

# Étude de l'adaptation chez Penicillium roqueforti : approches fonctionnelle et de génomique évolutive

Ewen Crequer

▶ **To cite this version:**

Ewen Crequer. Étude de l'adaptation chez Penicillium roqueforti : approches fonctionnelle et de génomique évolutive. Sciences agricoles. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2024. Français. ⟨NNT : 2024BRES0017⟩. ⟨tel-04681343⟩

**HAL Id: tel-04681343**

**https://theses.hal.science/tel-04681343v1**

Submitted on 29 Aug 2024

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

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



HAL Authorization

COLLEGE ECOLOGIE
DOCTORAL GEOSCIENCES
BRETAGNE AGRONOMIE ALIMENTATION

Université de Bretagne Occidentale

# Thèse de doctorat de

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Ecole Doctorale n° 600
*Ecologie, Géosciences, Agronomie, Alimentation*
Spécialité : Ecologie et évolution

Par

**Ewen CREQUER**

## Etude de l'adaptation chez *Penicillium roqueforti*: approches fonctionnelle et de génomique évolutive

**Thèse présentée et soutenue à Plouzané, le 29 mars 2024.**
**Unité de recherche :**
**Université de Bretagne Occidentale, INRAE, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, 29280 Plouzané, France**
**Université Paris-Saclay, CNRS, AgroParisTech, Laboratoire Ecologie, Systématique et Evolution, 91190 Gif-sur-Yvette, France**

**Rapporteurs avant soutenance** :

| | |
|---|---|
| Warren ALBERTIN | Maître de Conférences, Bordeaux-INP |
| Joseph SCHACHERER | Professeur des Universités, Université de Strasbourg |

**Composition du Jury :**

| | | |
|---|---|---|
| Président : | Joseph SCHACHERER | Professeur des Universités, Université de Strasbourg |
| Examinateurs : | Jens FRISVAD | Professeur des Universités, Technical University of Denmark |
| | Warren ALBERTIN | Maître de Conférences, Bordeaux-INP |
| | Joseph SCHACHERER | Professeur des Universités, Université de Strasbourg |
| Dir. de thèse : | Emmanuel COTON | Professeur des Universités, Université de Bretagne Occidentale |
| Co-dir. de thèse : | Antoine BRANCA | Maître de Conférences, Université Paris-Saclay |

**Invités :**

| | |
|---|---|
| Tatiana GIRAUD | Directrice de recherche, CNRS |
| Monika COTON | Professeur des Universités, Université de Bretagne Occidentale |
| Jean-Luc JANY | Maître de Conférences, Université de Bretagne Occidentale |

# *Remerciements*

*Mes premiers remerciements vont aux membres du jury, Warren Albertin, Joseph Schacherer et Jens Frisvad pour avoir bien voulu accepter de consacrer du temps à lire, commenter et évaluer ces travaux de recherche.*

*Je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse, Marie Foulongne-Oriol et Philippe Silar pour leurs conseils, leurs écoutes et leurs intérêts à l'égard de mon sujet.*

*Un merci à l'agence nationale pour la recherche pour avoir financé cette thèse par le biais de l'ANR FUNGADAPT. Financements sans lesquels cette thèse n'aurait pas été possible.*

*Je remercie chaleureusement Emmanuel Coton pour avoir dirigé ma thèse ainsi que pour son accueil au sein du LUBEM. Merci pour l'énergie et la bienveillance, mais aussi le temps passé aux nombreuses relectures et corrections.*

*Je remercie, mon co-directeur de thèse, Antoine Branca, et Tatiana Giraud pour m'avoir accueillie à I'IDEEV et plus particulièrement dans l'équipe GEE de l'ESE lorsque j'ai quitté ma Bretagne natale pour rejoindre l'île de France pendant plus d'un an. Merci pour les discussions régulières pas toujours très préparées. Merci Tatiana pour ta réactivité, ta bienveillance et ta profusion de conseils.*

*Bien sûr, je voudrais aussi dire un immense merci aux autres membres du projet qui m'ont aussi suivi et encadré tout au long de cette thèse: Jean-Luc Jany, Monika Coton et Jeanne Ropars. Merci pour les riches discussions, ce que vous m'avez transmis et le temps que vous m'avez consacré, même quand vos emplois du temps étaient compliqués. Merci de m'avoir fait confiance. Merci à Thibault Caron, pour ce que tu m'as appris, les discussions et la motivation. Je pense aussi à Gwennina Cueff, merci pour ta bonne humeur et ton humour et avoir rendu agréable ces mois de manips parfois répétitives, t'as été une vraie tech de compète.*

*Merci à l'ensemble des membres du LUBEM et de l'équipe GEE de l'ESE présent et passé que j'ai eu la chance de côtoyer au quotidien, durant ces trois années, que ce soit pendant les pauses-café, les repas ou en dehors du laboratoire. Merci à tous de faire vivre les laboratoires et pour l'aide que vous ne manquez jamais de donner.*

*Un merci plus particulier à tous ceux avec qui j'ai eu le plaisir de partager un bureau. D'abord au LUBEM, merci à Marie, Aurélie et Amandine. Merci de m'avoir écouté me plaindre, de m'avoir fait rire, le plus souvent volontairement, et d'avoir été un vrai soutien moral et une source de*

*motivation continue. Puis à l'ESE, merci à Jean-Philippe, Gabriela, Samuel et Adrien, qui ont aussi eu à subir ma présence pendant un an, merci pour les échanges, les conseils et l'énergie.*

*Et évidemment, merci à tous mes proches, ma famille et à sa nouvelle arrivante pour m'avoir toujours soutenu et avoir cru en moi.*

