mycology* **15**, 146-158 (1990).
- McDonald B.A., Linde C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu Rev Phytopathol* **40**: 349-379 (2002).
- McDonald, B. A. Using dynamic diversity to achieve durable disease resistance in agricultural ecosystems. *Trop. Plant Pathol.* **39**, 191–196 (2014).
- McDonald, B. A. & Mundt, C. C. How Knowledge of Pathogen Population Biology Informs Management of *Septoria Tritici* Blotch. *Phytopathology* **106**, 948–955 (2016).

- McDonald, M. C., Renkin, M., Spackman, M., Orchard, B., Croll, D., Solomon, P. S., Milgate A. Rapid parallel evolution of azole fungicide resistance in Australian populations of the Wheat Pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Appl. Environ. Microbiol.* **85**, 1–14 (2019).
- McLean, R. C., Bell, G. & Rainey, P. B. The evolution of a pleiotropic fitness trade off in *Pseudomonas fluorescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 8072–8077 (2004).
- Mehrabi, R., van der Lee, T., Waalwijk, C. & Kema, G. H. J. MgSlr2, a Cellular Integrity MAP Kinase Gene of the Fungal Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola*, Is Dispensable for Penetration but Essential for Invasive Growth. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**, 389–398 (2007).
- Meile, L., Croll, D., Brunner, P.C., Plissonneau, C., Hartmann, F.E., McDonald, B. A., Sánchez-Vallet A. A fungal avirulence factor encoded in a highly plastic genomic region triggers partial resistance to septoria tritici blotch. *New Phytol.* **219**, 1048–1061 (2018).
- Melnyk, A. H., McCloskey, N., Hinz, A. J., Dettman, J. & Kassen, R. Evolution of Cost-Free Resistance under Fluctuating Drug Selection in *Pseudomonas aeruginosa*. *mSphere* **2**, 1–14 (2017).
- Meyers, L. A. & Bull, J. J. Fighting change with change: adaptive variation in an uncertain world. *Trends Ecol. Evol.* **17**, 551–557 (2002).
- Mirzadi Gohari, A. *et al.* Effector discovery in the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Mol. Plant Pathol.* **16**, 931–945 (2015).
- Möller, M. & Stukenbrock, E. H. Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 756–771 (2017).
- Möller M., Habig, M., Freitag, M., Stukenbrock, E.H. Extraordinary genome instability and widespread chromosome rearrangements during vegetative growth. *Genetics* **210**, 517–529 (2018).
- Mongold J. A., A. F. Bennett & Lenski R. E. Evolutionary adaptation to temperature. IV. Adaptation of *Escherichia coli* at a niche boundary. *Evolution* **50**, 35–43 (1996).
- Mutlu, N. & Kumar, A. Messengers for morphogenesis: inositol polyphosphate signaling and yeast pseudohyphal growth. *Curr. Genet.* **65**, 119–125 (2019).
- Nam, A. S. *et al.* Somatic mutations and cell identity linked by Genotyping of Transcriptomes. *Nature* **571**, 355–360 (2019).
- Nicotra, A. B. *et al.* Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends Plant Sci.* **15**, 684–692 (2010).
- Nobori, T. & Tsuda, K. The plant immune system in heterogeneous environments. *Curr. Opin. Plant Biol.* **50**, 58–66 (2019)
- Nourmohammad, A., Rambeau, J., Held, T., Kovacova, V., Berg, J. & Lässig M. Adaptive Evolution of Gene Expression in *Drosophila*. *Cell Rep.* **20**, 1385–1395 (2017).
- O’Driscoll, A., Kildea, S., Doohan, F., Spink, J. & Mullins, E. The wheat-Septoria conflict: A new front opening up? *Trends Plant Sci.* **19**, 602–610 (2014).
- Oleksiak, M. F., Churchill, G. A. & Crawford, D. L. Variation in gene expression within and among natural populations. *Nat. Genet.* **32**, 261–266 (2002).

Omrane, S., Audéon, C., Ignace, A., Duplaix, C., Aouini, L., Kema, G., Walker, A.S. & Fillinger, S. Plasticity of the MFS1 Promoter Leads to Multidrug Resistance in the Wheat Pathogen *Zymoseptoria tritici*. *mSphere* **2**, 1–18 (2017).

Orr, H. A. Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 531–539 (2009).

Palma-Guerrero, J., Torriani, S.F., Zala, M., Carter, D., Courbot, M., Rudd, J.J., McDonald, B.A. & Croll D. Comparative transcriptomic analyses of *Zymoseptoria tritici* strains show complex lifestyle transitions and intraspecific variability in transcription profiles. *Mol. Plant Pathol.* **17**, 845–859 (2016).

Palma-Guerrero, J., Ma, X., Torriani, S.F., Zala, M., Francisco, C.S., Hartmann F.E., Croll, D. & McDonald B.A. Comparative Transcriptome Analyses in *Zymoseptoria tritici* Reveal Significant Differences in Gene Expression Among Strains During Plant Infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **30**, 231–244 (2017).

Payne, J. L. & Wagner, A. The causes of evolvability and their evolution. *Nat. Rev. Genet.* **20**, 24–38 (2019).

Pfeifer, B., Wittelsbürger, U., Ramos-Onsins, S. E. & Lercher, M. J. PopGenome: an efficient Swiss army knife for population genomic analyses in R. *Mol. Biol. Evol.* **31**, 1929–1936 (2014).

Phan, H. T. T., Rybak, K., Furuki, E., Breen, S., Solomon P.S., Oliver R.P. & Tan, K.C. Differential effector gene expression underpins epistasis in a plant fungal disease. *Plant J.* **87**, 343–354 (2016).

Philippe, N., Pelosi, L., Lenski, R. E. & Schneider, D. Evolution of penicillin-binding protein 2 concentration and cell shape during a long-term experiment with *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **191**, 909–921 (2009).

Pigliucci, M. Evolution of phenotypic plasticity: Where are we going now? *Trends Ecol. Evol.* **20**, 481–486 (2005).

Pigliucci, M. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *J. Exp. Biol.* **209**, 2362–2367 (2006).

Pigliucci M, Murren C. J, Schlichting C. D. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *Journal of Experimental Biology* **209**: 2362-2367 (2006).

Plissonneau, C., Daverdin, G., Ollivier, B., Blaise, F., Degraeve, A., Fudal, I., Rouxel T. & Balesdent MH. A game of hide and seek between avirulence genes *AvrLm4-7* and *AvrLm3* in *Leptosphaeria maculans*. *New Phytol.* **209**, 1613–1624 (2016).

Plissonneau, C., Hartmann, F. E. & Croll, D. Pangenome analyses of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* reveal the structural basis of a highly plastic eukaryotic genome. *BMC Biol.* **16**, (2018).

Poland, J. A., Balint-Kurti, P. J., Wissler, R. J., Pratt, R. C. & Nelson, R. J. Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends Plant Sci.* **14**, 21–29 (2009).

Poppe, S., Dorsheimer, L., Happel, P. & Stukenbrock, E. H. Rapidly Evolving Genes Are Key Players in Host Specialization and Virulence of the Fungal Wheat Pathogen *Zymoseptoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*). *PLoS Pathog.* **11**, 1–21 (2015).

Price, T. D., Qvarnström, A. & Irwin, D. E. The role of phenotypic plasticity in driving genetic evolution. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **270**, 1433–1440 (2003).