*Merci à tous pour tout ce que vous m'avez apporté. Cette histoire continue…*

# Avant-propos

Un grand nombre d'espèces, aussi bien animales, que végétales ou microbiennes ont été domestiquées, souvent pour des raisons liées à l'alimentation. La domestication consiste en une modification des caractères génétiques et phénotypiques d'une espèce par une autre espèce, souvent l'être humain. Cette sélection anthropique favorise la reproduction des individus présentant les caractères les plus avantageux du point de vue de l'être humain. Mais cela a aussi pour conséquence une diminution de la diversité génétique, en comparaison à celle des populations sauvages, induite par la sélection d'un faible nombre d'individus. La domestication des êtres vivants implique une sélection forte et récente sous pression humaine, permettant une identification des régions génomiques sous sélection. D'autre part, des populations sauvages fortement apparentées sont souvent également disponibles, rendant possible une comparaison de leurs caractères phénotypiques et génomiques avec ceux des populations domestiquées. Tout cela fait de la domestication un modèle d'intérêt pour les questions de biologie évolutive. Ainsi, mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la domestication peut permettre d'élucider les mécanismes d'adaptation. Dans ce contexte, les champignons, dont certaines espèces ont été domestiquées pour des productions alimentaires, présentent des avantages liés à leur caractère microbien, à savoir un temps de génération souvent court, une croissance souvent rapide et des génomes de taille relativement modeste.

Les champignons filamenteux accompagnent l'alimentation humaine depuis des millénaires. Un premier type d'association existe via la contamination des aliments, les moisissures pouvant ainsi altérer les propriétés organoleptiques et sanitaires des produits dans lesquels elles se développent. Cette altération peut parfois présenter un risque pour la santé du consommateur, notamment du fait de la production de toxines par l'agent d'altération. Le second type d'association est désiré dans le domaine agroalimentaire, l'organisme étant utilisé pour la production de produits fermentés (fromages, charcuteries, tempeh, tofu…) notamment pour ses apports organoleptiques. Dans ce contexte, *Penicillium roqueforti* est une moisissure retrouvée dans les deux types d'associations, en tant que contaminant sur divers types de matrices (ensilage, pain, yaourt…) mais est surtout connu mondialement en tant qu'auxiliaire de fermentation dans les fromages à pâte persillée (Roquefort, gorgonzola, …).

Une étude basée sur le séquençage de génomes de souches de *P. roqueforti* a mis en évidence une différenciation en populations liées à certains types d'environnement. Ainsi, avant le début de ces travaux de thèse, quatre populations avaient été identifiées par Dumas *et al*. (2020), qui correspondent, d'une part, à deux populations domestiquées pour la production fromagère (Roquefort et non-Roquefort) et, d'autre part, à des populations associées soit à des ensilages soit à du bois de coupe et des aliments altérés. Ces groupes génomiques montrent des différences phénotypiques. Ainsi, les souches des populations fromagères présentent une meilleure capacité à coloniser le fromage et des différences d'activité lipolytique. Ces différences d'activité lipolytique s'accompagnent d'une

différence du volatilome produit lors de l'utilisation des souches de ces populations dans la production de fromages qui vont influencer les propriétés aromatiques des fromages.

Les différences génomiques et phénotypiques observées peuvent être liées à une adaptation locale de ces populations ou à la dérive génétique, dérive génétique qui peut être plus forte dans les populations domestiquées dont l'histoire démographique montre de forts goulets d'étranglement génétique. Les groupes fromagers semblent provenir de deux événements de domestication indépendants avec une différenciation plus ancienne de la population non-Roquefort. Au sein de cette population non-Roquefort, un premier évènement de domestication aurait eu lieu, associé à un goulet d'étranglement réduisant la diversité génétique au sein du groupe, à un point tel que le groupe semble correspondre à une unique lignée clonale.

Cette thèse a pour objectifs d'approfondir la caractérisation phénotypique des populations de *P. roqueforti* témoignant d'une potentielle adaptation locale et d'identifier les déterminants génétiques associés aux différences phénotypiques observées. Ceci afin de comprendre les mécanismes d'adaptation des populations de *P. roqueforti,* notamment lors de la domestication. Pour cela, après un état de l'art du domaine d'étude, ce manuscrit s'articule en trois parties.

La première partie présente, d'une part, l'existence d'une cinquième population au sein de l'espèce *P. roqueforti* qui est associée à l'appellation fromagère "Bleu de Termignon" et, vise, d'autre part, à déterminer s'il existe des différences de croissance inter-populationnelles face à différents paramètres abiotiques. La deuxième partie concerne l'étude des différences inter-populationnelles de production de métabolites, dont des métabolites d'intérêt chez *P. roqueforti*, soit pour leurs potentiels toxinogènes, soit pour leurs potentiels pharmaceutiques, et qui sont susceptibles d'avoir un rôle adaptatif. Enfin, une dernière partie concerne l'étude des déterminants génétiques responsables des variations phénotypiques de caractères d'intérêt fromager à travers une approche par cartographie génomique. Pour cela, des descendants de croisements réalisés, en amont de la thèse, entre des parents issus des populations fromagères et/ou sauvages ont été génotypés et phénotypés pour des caractères d'intérêt fromager. L'objectif était d'identifier les *loci* en lien avec la variation de ces caractères dans la descendance et donc de mieux comprendre comment s'organise l'architecture génomique de ces caractères d'intérêt.

Ces travaux s'inscrivent dans le cadre plus large du projet FUNGADAPT ANR-19-CE20-0002-02 financé par l'Agence Nationale de la Recherche qui fait l'objet d'une collaboration entre deux laboratoires :

1) Le Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne (LUBEM), USC INRAE, Université de Bretagne Occidentale (UBO).
2) Le laboratoire Ecologie Systématique et Evolution (ESE), Université Paris-Saclay – CNRS - AgroParisTech, Gif-sur-Yvette

Le manuscrit débutera par une introduction bibliographique sur la domestication, les champignons, la moisissure *Penicillium roqueforti* et la génétique quantitative. Les résultats des parties II à IV seront exposés sous la forme d'articles en anglais. Le premier article étant publié, les deux articles suivants étant sous la forme d'articles non encore soumis. Dans la discussion du manuscrit seront discutés l'ensemble des résultats et les connaissances générées ainsi que les pistes de recherche qui en découlent.