- Pulido, F. The Genetics and Evolution of Avian Migration. *Bioscience* **57**, 165–174 (2007).
- Quaedvlieg, W., Kema, G. H. J., Groenewald, J. Z., Verkley, G. J. M., Seifbarghi, S., Razavi, M., Mirzadi Gohari A., Mehrabi, R. & Crous P. W. Zymoseptoria gen. nov.: A new genus to accommodate Septoria-like species occurring on graminicolous hosts. *Persoonia Mol. Phylogeny Evol. Fungi* **26**, 57–69 (2011).
- Quaedvlieg, W., Verkley, G. J., Shin, H. D., Barreto, R. W., Alfnas, A. C., Swart, W. J., Groenewald, J. Z. & Crous P. W. Sizing up septoria. *Stud. Mycol.* **75**, 307–390 (2013).
- Raffaele, S. & Kamoun, S. Genome evolution in filamentous plant pathogens: Why bigger can be better. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 417–430 (2012).
- Relyea, R. A. The heritability of inducible defenses in tadpoles. *J. Evol. Biol.* **18**, 856–866 (2005).
- Rouxel, T. *et al.* Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by repeat-induced point mutations. *Nat. Commun.* **2**:202 (2011).
- Rudd, J. J. *et al.* 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 Physiol.* **167**, 1158–1185 (2015).
- Rutherford S. & Lindquist, S. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* **396**, 336–42 (1998).
- Saakian, D. B., Yakushkina T., Koonin E. V. Allele fixation probability in a Moran model with fluctuating fitness landscapes. *Phys. Rev. E* **99**, 2 (2019).
- Saarinen, K., Laakso, J., Lindström, L. & Ketola, T. Adaptation to fluctuations in temperature by nine species of bacteria. *Ecol. Evol.* **8**, 2901–2910 (2018).
- Sánchez-Vallet, A., McDonald, M. C., Solomon, P. S. & McDonald, B. A. Is *Zymoseptoria tritici* a hemibiotroph? *Fungal Genet. Biol.* **79**, 29–32 (2015).
- Schaum, C. E., Buckling, A., Smirnoff, N., Studholme, D. J. & Yvon-Durocher, G. Environmental fluctuations accelerate molecular evolution of thermal tolerance in a marine diatom. *Nat. Commun.* **9**, 1–14 (2018).
- Scheiner, S. M. Genetics and Evolution of Phenotypic Plasticity. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **24**, 35–68 (1993).
- Schlichting, C. D. The Evolution of Phenotypic Plasticity in Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **17**, 667–93 (1986)
- Schlötterer, C., Kofler, R., Versace, E., Tobler, R. & Franssen, S. U. Combining experimental evolution with next-generation sequencing: A powerful tool to study adaptation from standing genetic variation. *Heredity* **114**, 431–440 (2015).
- Schotanus, K., Soyer, J. L., Connolly, L. R., Grandaubert, J., Happel, P., Smith, K.M., Freitag, M. & Stukenbrock E. H. Histone modifications rather than the novel regional centromeres of *Zymoseptoria tritici* distinguish core and accessory chromosomes. *Epigenetics and Chromatin* **8**, 1–18 (2015).
- Sidhu Y. S. *Molecular tools for functional genomic analyses of the stealth pathogenesis of wheat by Zymoseptoria tritici*, PhD thesis of Yaadwinder Singh Sidhu, 2015, University of Exeter

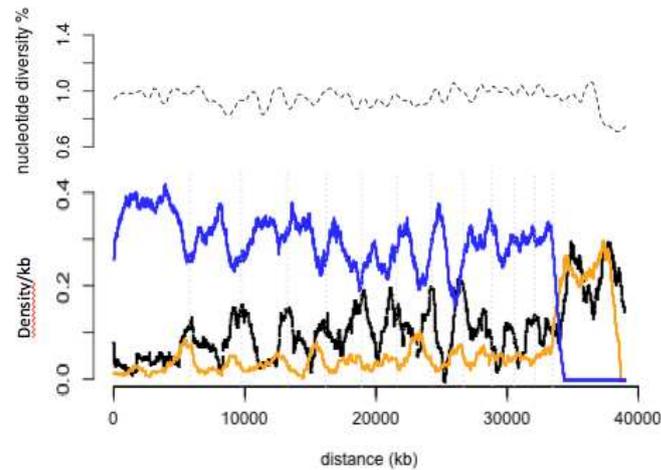
- Siegal, M. L. & Bergman, A. Waddington's canalization revisited: Developmental stability and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 10528–10532 (2002).
- Sikkink, K. L., Reynolds, R. M., Ituarte, C. M., Cresko, W. A. & Phillips, P. C. Rapid Evolution of Phenotypic Plasticity and Shifting Thresholds of Genetic Assimilation in the Nematode *Caenorhabditis remanei*. *G3; Genes|Genomes|Genetics* **4**, 1103–1112 (2014).
- Sniegowski, P. D., Gerrish, P. J. & Lenski, R. E. Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*. *Nature* **387**, 703–705 (1997).
- Soyer, O. S. & Pfeiffer, T. Evolution under fluctuating environments explains observed robustness in metabolic networks. *PLoS Comput. Biol.* **6**, e1000907 (2010).
- Spor A., Kvitek, D. J., Nidelet, T., Martin, J., Legrand, J., Dillmann, C., Bourgeois, A., de Vienne, D., Sherlock, G. & Sicard, D. Phenotypic and genotypic convergences are influenced by historical contingency and environment in yeast. *Evolution* **68**, 772–790 (2014).
- Startek, M., Le Rouzic, A., Capy, P., Grzebelus, D. & Gambin, A. Genomic parasites or symbionts? Modeling the effects of environmental pressure on transposition activity in asexual populations. *Theor. Popul. Biol.* **90**, 145–151 (2013).
- Steinberg, G. Cell biology of *Zymoseptoria tritici*: Pathogen cell organization and wheat infection. *Fungal Genet. Biol.* **79**, 17–23 (2015).
- Steiner, C. F. Environmental Noise, Genetic Diversity and the Evolution of Evolvability and Robustness in Model Gene Networks. *PLoS One* **7** (2012).
- Stergiopoulos, I. & de Wit, P. J. G. M. Fungal Effector Proteins. *Annu. Rev. Phytopathol.* **47**, 233–263 (2009).
- Stewart, E. L. & McDonald, B. A. Measuring Quantitative Virulence in the Wheat Pathogen *Zymoseptoria tritici* Using High-Throughput Automated Image Analysis. *Phytopathology* **104**, 985–992 (2014).
- Stewart, E. L., Croll, D., Lendenmann, M. H., Sanchez-Vallet, A., Hartmann, F. E., Palma-Guerrero, J., Ma, X. & McDonald B. A. Quantitative trait locus mapping reveals complex genetic architecture of quantitative virulence in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Mol. Plant Pathol.* **9**, 201–216 (2017).
- Stukenbrock, E. H., Banke, S., Javan-Nikkhah, M. & McDonald, B. A. Origin and domestication of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* via sympatric speciation. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 398–411 (2007).
- Stukenbrock, E. H. & McDonald, B. A. The Origins of Plant Pathogens in Agro-Ecosystems. *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**, 75–100 (2008).
- Stukenbrock, E. H., Jørgensen, F. G., Zala, M., Hansen, T.T., McDonald, B. A. & Schierup M.H. Whole-genome and chromosome evolution associated with host adaptation and speciation of the wheat pathogen *mycosphaerella graminicola*. *PLoS Genet.* **6**, 1–13 (2010).
- Stukenbrock, E. H., Bataillon, T., Dutheil, J. Y., Hansen, T. T., Li, R., Zala, M., McDonald, B. A., Wang, J. & Schierup M. H. The making of a new pathogen: Insights from comparative population genomics of the domesticated wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* and its wild sister species. *Genome Res.* **21**, 2157–2166 (2011).

- Stukenbrock, E. H., Quaedvlieg, W., Javan-Nikhah, M., Zala, M., Crous, P. W. & McDonald, B. A. *Zymoseptoria ardabiliae* and *Z. pseudotritici*, two progenitor species of the septoria tritici leaf blotch fungus *Z. tritici* (synonym: *Mycosphaerella graminicola*). *Mycologia* **104**, 1397–1407 (2012).
- Stukenbrock, E. H. & Croll, D. The evolving fungal genome. *Fungal Biol. Rev.* **28**, 1–12 (2014).
- Stukenbrock, E. H. & Dutheil, J. Y. Fine-scale recombination maps of fungal plant pathogens reveal dynamic recombination landscapes and intragenic hotspots. *Genetics* **208**, 1209–1229 (2018).
- Tellier, A., Moreno-Gómez, S. & Stephan, W. Speed of adaptation and genomic footprints of host-parasite coevolution under arms race and trench warfare dynamics. *Evolution*. **68**, 2211–2224 (2014).
- Tenaillon, O. *et al.* Tempo and mode of genome evolution in a 50,000-generation experiment. *Nature* **536**, 165–170 (2016).
- Tenaillon, O., Rodríguez-Verdugo, A., Gaut, R. L., McDonald, P., Bennett, A. F., Long A. D. & Gaut B. S. The Molecular Diversity of Adaptive Convergence. *Science* **335**, 457–461 (2012).
- Teotónio H., Estes, S., Phillips, P. C. & Baer, C. F. Experimental evolution with *Caenorhabditis* nematodes. *Genetics* **206**, 691–716 (2017).
- Thattai M. & van Oudenaarden A. Stochastic gene expression in fluctuating environments. *Genetics* **167**:523–530 (2004).
- Tokuriki, N. & Tawfik, D. S. Protein dynamism and evolvability. *Science* **324**, 203–207 (2009).
- Torriani, S. F. F., Brunner, P. C., McDonald, B. A. & Sierotzki, H. QoI resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manag. Sci.* **65**, 155–162 (2009).
- Torriani, S. F. F., Melichar, J. P., Mills, C., Pain, N., Sierotzki, H. & Courbot M. *Zymoseptoria tritici*: A major threat to wheat production, integrated approaches to control. *Fungal Genet. Biol.* **79**, 8–12 (2015).
- Travisano M., Mogold J. A., Bennett A. F. & Lenski R. E. Experimental tests of the roles of adaptation, chance, and history in evolution. *Science* **267**, pp. 87-90 (1995).
- Travisano, M. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. VI. Environmental constraints on adaptation and divergence. *Genetics* **146**, 471–479 (1997).
- Tufto, J. Genetic evolution, plasticity, and bet-hedging as adaptive responses to temporally autocorrelated fluctuating selection: A quantitative genetic model. *Evolution* **69**, 2034–2049 (2015).
- Van Doorslaer, W., Stoks, R., Duvivier, C., Bednarska, A. & De Meester, L. Population dynamics determine genetic adaptation to temperature in daphnia. *Evolution* **63**, 1867–1878 (2009).
- Van Kleunen, M. & Fischer, M. Constraints on the evolution of adaptive phenotypic plasticity in plants. *New Phytol.* **166**, 49–60 (2005).
- Venail, P. A., Kaltz, O., Olivieri, I., Pommier, T. & Mouquet, N. Diversification in temporally heterogeneous environments : Effect of the grain in experimental bacterial populations Diversification in temporally heterogeneous environments : effect of the grain in experimental bacterial populations. *J. Evol. Biol* **24**, 2485–2495 (2011)

- Venkatesh, J. & Kang, B. Current views on temperature-modulated R gene-mediated plant defense responses and tradeoffs between plant growth and immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **50**, 9–17 (2019)
- Visser, M. E. Keeping up with a warming world ; assessing the rate of adaptation to climate change. *Proc. R. Soc. B* **275**, 649–659 (2008).
- Waddington C. H. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature*. **150** (3811): 563–565 (1942).
- Waddington, C. H. Genetic Assimilation of an Acquired Character. *Evolution* **7**, 118–126 (1953).
- Waddington C. H. Canalization of development and genetic assimilation of acquired characters. *Nature* **183**, 1654–1655 (1959).
- Wagner, A. The White-Knight Hypothesis, or Does the Environment Limit Innovations? *Trends Ecol. Evol.* **32**, 131–140 (2017).
- Wang, B., Liang, X., Gleason, M. L., Zhang, R. & Sun, G. Genome sequence of the ectophytic fungus *Ramichloridium luteum* reveals unique evolutionary adaptations to plant surface niche. *BMC Genomics* **18**, (2017)
- West-Eberhard MJ. Developmental plasticity and evolution. *Oxford University Press* (2003).
- Whitehead, A. & Crawford, D. L. Variation within and among species in gene expression: Raw material for evolution. *Mol. Ecol.* **15**, 1197–1211 (2006a).
- Whitehead, A. & Crawford, D. L. Neutral and adaptive variation in gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 5425–5430 (2006b).
- Whitman D.W. & Agrawal A. What is Phenotypic Plasticity and Why is it Important? In *Phenotypic plasticity of insects* (2009), CRC Press, ISBN 9781578084234.
- Wieczynski, D. J., Turner, P. E. & Vasseur, D. A. Temporally Autocorrelated Environmental Fluctuations Inhibit the Evolution of Stress Tolerance. *Am. Nat.* E000–E000 (2018).
- Wielgoss, S., Barrick, J. E., Tenaillon, O., Cruveiller, S., Chane-Woon-Ming, B., Médigue, C., Lenski, R. E., Schneider, D. Mutation Rate Inferred From Synonymous Substitutions in a Long-Term Evolution Experiment With *Escherichia coli*. *G3 ; Genes|Genomes|Genetics* **1**, 183–186 (2011).
- Wielgoss, S., Barrick, J. E., Tenaillon, O., Wisner, M.J., Dittmar, W. J., Cruveiller, S., Chane-Woon-Ming, B., Médigue, C., Lenski, R. E., Schneider, D. Mutation rate dynamics in a bacterial population reflect tension between adaptation and genetic load. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 222–227 (2013).
- Wisner, M. J., Ribeck, N., & Lenski R. E. Long term dynamics of adaptation in asexual populations. *Science* **342**, 1364–1367 (2013).
- Wisner, M. J. & Lenski, R. E. A comparison of methods to measure fitness in *Escherichia coli*. *PLoS One* **10**, 1–11 (2015).
- Wittenberg, A. H. J. *et al.* Meiosis drives extraordinary genome plasticity in the haploid fungal plant pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS One* **4**, e5863 (2009).
- Wolf, L., Silander, O. K. & van Nimwegen, E. Expression noise facilitates the evolution of gene regulation. *Elife* **4**, 1–48 (2015).

- Woltereck R. Weitere experimentelle untersuchungen über Artänderung, speziell über das Wesen quantitativer Artunterschiede bei Daphniden. *Zeitschrift für induktive Abstammungs- und Vererbungslehre*. (1913). <https://doi.org/10.1007/BF01876686>
- Woods, R., Schneider, D., Winkworth, C. L., Riley, M. A. & Lenski, R. E. Tests of parallel molecular evolution in a long-term experiment with *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 9107–9112 (2006).
- Wray, G. A. The evolutionary significance of cis-regulatory mutations. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 206–216 (2007).
- Yadav, A., Dhole, K. & Sinha, H. Genetic regulation of phenotypic plasticity and canalisation in yeast growth. *PLoS One* **11**, 1–20 (2016).
- Yampolsky, L. Y., Glazko, G. V. & Fry, J. D. Evolution of gene expression and expression plasticity in long-term experimental populations of *Drosophila melanogaster* maintained under constant and variable ethanol stress. *Mol. Ecol.* **21**, 4287–4299 (2012).
- Yi, X. & Dean, A. M. Phenotypic plasticity as an adaptation to a functional trade-off. *Elife* **5**, 1–12 (2016).
- Yoshida, M., Tsuru, S., Hirata, N., Seno, S., Matsuda, H., Ying, B.W. & Yomo, T. Directed evolution of cell size in *Escherichia coli*. *BMC Evol. Biol.* **14**, 1–12 (2014).
- Young, K. D. The Selective Value of Bacterial Shape. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 660–703 (2006).
- Zhan, J., Pettway, R. E. & McDonald, B. A. 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 (2003).
- Zhan, J. & McDonald, B. A. The interaction among evolutionary forces in the pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genet. Biol.* **41**, 590–599 (2004).
- Zhan, J. & McDonald, B. A. Thermal adaptation in the fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Mol. Ecol.* **20**, 1689–1701 (2011).
- Zhan, F., Xie, Y., Zhu, W., Sun, D., McDonald, B. A. & Zhan, J. Linear Correlation Analysis of *Zymoseptoria tritici* Aggressiveness with In Vitro Growth Rate. *Phytopathology* **106**, 1255–1261 (2016).
- Zhong, Z. *et al.* A small secreted protein in *Zymoseptoria tritici* is responsible for avirulence on wheat cultivars carrying the *Stb6* resistance gene. *New Phytol.* **214**, 619–631 (2017).
- Zhu, Y. O., Siegal, M. L., Hall, D. W. & Petrov, D. A. Precise estimates of mutation rate and spectrum in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, E2310–E2318 (2014).