# Table des matières

I. Introduction bibliographique ..... 11
A. Populations et domestication ..... 11
1. Théorie de l'évolution ..... 11
2. Différenciation des populations ..... 13
a) Les populations ..... 13
b) Barrières à la migration ..... 14
c) Adaptation locale ..... 14
3. Cas de la domestication ..... 16
a) Définition ..... 16
b) Caractéristiques ..... 17
c) Historique de la domestication ..... 21
B. Domestication des champignons ..... 23
1. Les champignons ..... 23
2. Domestication des champignons : contexte ..... 26
3. Exemple chez les levures ..... 28
4. Exemples chez les champignons filamenteux ..... 33
5. Outils d'étude de caractères continus : la génétique quantitative ..... 35
a) Principe ..... 35
b) Utilisation chez les champignons ..... 37
C. Le cas *Penicillium roqueforti* ..... 39
1. Position taxonomique de l'espèce *P. roqueforti* ..... 39
2. Ecologie ..... 41
3. Caractéristiques morphologiques et physiologiques ..... 44
4. Métabolisme de *P. roqueforti* ..... 48
5. Structuration en populations ..... 54
D. Objectifs de la thèse ..... 60
II. Chapitre 1 : Différenciation phénotypique des populations de *Penicillium roqueforti* ..... 61
A. Introduction et contribution ..... 61
B. Article ..... 63
Principaux résultats ..... 97
III. Chapitre 2 : Production de métabolites secondaires ..... 98
A. Introduction et contribution ..... 98
B. Article ..... 99
C. Principaux résultats ..... 136
IV. Chapitre 3 : Cartographie QTL de caractères d'intérêts fromagers chez *Penicillium roqueforti* ... 137
A. Introduction et contribution ..... 137
B. Article ..... 139
C. Principaux résultats ..... 190
V. Discussion générale et perspectives ..... 191
VI. Conclusion ..... 202

# Abréviations

AND : Andrastine

ANR : Agence nationale de la recherche

c.à.d. : C'est-à-dire

FUM : Fumigaclavine

GWAS : Étude d'association génétique à l'échelle du génome (*Genome wide association study* en anglais)

ITS : Espaceur interne transcrit (*Internal transcribed spacer* en anglais)

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance (*High performance liquid chromatography* en anglais)

MPA : Acide mycophénolique (*mycophenolic acid* en anglais)

MS : Spectrométrie de masse (*mass spectrometry* en anglais)

p.ex. : Par exemple

QTL : Locus de caractères quantitatifs (*Quantitative Trait Locus* en anglais)

QTOF MS : Spectrométrie de masse en tandem quadripôle-temps de vol (*Quadrupole Time-of*-Flight en anglais)

ROQ : Roquefortine

UPLC : Ultra performance liquid chromatography

# I. Introduction bibliographique

## A. Populations et domestication

### 1. Théorie de l'évolution

L'observation de la diversité des formes que peut prendre le vivant et leur apparente adéquation avec l'environnement interrogeait déjà les naturalistes et philosophes antiques. Aristote (384-322 av. J.-C. ), l'un des premiers naturalistes connus pour avoir proposé une classification du vivant, a mis en avant cette adéquation pour en justifier une vision finaliste. L'harmonie entre les êtres vivants et leurs environnements serait la preuve que chaque chose existe dans une finalité. Cette vision a été reprise, notamment dans les religions monothéistes, pour soutenir les textes portant sur l'origine du monde et de la vie qui supposent une création. Les idées finaliste et créationniste s'accordent sur une vision fixiste du monde vivant qui est restée longtemps majoritaire faute d'idée forte permettant d'expliquer l'harmonie naturelle sans besoin de l'intervention d'une entité extérieure. C'est dans ce contexte que se sont développées les classifications du vivant, notamment en utilisant des catégories telles que l'espèce, dont le système de nomenclature a été défini par Carl von Linné (1707-1778) au XVIIIème siècle. L'espèce est alors interprétée en son sens aristotélicien comme définie par son essence, fixe et immuable. Au cours du XVIIIème siècle, l'idée d'évolution se développe pour donner ensuite les premières théories de l'évolution, notamment la théorie du transformisme de Jean-Baptiste Lamarck (1744-1829) dans son ouvrage "*Philosophie zoologique*" en 1809. Mais ce n'est qu'après la publication par Charles Darwin (1809-1882) de "*L'origine des espèces*", en 1859, que les mécanismes fondamentaux de l'évolution sont compris. Dans son ouvrage, Charles Darwin propose, à partir de ses observations, trois mécanismes comme responsables de la diversification du vivant : l'hérédité, la descendance avec modification et la sélection naturelle. Ainsi, l'espèce n'est plus fixe et immuable mais dynamique. Cependant, Charles Darwin ne connaissait alors pas les mécanismes de la variation inter-individuelle dont il faisait l'observation, ni les mécanismes de sa transmission. En effet, ce n'est qu'à partir du début du XX$^{ème}$ siècle que furent redécouvertes les lois de Gregor Mendel (1822-1884), énoncées le siècle précédent, et qui donnèrent les bases de l'hérédité et la transmission des caractères. La mise en commun des concepts d'évolution, d'hérédité et de génétique ont permis de donner naissance à la théorie synthétique de l'évolution dès la première moitié du XX$^{ème}$ siècle.