7. ANNEXES



Annexe 1 - Diversité génétique, densité d'éléments transposables et polymorphisme de présence-absence d'effecteurs le long du génome de *Z. tritici*

En haut : diversité génétique (π)

En bas : densité d'éléments transposables (noir), d'effecteurs présentant un polymorphisme de présence-absence (orange) et d'effecteurs conservés entre individus (bleu).

Résultats obtenus sur un panel de 121 individus issus de sept populations : *Middle East* (n=20), *North America* (n=13), *South America* (n=15), *North Europe* (n=46), *South Europe, Maghreb* (n=18), *East Africa* (n=5) and *Oceania* (n=4)

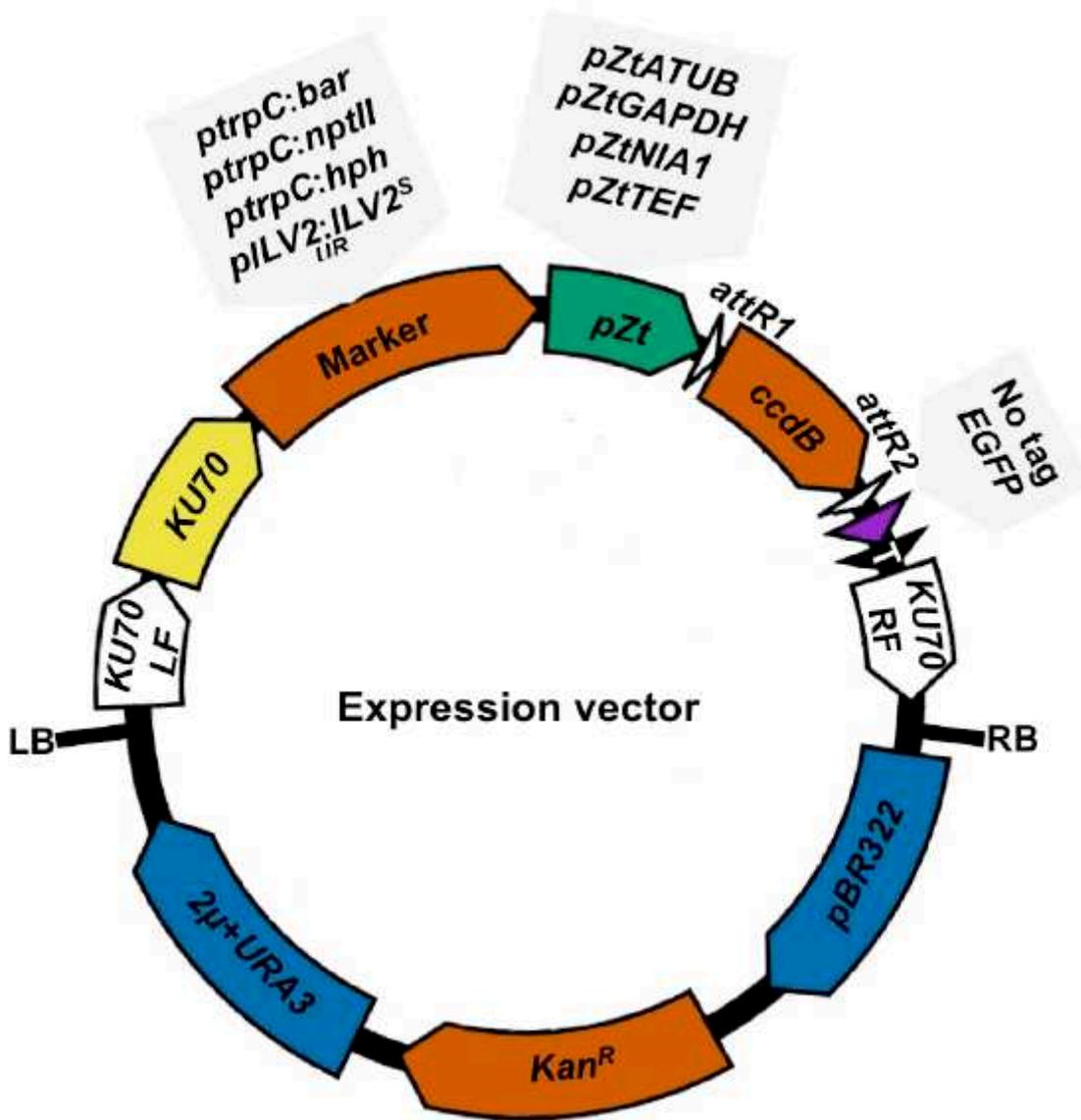
D'après **Gibriel, Genissel et al. en prep**

	Middle East	North America	South America	North Europe	South Europe	East Africa
North America	0.167					
	0.126					
South America	0.173	0.161				
	0.166	0.173				
North Europe	0.123	0.078	0.120			
	0.081	0.076	0.134			
South Europe, Maghreb	0.066	0.102	0.114	0.058		
	0.052	0.090	0.129	0.047		
East Africa	0.167	0.188	0.216	0.125	0.131	
	0.195	0.235	0.284	0.168	0.168	
Oceania	0.202	0.177	0.216	0.103	0.147	0.222
	0.230	0.236	0.301	0.166	0.186	0.335

Annexe 2 - Diversité des populations de *Z. tritici* à l'échelle mondiale

Les estimations d'indices de fixation F_{ST} (Hudson et al. 1992) sont calculées à l'aide du package R *PopGenome* (Pfeifer et al. 2014), à partir de données de SNPs obtenues sur un total de n=121 individus issus de sept populations. Pour les différentes populations, les nombres d'individus séquencés sont les suivants : *Middle East* (n=20), *North America* (n=13), *South America* (n=15), *North Europe* (n=46), *South Europe, Maghreb* (n=18), *East Africa* (n=5) and *Oceania* (n=4). Lignes grises : F_{ST} sur les chromosomes essentiels ; lignes blanches : F_{ST} sur les chromosomes accessoires.

D'après **Gibriel, Genissel et al. en prep**



Annexe 3 - Plasmide porté par la souche PYSKH4 d'Agrobacterium tumefaciens utilisée lors de la transformation par ATMT des souches de *Z. tritici*

La partie s'insérant dans le génome au cours de la transformation est située entre les bordures notées *LB* et *RB*. Elle contient notamment, en plus de la séquence codante de la *Green Fluorescent Protein* sous contrôle d'un promoteur constitutif de *Z. tritici* (noté pZt, en vert), un marqueur de sélection permettant la résistance à la sulfonylurée (chlorimuron-ethyl).

D'après Sidhu 2015.

Pour 1L de milieu d'induction :

- 10 mL K₂HPO₄, solution mère
- 10 mL KH₂PO₄, solution mère
- 10 mL NaCl, solution mère
- 10 mL MgSO₄, 7H₂O, solution mère
- 1 mL CaCl₂, solution mère
- 1 mL FeSO₄, 7H₂O, solution mère
- 10 mL (NH₄)₂ SO₄, solution mère
- 10 mL glucose, solution mère
- 7.8 g MES (tampon, acide 2-N-morpholino-éthanosulfonique)
- 10 mL glycérol à 50%
- Ajuster le volume final à 1L avec de l'eau osmosée
- Ajuster le pH à 5.6 avec du K(OH)
- 13 g d'agar (uniquement si MI solide)
- Autoclavage

Solutions mères	Pour 100 mL final
H ₂ O	80 mL
K ₂ HPO ₄	17,42 g
KH ₂ PO ₄	13,6 g
NaCl	1,46 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	4,93 g
CaCl ₂	7,7 g
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,278 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,2 g
Glucose	18 g

Annexe 4 - Composition du milieu d'induction (MI) utilisé lors des transformations par *Agrobacterium tumefaciens*

La composition des huit solutions mères nécessaires à la préparation du MI est fournie dans le tableau.

Pour 1L de milieu minimum:

20 g de glucose

1 g de KH_2PO_4

0,5 g de $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$

0,5 g de KCl

0,1 g de $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$

2 g de NaNO_3

1 mL de micro-éléments, solution mère

Ajuster le volume final à 1L avec de l'eau osmosée

Ajuster le pH à 5.9 avec du $\text{K}(\text{OH})$

15 g d'agar

Solution mère de micro-éléments (1000x)	Pour 100 mL final
H_2O	80 mL
$\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	2,2 g
H_3BO_3	1,1 g
$\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
$\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
$\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	0,17 g
$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	0,16 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	0,15 g
$\text{Na}_2 \text{EDTA}$	5 g

Après autoclavage : ajout de 1 mL de mélange Thiamine/Biotine (solution mère de vitamines à 0,01g chacune pour 100 mL d' H_2O)

Annexe 5 - Composition du milieu minimum (MM) utilisé lors des transformations par *Agrobacterium tumefaciens*

La composition de la solution mère nécessaire à la préparation du MM est fournie dans le tableau.

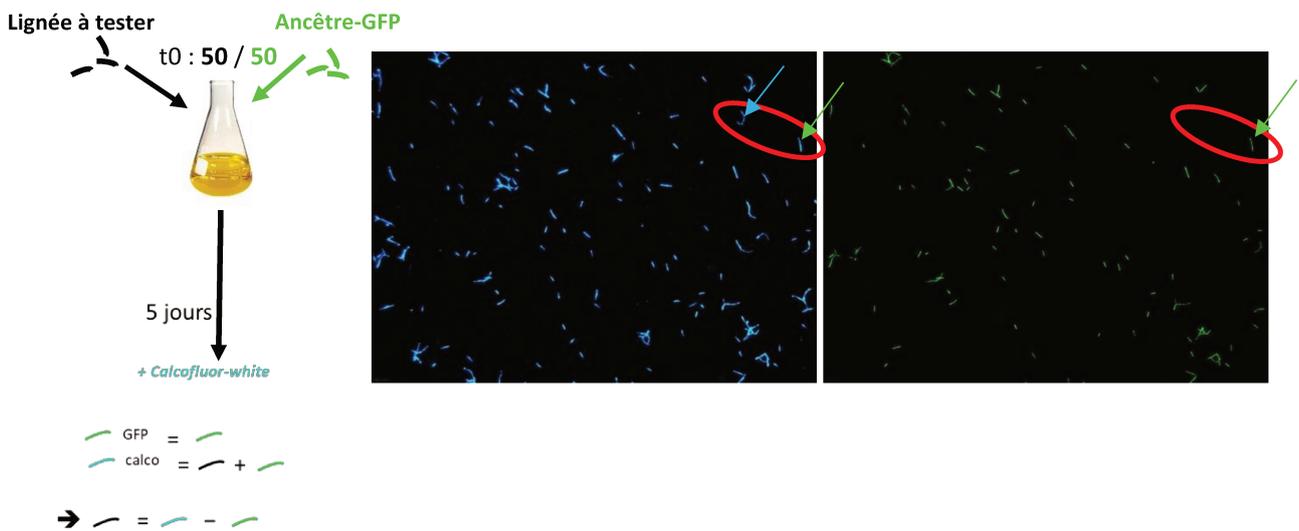
Lignée évoluée	Fond génétique	Régime de sélection
1117	MGGP01	Stable_17°C
1223	MGGP01	Stable_23°C
12F	MGGP01	Fluctuations
13F	MGGP01	Fluctuations
44117	MGGP44	Stable_17°C
44323	MGGP44	Stable_23°C
441F	MGGP44	Fluctuations
443F	MGGP44	Fluctuations

Annexe 6 - Noms des huit lignées évoluées caractérisées lors des tests de compétition et régimes d'évolution correspondants

A

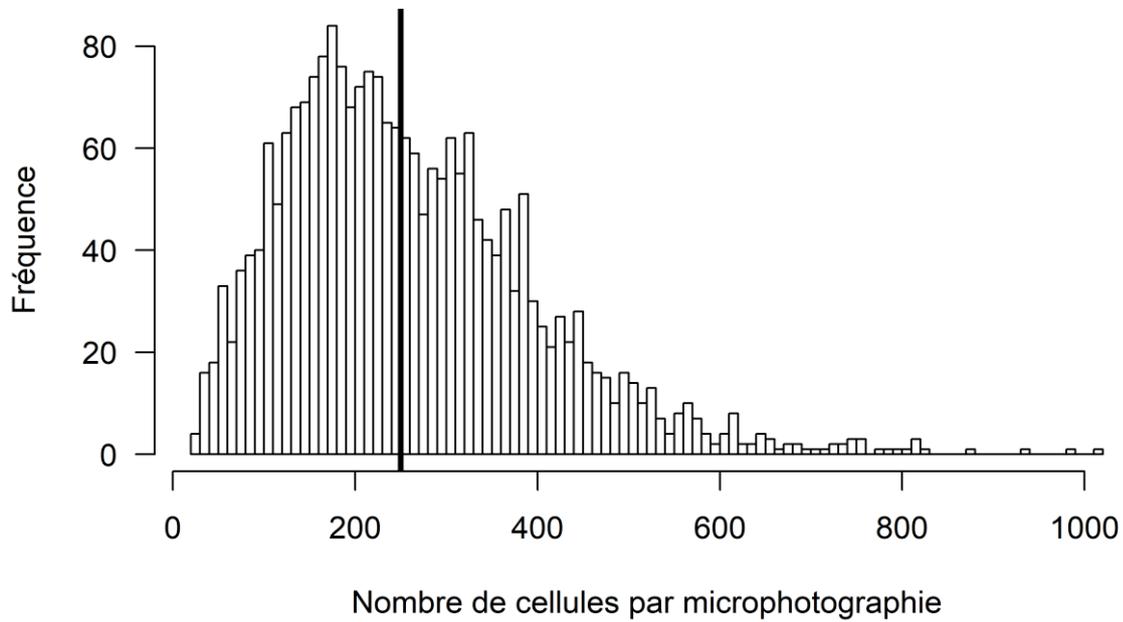


B



Annexe 7 - Représentation schématique du protocole d'estimation de la fitness relative à l'issue des tests de compétition

Le panneau **A** montre les cultures liquides à l'issue d'un test de compétition ainsi que les étalements qui étaient réalisés afin de vérifier les contaminations bactériennes. Le panneau **B** schématise le protocole de co-inoculation, de culture puis de révélation des géotypes en compétition (à gauche). A droite, un exemple de paire de photographies prise lors de l'excitation du calcofluor-blanc et de la GFP au microscope à épifluorescence. Le nombre de cellules non GFP-transformées s'obtient par soustraction « Calcofluor – GFP ».