La théorie synthétique de l'évolution est essentielle pour la compréhension et l'explication du vivant. La théorie synthétique de l'évolution met en avant divers moteurs de l'évolution des populations : la mutation, la sélection naturelle, la dérive génétique et la migration. La source de la

variation est la mutation. Celle-ci résulte notamment d'erreurs lors de réplication de l'ADN, ces erreurs sont aléatoires et génèrent de la nouveauté. Les mutations génèrent différentes versions des loci au sein des populations, ces versions sont appelées "allèles". Chaque individu a une combinaison d'allèles, majoritairement hérités, et résultant le plus souvent de mélanges entre les allèles de ses parents, mais également issus de ses propres mutations, ceci constitue le génotype de l'individu. L'expression du génotype fait émerger des combinaisons de caractères apparents, le phénotype. La sélection naturelle opère un filtre sur les phénotypes. Ce filtre favorise les allèles permettant un phénotype augmentant la valeur sélective de l'individu, c'est-à-dire sa capacité à survivre et à avoir une descendance fertile (Figure 1). La dérive génétique correspond à la part de variation de fréquence allélique liée à des effets stochastiques. À chaque génération la transmission des allèles et combinaison d'allèles est probabiliste. Une population étant finie, il existe des différences de fréquences alléliques entre une génération et la génération suivante qui s'expliquent uniquement par cette part d'aléa. Les effets de la dérive génétique peuvent être accentués lorsqu'il y a subitement une baisse du nombre de reproducteurs dans une population, potentiellement suivie d'une reprise démographique, ce qui survient en cas de goulet d'étranglement génétique ou d'effet fondateur. Enfin, la migration d'individus d'une population à l'autre induit un flux de gènes homogénéisant les fréquences alléliques. Ces flux de gènes peuvent permettre l'introgression de certains allèles et donc l'introduction de nouveaux caractères au sein de populations. Ensemble, ces mécanismes entraînent une variation des fréquences alléliques au sein des populations, ce qui constitue l'évolution.

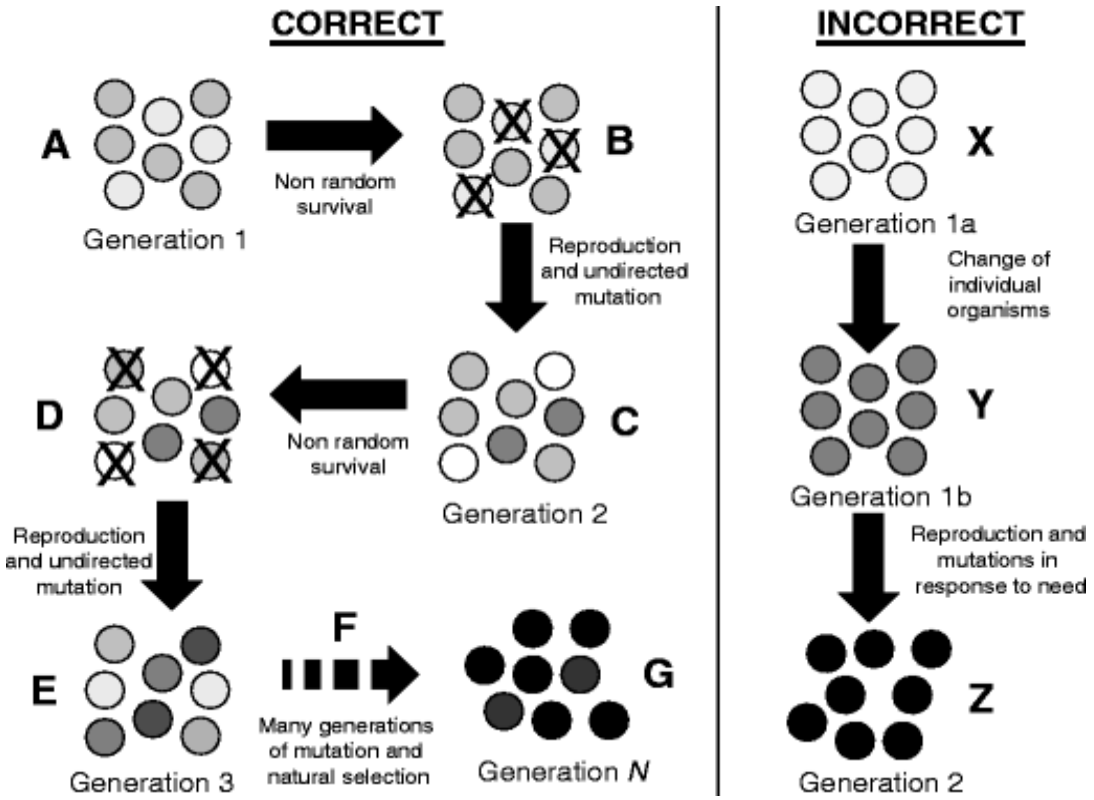



**Figure 1 : Représentation simplifiée de la sélection naturelle : (A) Une population d'organismes présente une variation d'un caractère particulier qui est important pour la survie dans un environnement donné. Ici, une couleur plus foncée augmente les chances de survie jusqu'à l'étape de reproduction. (B) Les individus survivants de la génération 1 (majoritairement les individus portant le caractère avantageux) se reproduisent pour donner naissance à la génération 2. (C) Comme le caractère en question est héritable, cette deuxième génération ressemble (en grande partie) à la génération parentale. Cependant, des mutations aléatoires se sont produites, ainsi la descendance présente une variation de phénotypes autour des valeurs parentales. (D) Les individus de la génération 2 ont subi le même filtre environnemental favorisant les individus présentant un phénotype avantageux, (E) les survivants de la génération 2 se reproduisent à nouveau et de nouvelles mutations, délétères ou bénéfiques, apparaissent parmi les descendants. (F) Ce processus se répète sur de nombreuses générations, conduisant à une concentration des traits les plus bénéfiques dans les générations suivantes (Adaptation). Tiré de Gregory, 2009.**

## 2. Différenciation des populations

### a) Les populations

La population est le premier niveau d'observation des mécanismes évolutifs. Elle recouvre généralement un ensemble d'individus d'une même espèce au sein desquels les échanges génétiques sont plus fréquents qu'entre populations différentes (Milgroom & Fry 1997). La diminution des flux de gènes entre populations fait qu'une population possède des fréquences alléliques différentes et peut présenter un pool génétique (somme des génotypes des individus de la population) différent de celui

des autres populations. En pratique, on délimite donc les populations en comparant les profils alléliques des individus. Une déviation des fréquences des génotypes par rapport à un attendu panmictique (croisements au hasard au sein des populations) nous informe sur une structuration en populations (Pritchard *et al.*, 2000 ; Falush *et al.*, 2003 ; Hubisz *et al.*, 2009 ; Skotte *et al.*, 2013). Ce type de définition de population basée sur la panmixie ne s'applique pas aux lignées avec une reproduction exclusivement clonale comme chez certains champignons. Dans les espèces clonales ou lignées clonales on peut cependant parfois distinguer des ensembles discrets, se ressemblant davantage génétiquement entre eux qu'avec d'autres, et qui correspondent à des lignées clonales distinctes (Balloux *et al.*, 2003). Dans le cadre de ce manuscrit, ce type de lignée non recombinante sera nommé "population clonale" pour les désigner directement.