Annexe 8 - Distribution du nombre de cellules par photographie au microscope à épifluorescence, à partir de l'ensemble des tests de fitness réalisés

La distribution correspond aux 2400 photographies réalisées en calcofluor-blanc (20 photographies par lignée et par répétition, avec un total de 10 lignées et 12 répétitions). Le trait vertical représente la valeur moyenne de cette distribution, soit 237 cellules par photographie.

Code plugin ImageJ

```
list = getFileList("C:/My_directory");
setBatchMode(true);
for (i=0; i<list.length; i++) {
open("C:/My_directory/"+list[i]);
fileNoExt = split(list[i], ".");
run("Subtract Background...", "Rolling ball radius=12.0");
run("8-bit");
//run("Threshold");
//setThreshold(6, 255);
run("Convert to Mask");
run("Analyze Particles...", "size=130-2500 circularity=0.00-1.00
show=Outlines clear include summarize");
saveAs("jpeg", "C:/My_directory/Processed/"+list[i]);}
selectWindow("Summary");
saveAs("Text", "C:/My_directory/Cell_counting_results.txt");
```

Annexe 9 - Code du plugin ImageJ utilisé lors du traitement automatisé d'analyse d'images

Le symbole «//» correspond à l'étape de définition d'un seuil minimal d'intensité utilisé lors de l'analyse. Ce dernier était laissé à sa valeur par défaut (//run("Threshold")) pour les images prises en calcofluor-blanc mais était modifié (//setThreshold(6, 255)) pour celles prises en GFP.

Fond génétique	Conditions thermiques		
	17°C	23°C	Fluctuations
MGGP01			
Stable_17	0.28 (NS)	0.01 (*)	0.04 (*)
Stable_23	3.9e-4 (***)	< 2e-16 (***)	4.3e-14 (***)
Fluct. 12F	2.3e-12 (***)	< 2e-16 (***)	< 2e-16 (***)
Fluct. 13F	2.0e-14 (***)	< 2e-16 (***)	< 2e-16 (***)
MGGP44			
Stable_17	0.0042 (**)	0.29 (NS)	0.47 (NS)
Stable_23	5.9e-08 (***)	< 2e-16 (***)	2.6e-4 (***)
Fluct. 441F	0.34 (NS)	0.42 (NS)	0.50 (NS)
Fluct. 443F	0.0028 (**)	0.061 (NS)	0.42 (NS)

Les symboles indiquent les niveaux de significativité suivants : * p<0.05 ; ** p<0.01 ; *** p<0.001

Annexe 10 - Statistiques sur les gains de fitness des lignées évoluées

Chaque valeur p-value est associée aux valeurs de fitness relative présentées dans le **Tableau 1** du Chapitre 2. En gras sont indiquées les p-values significatives au seuil de 5%.

Lignées	Comparaisons		
	23°C - 17°C	Fluct - 17°C	23° - Fluct
MGGP01			
Stable_17	0.43	0.43	0.99 (NS)
Stable_23	1.5e-05 (***)	8.5e-04 (***)	0.79 (NS)
Fluct. 12F	0.019 (*)	0.047 (*)	0.86 (NS)
Fluct. 13F	0.14 (NS)	0.023 (*)	0.43 (NS)
MGGP44			
Stable_17	0.47 (NS)	0.47 (NS)	0.85 (NS)
Stable_23	0.075 (Tend.)	0.85 (NS)	0.075 (Tend.)
Fluct. 441F	0.85 (NS)	0.47 (NS)	0.47 (NS)
Fluct. 443F	0.69 (NS)	0.47 (NS)	0.73 (NS)

Les symboles indiquent les niveaux de significativité suivants : * p<0.05 ; ** p<0.01 ; *** p<0.001

Annexe 11 - Statistiques sur les gains de fitness selon l'environnement thermique testé

Chaque p-value est associée à la case correspondante du **Tableau 2** du Chapitre 2. Les p-values significatives au seuil de 5% sont indiquées en gras.

Lignées MGGP01 à 17°C	Ancêtre	12F	13F	Stable_17°C
12F	< 2.10^{-16}		0,67	$1,5.10^{-5}$
13F	< 2.10^{-16}			$4,1.10^{-7}$
Stable_17°C	0,16			
Stable_23°C	$1,40.10^{-3}$	$3,1.10^{-5}$	$6,8.10^{-7}$	0,39

Lignées MGGP01 à 23°C	Ancêtre	12F	13F	Stable_17°C
12F	< 2.10^{-16}		0,36	< 2.10^{-16}
13F	< 2.10^{-16}			< 2.10^{-16}
Stable_17°C	0,013			
Stable_23°C	< 2.10^{-16}	0,69	0,54	< 2.10^{-16}

Lignées MGGP01 en fluctuations	Ancêtre	12F	13F	Stable_17°C
12F	< 2.10^{-16}		0,099	< 2.10^{-16}
13F	< 2.10^{-16}			< 2.10^{-16}
Stable_17°C	0,43			
Stable_23°C	< 2.10^{-16}	$1,3.10^{-3}$	< 2.10^{-16}	< 2.10^{-16}

Lignées MGGP44 à 17°C	Ancêtre	441F	443F	Stable_17°C
441F	0,31		0,41	0,50
443F	$2,6.10^{-5}$			0,64
Stable_17°C	5.10^{-4}			
Stable_23°C	< 2.10^{-16}	9.10^{-8}	$3,6.10^{-3}$	< 2.10^{-16}

Lignées MGGP44 à 23°C	Ancêtre	441F	443F	Stable_17°C
441F	0,57		0,27	0,75
443F	0,19			0,49
Stable_17°C	0,34			
Stable_23°C	< 2.10^{-16}	< 2.10^{-16}	< 2.10^{-16}	< 2.10^{-16}

Lignées MGGP44 en fluctuations	Ancêtre	441F	443F	Stable_17°C
441F	0,068		$2,3.10^{-6}$	$1,4.10^{-4}$
443F	2.10^{-3}			0,38
Stable_17°C	0,015			
Stable_23°C	< 2.10^{-16}	< 2.10^{-16}	< 2.10^{-16}	< 2.10^{-16}

Annexe 12 - Statistiques sur les densités de cellules atteintes par les différentes lignées à l'issue des tests de compétition, dans les différents environnements thermiques

Dans chaque environnement, les p-values des multiples tests de Wilcoxon réalisés ont été corrigées par la méthode de Holm. Les p-values inférieures à 5% sont indiquées en gras.

Fitness relative	MGGP01	MGGP44
Stable_17	0.0016	3.5e-4
Stable_23	< 2e-16	< 2e-16
Fluct. (noté 3)	< 2e-16	0.27
Fluct. (noté 4)	< 2e-16	1.2e-4