### b) Barrières à la migration

Les populations se forment lorsque le niveau de migration ne compense pas les modifications de fréquence allélique liées à la dérive génétique et à l'adaptation. La diminution du niveau de migration entre groupes d'individus d'une même espèce peut avoir lieu lorsque des barrières aux flux de gènes existent. Ces barrières peuvent être, mais pas uniquement, des barrières environnementales (cours d'eau ou reliefs), un fractionnement des habitats (ou répartition discrète des habitats), un effet pléiotrope entre adaptation locale et choix du partenaire sexuel ou encore liées au contrôle de la reproduction des organismes par une autre espèce (domestication). Ces barrières ont pour effet de diminuer la probabilité de rencontre entre des groupes d'individus et ainsi de diminuer le flux de gènes entre ces groupes.

### c) Adaptation locale

Dans un contexte de structuration en populations, les mécanismes d'adaptation ont lieu si la variation de fréquences alléliques au sein d'une population n'est pas uniquement due à la dérive génétique. Une population est dite "localement adaptée" si les individus de cette population ont des différences de phénotypes et une plus grande valeur sélective dans leur environnement que les individus d'autres populations de la même espèce (Kawecki & Ebert, 2004). L'environnement biotique et/ou abiotique entre deux habitats variant, les populations ne sont alors pas soumises aux mêmes pressions sélectives. Ce différentiel de pression sélective peut avoir pour effet de favoriser des phénotypes différents dans les différentes populations, si l'effet de la sélection est plus fort que ceux de la dérive et de la migration, c'est la divergence adaptative (Figure 2). Il est possible de mettre en évidence une adaptation locale en comparant les valeurs sélectives de deux populations dans leurs habitats d'origine respectifs et dans les habitats d'autres populations par des expériences de transplantation réciproque (Figure 2. C). Une autre approche consiste à déterminer les paramètres

variant entre les habitats et à représenter le paysage adaptatif de deux populations en représentant les valeurs sélectives moyennes de chaque population en fonction de la variation de ces conditions environnementales (Figure 2. A). Une différence dans les conditions environnementales optimales entre populations peut être révélatrice de l'adaptation locale de ces populations. Une limite de ces approches survient lorsque l'habitat d'une population est difficile à caractériser, soit parce que l'on n'y a pas directement accès en ce cas la transplantation réciproque n'est pas possible, soit parce qu'il est très hétérogène en ce cas l'isolement des paramètres est plus complexe. Le contexte le plus favorable à la différenciation adaptative est donc un contexte de faible migration inter-population associée à une forte pression de sélection, contexte notamment retrouvé lors de la domestication (Figure 2 D).