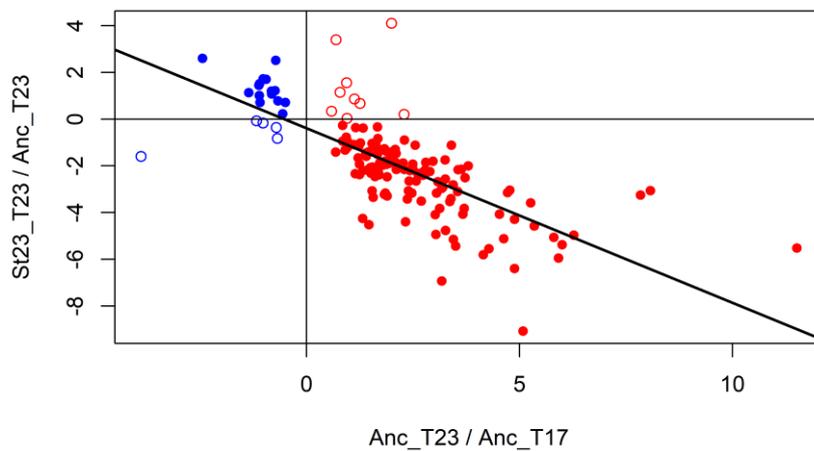
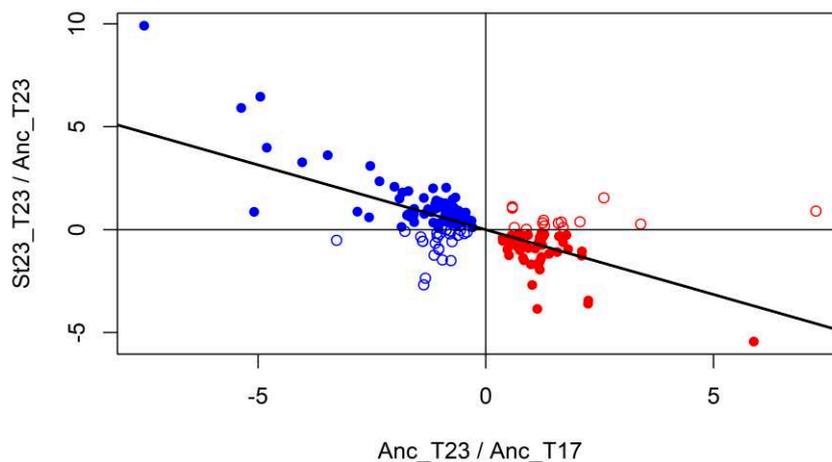
Annexe 13 - Statistiques sur les gains moyens de fitness présentés par les lignées ayant évolué dans les différents régimes

Chaque p-value est associée aux valeurs de fitness relative présentées dans la **Tableau 3** du Chapitre 2. Les p-values inférieures au seuil de significativité de 5% sont présentées en gras. La lignée fluctuante notée 3 indique 12F (resp. 441F) pour le fond génétique MGGP01 (resp. MGGP44) et la lignée notée 4 indique 13F (resp. 443F) pour le fond génétique MGGP01 (resp. MGGP44).

	Stable 23°C – Stable 17°C	Fluct (noté 4) – Fluct (noté 3)	Fluct (notés 3/4) – Stable 23°C	Fluct (notés 3/4) – Stable 17°C
MGGP01	<2e-16	0.27	1.0e-06 / 1.7e-09	<2e-16 / <2e-16
MGGP44	<2e-16	2.5e-6	<2e-16 / <2e-16	1.56e-05 / 0.60

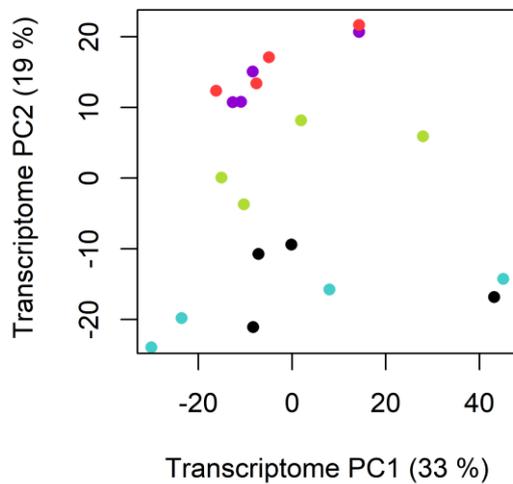
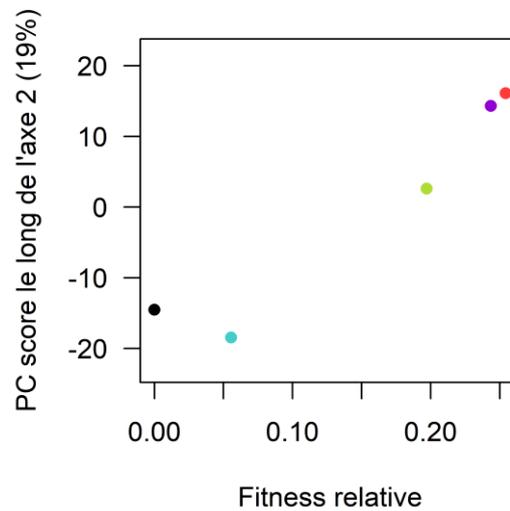
Annexe 14 - Différentiel de fitness relative selon le régime d'évolution expérimenté par les différentes lignées

Les p-values des tests indiquent si les différences de fitness relative que présentent les différentes lignées sont significatives. Chaque p-value est associée aux valeurs présentées dans la **Tableau 4** du Chapitre 2. En gras sont représentées les p-values inférieures à 5%. La lignée fluctuante notée 3 indique 12F (resp. 441F) pour le fond génétique MGGP01 (resp. MGGP44) et celle notée 4 indique 13F (resp. 443F) pour le fond génétique MGGP01 (resp. MGGP44).

A**B**

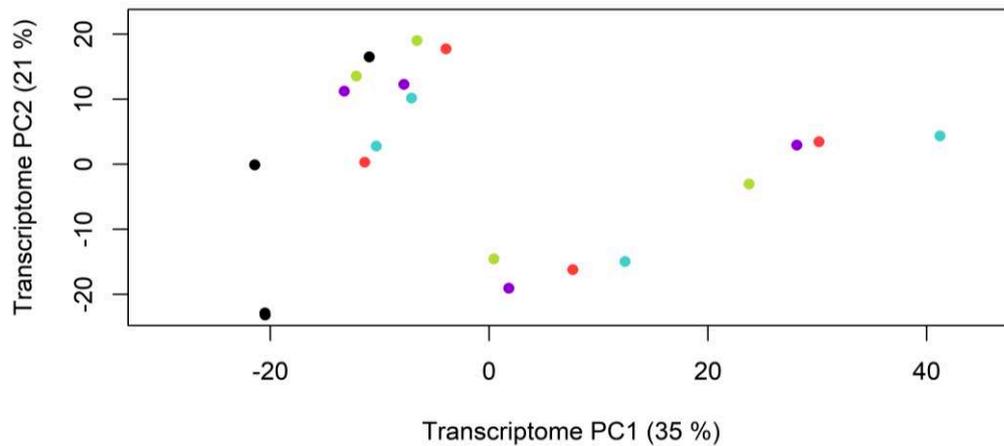
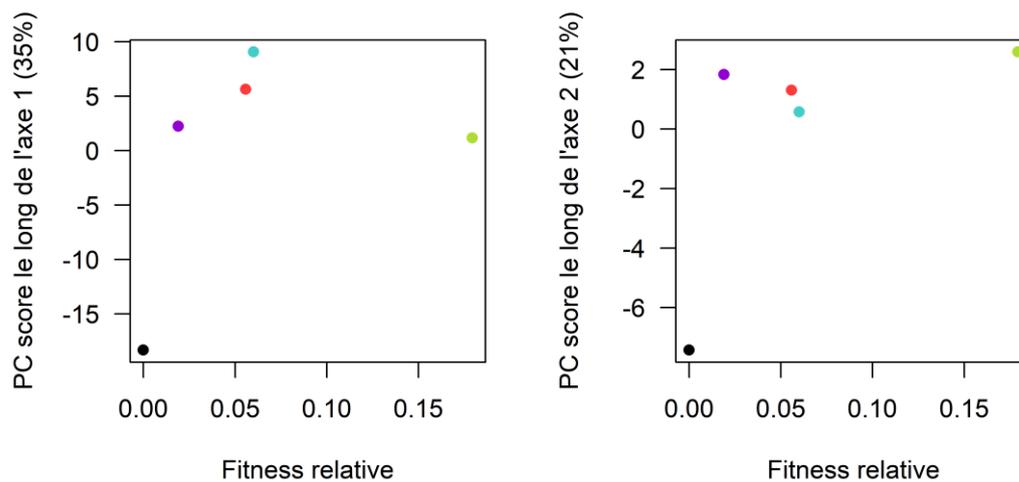
Annexe 15 - Evolution du niveau d'expression de certains gènes plastiques chez l'ancêtre par rapport à la direction de la plasticité ancestrale