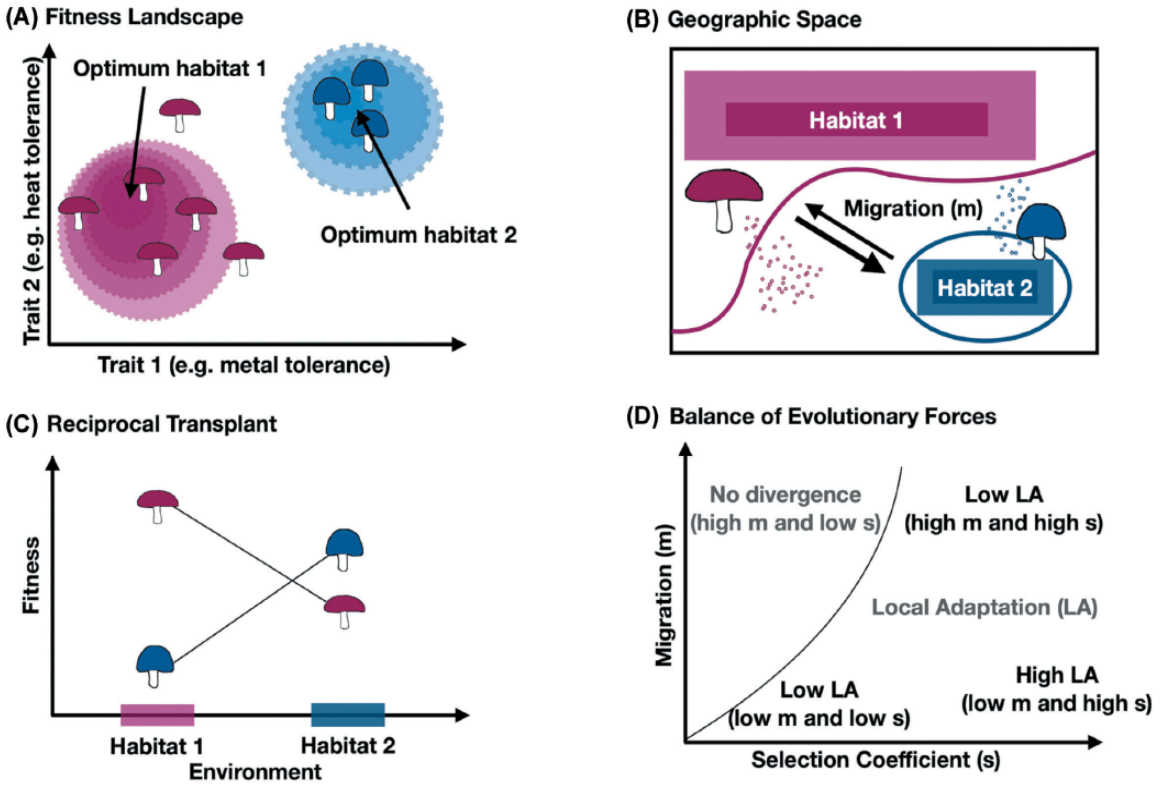



**Figure 2 : Adaptation locale : la sélection naturelle est un processus par lequel certains allèles favorables dans un environnement augmentent en fréquence dans les populations au fil des générations. Pour représenter l'adaptation locale, le modèle le plus simple est de représenter deux populations vivant dans des environnements au sein desquels des allèles différents sont avantageux. A) Les deux populations vont s'adapter, leurs valeurs phénotypiques optimales vont se rapprocher des valeurs de l'habitat. B) Il existe des flux migratoires entre les populations des deux habitats qui ont pour effet d'homogénéiser les fréquences alléliques des populations. C) On peut mesurer le niveau d'adaptation locale par des expériences de transplantation en mesurant la valeur sélective moyenne de chaque population dans chacun des deux habitats. (D) La force de la sélection naturelle (s), la migration (m) influencent la capacité des populations à s'adapter à leurs environnements locaux. A noter, la dérive génétique (et donc taille des populations) est aussi un facteur impactant le niveau d'adaptation locale d'une population. Tiré de Bazzicalupo, 2022.**

Au moins trois types de pressions sélectives peuvent intervenir dans l'adaptation locale : les facteurs abiotiques, les interactions biotiques et la sélection sexuelle (Gladieux *et al*, 2014). Les facteurs abiotiques tels que la température, la disponibilité en eau, la composition minérale (notamment présence de métaux lourds) peuvent être des moteurs de la différenciation écologique. Ainsi, chez *Neurospora crassa* ou *Arabidopsis thaliana*, par exemple, des populations présentent des adaptations locales aux conditions de température (Ellison *et al*, 2011 ; Clauw *et al*, 2022). Les adaptations aux conditions biotiques, quant à elles, peuvent être liées à une interaction hôte/symbionte ou hôte/pathogène, à une compétition interspécifique ou encore à la domestication (Gladieux *et al*, 2014). Enfin la sélection sexuelle, par exemple chez les champignons, peut être liée aux niveaux de production de phéromones (Rogers & Greig 2009 ; Gladieux *et al*., 2014).

## 3. Cas de la domestication

### a) Définition

La domestication est généralement considérée comme étant le processus de modification d'une population par le biais de la sélection humaine sur des caractères qui sont bénéfiques à l'être humain. Cette définition est discutée, notamment par la nécessité ou non d'un caractère conscient à la sélection et par l'importance qu'elle accorde à ce que la sélection soit faite, uniquement, par un être humain. Des définitions plus larges ont été proposées, notamment par Purugganan en 2022, pour qui la domestication est un processus co-évolutif émergent d'une relation mutualiste, dans laquelle une espèce (le « domesticateur » ou sélectionneur) construit un environnement dans lequel il supervise activement la survie et la reproduction d'une autre espèce (le "domestiqué") pour en retirer des avantages en termes de ressources et/ou de services (Figure 3). Ainsi, la domestication ne nécessite pas de volonté du "domesticateur" (ni son absence) et peut être observée en dehors des activités humaines. Des indices de domestications non-humaines existent d'ailleurs, à titre d'exemple, certains insectes (p. ex. fourmis et scarabées) ont réalisé des domestications d'espèces de champignons (Mueller & Gerardo, 2002 ; Mueller *et al.*, 2005), antérieures aux domestications par l'être humain. Ici les avantages retirés par le domestiqué sont le plus souvent la dispersion, l'apport de nutriments et une protection apportée par le "domesticateur" contre les ravageurs (Lecocq, 2018 ; Biedermann et Vega 2019;). Pour le "domesticateur", les avantages sont principalement un apport en nourriture continu (aliment), une utilisation de l'espèce domestiquée pour structurer son habitat (matériaux) et/ou une protection contre les pathogènes par la production de composés antimicrobiens (Biedermann et Vega 2019). Dans ce manuscrit, c'est le cas d'une espèce de champignon présentant des populations domestiquées par l'espèce humaine qui va nous intéresser. Donc, dans un souci de concision, pour la suite du manuscrit le terme de domestication sera utilisé pour désigner les cas de domestication pour

lesquels le domesticateur est l'être humain. L'expression « domestication au sens large » pourra être utilisée si la désignation va au-delà de ce cadre. Aussi, des spécificités présentées dans ce manuscrit comme des caractéristiques de l'étude de la domestication pourraient n'être spécifiques qu'à la domestication par l'être humain.

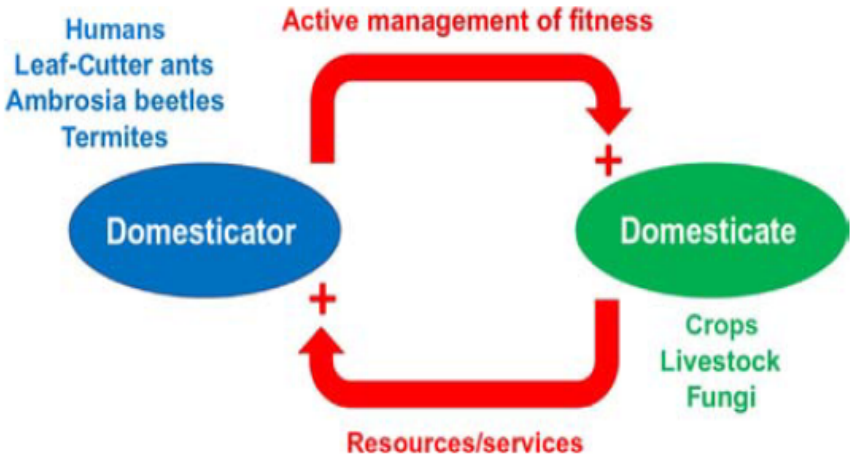



**Figure 3 : Domestication émergeant d'une relation mutualiste. La supervision active de la valeur sélective de la population domestiquée par le sélectionneur (ou domesticateur) permet de lui assurer ressources et services par le domestiqué, résultant en une double interaction positive (+). Tiré de Purugganan, 2022.**