Pour chacun des fonds génétiques (**A** : MGGP01, **B** : MGGP44), les points correspondent aux gènes dont l'expression est plastique chez les ancêtres et dont l'expression est significativement différente entre la température d'essai 23°C et 17°C pour la lignée Stable_23 correspondante. L'expression de ces gènes telle qu'elle est à 23°C pour les lignées Stable_23°C est considérée comme optimale. Les points à droite de l'axe des ordonnées sont colorés en rouge pour indiquer une surexpression à 23°C par rapport à 17°C chez l'ancêtre. A gauche, les points sont colorés en bleus pour signifier une sous-expression à 23°C par rapport à 17°C chez l'ancêtre. Les cercles pleins correspondent aux cas où les changements d'expression présentés par les ancêtres lorsqu'ils sont placés à 23°C va en sens inverse des changements, supposés être adaptatifs, survenus lors de l'évolution à 23°C. Les droites correspondent aux droites de régression estimées par la méthode des moindres carrés. **A** : coefficient de corrélation de Pearson $\rho = -0.72$ ($P < 2.10^{-16}$) ; **B** : coefficient de corrélation de Pearson $\rho = -0.68$ ($P < 2.10^{-16}$).

A**B**

Annexe 16 - Lien entre évolution du transcriptome dans les différents régimes et fitness relative des lignées de fond génétique MGGP01

A : Position des 20 échantillons RNA-séquencés selon les deux premiers axes obtenus à l'issue d'une Analyse en Composantes Principales (analyse réalisée sur l'ensemble des données d'expression des 10950 gènes considéré au Chapitre 1, avec la fonction *pca* de R). La couleur des échantillons correspond aux statuts évolutifs suivants (n=4 à chaque fois) : souche ancestral (noir) ; lignée Stable_17 (bleu clair) ; lignée Stable 23 (vert clair) ; lignée 12F (rouge) ; lignée 13F (violet). **B** : illustration du lien entre divergence transcriptomique des lignées par rapport à l'ancêtre et fitness relative moyenne des lignées. La divergence transcriptomique est quantifiée par le score moyen de chaque lignée le long du deuxième axe de variation (moyenne des valeurs en ordonnées des 4 points de même couleur en **A**). La fitness relative de la souche ancestrale est fixée à zéro.

A**B**

Annexe 17 - Lien entre évolution du transcriptome dans les différents régimes et fitness relative des lignées de fond génétique MGGP44

A : Position des 20 échantillons RNA-séquencés selon les deux premiers axes obtenus à l'issue d'une Analyse en Composantes Principales (analyse réalisée sur l'ensemble des données d'expression des 10950 gènes considéré au Chapitre 1, avec la fonction *pca* de R). La couleur des échantillons correspond aux statuts évolutifs suivants (n=4 à chaque fois) : souche ancestral (noir) ; lignée Stable_17 (bleu clair) ; lignée Stable_23 (vert clair) ; lignée 441F (rouge) ; lignée 443F (violet). **B**. lien entre divergence transcriptomique des lignées par rapport à l'ancêtre et fitness relative moyenne des lignées. A gauche (resp. à droite), la divergence transcriptomique est estimée par le score moyen de chaque lignée le long du premier (resp. deuxième) axe de variation. La divergence transcriptomique est quantifiée par le score moyen de chaque lignée le long du deuxième axe de variation (moyenne des valeurs en ordonnées des 4 points de même couleur en **A**). La fitness relative de la souche ancestrale est fixée à zéro.

Fond génétique	Fitness en fluctuations	Nombre de gènes dont l'expression est plastique
MGGP01		
Stable_17	+4.8%	2141
Stable_23	+26.2%	609
Fluct. 12F	+30.4%	179
Fluct. 13F	+33.3%	300
MGGP44		
Stable_17	+4.9%	892
Stable_23	+14.4%	900
Fluct. 441F	-1.2%	574
Fluct. 443F	+5.7%	549

Annexe 18 - Fitness relative des lignées en conditions de fluctuations thermiques et plasticité de leur transcriptome en réponse à un changement de température

Le signe « + » (resp. « - ») précédant les valeurs moyennes de fitness relative indique des gains (resp. pertes) de fitness par rapport à l'ancêtre. Comme dans le Chapitre 1, l'expression d'un gène est considérée comme plastique si elle varie de plus d'un facteur deux entre les températures d'essai 17°C et 23°C.

Titre : Effet de la sélection fluctuante sur le pathogène du blé *Zymoseptoria tritici* par une approche d'évolution expérimentale

Mots clés : expression de gènes, fitness relative, fluctuation, mutation, phytopathogène, plasticité phénotypique

Résumé :

Un défi important en Biologie est de comprendre comment les organismes s'adaptent à des environnements fluctuants et de déterminer l'importance relative de la plasticité phénotypique et des mutations dans cette adaptation. Nous avons examiné la réponse d'un pathogène du blé (*Zymoseptoria tritici*) aux fluctuations de température grâce à des approches de transcriptomique, de phénotypage (fitness relative et pathogénie) et de génomique. Pour cela, une évolution expérimentale a été menée *in vitro* à partir de deux clones ayant évolué dans trois régimes thermiques : à 17°C, à 23°C et en température fluctuante. Le niveau d'expression de 11% du génome a évolué de manière distincte entre les deux génotypes fondateurs en conditions de fluctuations. Nous avons également observé une plus forte densité de gènes différemment exprimés dans des régions connues pour être riches en éléments transposables.

L'évolution en conditions fluctuantes a favorisé la robustesse du transcriptome. La fitness relative estimée dans les conditions d'évolution a augmenté uniquement pour les lignées fluctuantes issues d'un des deux génotypes fondateurs. La différence de croissance entre les deux ancêtres en conditions de fluctuations et leur différent niveau de plasticité d'expression pourraient expliquer ces résultats différents. Enfin, nous avons observé : *i*). des pertes de pathogénie *in planta* suite à l'évolution à 17°C et en fluctuations, *ii*). aucune perte de chromosomes accessoires, *iii*). de nombreuses mutations dans le génome, dont des mutations codantes dans des effecteurs. Ces travaux apportent de nombreux éléments de compréhension des mécanismes évolutifs et moléculaires sous-jacents à l'évolution de *Z. tritici* dans des environnements variables.

Title: Effect of fluctuating selection on the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* using an experimental evolution approach

Keywords: fluctuation, gene expression, mutation, phenotypic plasticity, plant pathogen, relative fitness

Abstract:

An important challenge in Biology is to understand how organisms adapt to fluctuating environments and to determine the relative significance of phenotypic plasticity and mutations in this adaptation. We examined the response of a wheat pathogen (*Zymoseptoria tritici*) to temperature fluctuations using transcriptomics, phenotyping (relative fitness and disease level) and genomics. With this goal, we conducted an *in vitro* experimental evolution from two *Z. tritici* clones that evolved in three thermal conditions: at 17°C, at 23°C and under temperature fluctuations. Expression level of 11% of the genome evolved in a different way between the two founder genotypes that evolved under fluctuating conditions. We also observed a higher density of differentially expressed genes in regions known to be enriched in transposable elements.

Evolution under fluctuating selection promoted robustness of the transcriptome. The relative fitness estimated in the same conditions as for the experimental evolution did increase for fluctuating lineages only for one of the founder genotypes. The difference of growth between the two ancestors in fluctuating conditions and their distinct level of expression plasticity could explain these opposite results. Finally we observed: *i*). *in planta* pathogenicity losses for lineages evolved at 17°C or under fluctuations *ii*). no accessory chromosome loss, *iii*). many *de novo* mutations, including coding mutations in effector genes. This work contributes to shed light on the evolutionary and molecular mechanisms underlying the evolution of *Z. tritici* in variable environments.