### b) Caractéristiques

La particularité de la domestication par rapport à la sélection naturelle réside dans le fait de l'interaction avec un sélectionneur. Ici, le sélectionneur exerce une pression sélective sur la population domestiquée en favorisant les phénotypes allant dans son intérêt. Ainsi, la valeur sélective d'un individu devient fortement dépendante du sélectionneur. La domestication commence généralement par un premier prélèvement d'un faible nombre d'individus qui seront isolés du reste de l'espèce (Smýkal *et al.*, 2018). Cette première sélection induit un effet fondateur réduisant la diversité génétique initiale dans les groupes domestiqués et induisant une forte dérive génétique (Figure 4). Par ses choix et/ou le cadre de vie qu'il produit, le sélectionneur favorise ou accentue une différenciation phénotypique en empêchant la migration entre lignée sauvage et lignée domestiquée, et en exerçant une forte pression de sélection. Au fil des générations, l'être humain favorise les individus présentant des caractères intéressants pour lui, par exemple dans une optique de production alimentaire, induisant une différenciation des populations domestiquées par rapport aux populations sauvages sur ces caractères et une modification des fréquences alléliques (Figure 4). Les populations domestiquées sont également soumises à de nouvelles pressions sélectives liées à l'environnement construit par le sélectionneur, ces conditions pourront différer de l'environnement d'origine des populations. Le processus de domestication implique donc deux éléments importants pour une différenciation

phénotypique rapide, une migration faible entre populations domestiquées et sauvages, et une forte pression de sélection, ce qui en fait un bon modèle pour l'étude de l'adaptation. De plus, l'habitat des populations domestiquées et les critères de sélection sont connus, ce qui permet de déterminer les phénotypes présentant un avantage adaptatif dans le contexte de la domestication.

Parce que le nouvel environnement contrôlé par le sélectionneur présente des caractéristiques différentes de l'environnement auquel sont associées les populations sauvages, les populations domestiquées peuvent perdre en valeur sélective dans l'environnement "sauvage" par rapport aux populations non-domestiquées. Cette perte de valeur sélective hors de l'environnement contrôlé par le sélectionneur peut être directement liée à l'adaptation à des pressions de sélection contraires dans le nouvel environnement (par exemple la diminution de l'agressivité chez les animaux) ou à la dérive génétique (sur des caractères qui ne sont plus soumis à la sélection) (Zohary *et al.*, 1998 ; Wilkins *et al.*, 2014). En plus de la perte de diversité génétique liée à la taille de l'effectif fondateur et la sélection de phénotype d'intérêt, le sélectionneur favorise les lignées pures, clonales ou a minima avec une homozygotie des régions génomique d'intérêt (étape d'amélioration variétale ; Figure 4). Cette sélection permet de fixer les allèles favorables, mais tend également à diminuer la diversité génétique existant dans les lignées domestiquées (Figure 4). La diminution de la valeur sélective hors de l'environnement contrôlé, et l'augmentation en nombre et en fréquence d'allèles délétères constitue un « fardeau génétique », regroupé sous l'expression « coût de la domestication » ou dégénérescence des lignées domestiquée lorsqu'elle est spécifique à la domestication (Lu *et al.*, 2006 ; Moyers *et al.*, 2018).

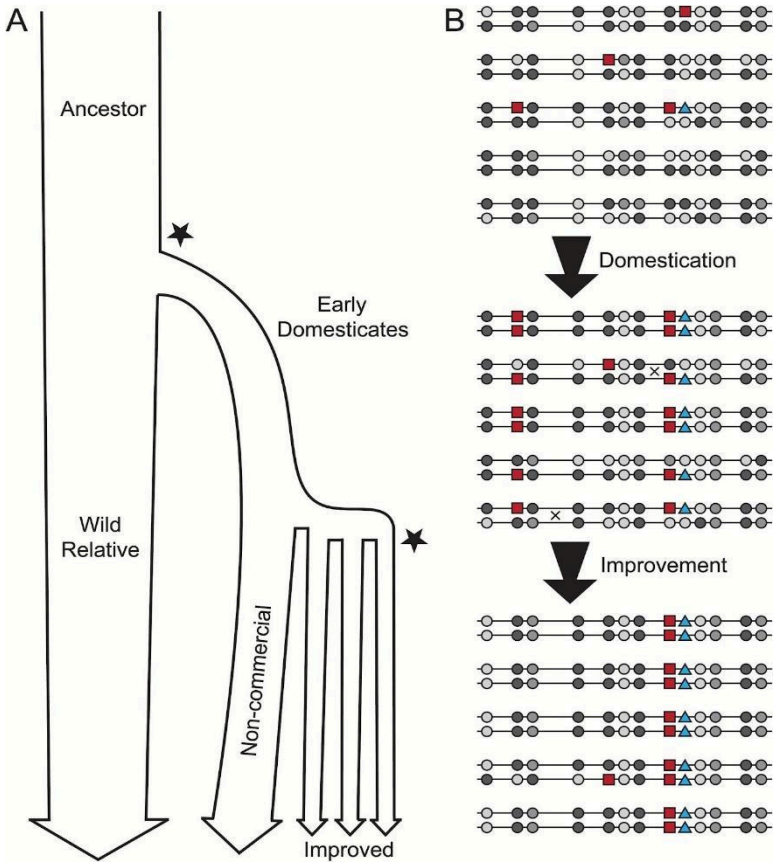



**Figure 4 : Processus de domestication et d'amélioration variétale. (A) Changement de la taille de population efficace (nombre d'individus reproducteurs) des populations lors du processus de domestication et d'amélioration. Les étoiles indiquent les séparations de lignées. (B) Effet de la sélection anthropique, le triangle bleu représente une région d'intérêt (induisant un phénotype sélectionné), les carrés rouges représentent des allèles délétères et les cercles des allèles neutres. Dans la population ancestrale, quatre allèles délétères sont présents en faible fréquence et l'hétérozygotie est élevée. Après domestication, l'allèle ciblé et les allèles liés augmentent en fréquence et l'hétérozygotie diminue, trois des quatre allèles délétères sont conservés et augmentent en fréquence. Après amélioration variétale (*improvement*) qui consiste en un renforcement de la sélection, il y a une diminution de l'hétérozygotie, particulièrement pour l'allèle ciblé et les allèles co-ségrégeants (dont un allèle délétère), qui s'accompagne d'une diminution de la variation allélique. Tiré de Moyers *et al*, 2018.**

Les croisements entre lignées différentes peuvent permettre à la fois de réintroduire de la diversité génétique dans des lignées domestiquées, l'apport de nouveaux caractères et de profiter de la « vigueur hybride » liée à l'hétérozygotie des *loci* présentant un allèle délétère récessif et/ou les purger.

D'autre part, les environnements de domestication ne sont pas dénués d'interactions biotiques, particulièrement présentes dans le cas des environnements de fermentation microbienne. Ces interactions prolongées et répétées sont propices aux échanges intra- et interspécifiques *via* des transferts horizontaux de gènes particulièrement chez les microorganismes où ils sont beaucoup plus fréquents (Anderson 2009, Richard & Talbot, 2013, Gonçalves & Gonçalves, 2022). Ainsi, une partie

des gènes impliqués dans l'adaptation au milieu laitier chez *Lactococcus lactis* est présente sur de larges plasmides acquis par des transferts horizontaux (Siezen *et al.*, 2005). Chez les levures, l'adaptation à l'environnement de domestication peut également être permis par des transferts horizontaux de gènes, ainsi des lignées de *Saccharomyces cerevisiae* possèdent plusieurs gènes de bactéries lactiques impliqués dans les processus de vinification (Gonçalves & Gonçalves, 2022).

Les caractères phénotypiques communs à plusieurs lignées domestiquées et absents de leurs apparentés non domestiqués sont regroupés dans l'appellation « syndrome de domestication ». Ces syndromes de domestication ont particulièrement été mis en évidence chez les plantes et les animaux, et peuvent différer suivant l'utilisation que l'être humain fait des populations domestiquées (Wilkins *et al.*, 2014 ; Stetter *et al.,* 2017; Smýkal *et al.*, 2018). Chez les plantes, le syndrome de domestication se caractérise notamment par une perte de la dormance des graines, une diminution de l'égrenage et le grossissement des fruits et/ou graines (Meyer *et al.,* 2012, Stetter *et al.*, 2017, Figure 5). Chez les mammifères, le syndrome de domestication correspond à une augmentation de la docilité, une modification de la couleur, une réduction de la taille des dents et/ou une modification de la forme de la queue et des oreilles (Driscoll *et al.,* 2009 ; Wilkins *et al*., 2014). Les syndromes de domestication chez les microorganismes sont moins connus du fait notamment d'un intérêt plus récent du phénomène de domestication chez ces êtres vivants.




**Figure 5. Représentation du syndrome de domestication chez des plantes d'intérêts agronomiques. (A) Grossissement et augmentation du nombre de grains chez le maïs lors de la domestication (à droite), par rapport à la téosinte (à gauche), plus proche apparentée sauvage. (B) Diminution de l'égrenage chez le riz lors de la domestication. (C) Augmentation de la taille des fruits pour la tomate. (D) Perte des ramifications (dominance apicale), et augmentation de la taille de la fleur et des graines chez le tournesol. Tiré de Stetter *et al*, 2017 et adapté de Doebley *et al*, 2006.**

### c) Historique de la domestication

Les données génétiques et archéologiques permettent de retracer le premier événement de domestication, il y a plus de 15 000 ans, avec la domestication de loup qui a donné les lignées de chiens actuels, *Canis lupus domesticus* (Perri *et al.*, 2021). La plupart des domestications ont cependant eu lieu après l'entrée dans l'holocène, il y a 11 000 ans, ou à la révolution agricole (« révolution néolithique ») qui a vu une augmentation de la sédentarisation de groupes humains (Ahmad *et al.*, 2020). La culture et l'élevage d'espèces végétales, animales et microbiennes ont permis un apport régulier en nourriture et l'accroissement démographique des populations humaines agricoles. Cette transition dans le mode d'obtention de ressources correspond au début du processus de domestication de nombreuses lignées aujourd'hui utilisées en agriculture (Larson *et al.*, 2014) comme

le riz et le maïs (il y a plus de 5 000 ans) (Sweeney & McCouch, 2007 ; Ranere *et al.*, 2009), dans l'élevage comme les moutons (il y a plus de 9 000 ans) (Larson & Burger, 2013) ou encore pour la production de produits fermentés par des levures (il y plus de 5000 ans) (Gallone *et al.*, 2018). Jusqu'à maintenant, plus de 1000 plantes (Smýkal *et al.*, 2018), plus de 40 espèces animales (Ahmad *et al.*, 2020) et des dizaines d'espèces microbiennes sont reconnues comme ayant été domestiquées par l'être humain (Douglas & Klaenhammer, 2010). Si ces domestications ont majoritairement eu lieu pour des raisons alimentaires, elles ont également un impact dans la production de ressources non alimentaires (laine, coton, soie, cire…), de ressources sanitaires (production d'antibiotiques, pharmacopée…) ou de services (transport, pollinisation ou encore ornementation…).

Depuis "L*'origine des espèces*" en 1859, puis dans "*De la variation des animaux et des plantes sous l'action de la domestication*" en 1868, deux ouvrages publiés par Charles Darwin, la domestication est utilisée comme exemple et modèle pour comprendre l'adaptation. Aujourd'hui, c'est encore un modèle largement utilisé pour la compréhension des mécanismes génétiques et génomiques responsables de l'adaptation phénotypique (Larson *et al.*, 2014). Cependant, la domestication demeure moins étudiée chez les champignons que chez les plantes et les animaux, alors que les champignons présentent de nombreux avantages en tant qu'organismes modèles, à savoir des temps de génération souvent courts, des génomes souvent de petites tailles et peu de contraintes d'espace pour leur culture.

# B. Domestication des champignons

## 1. Les champignons

Depuis les travaux de Carl Woese *et al.* (1990), le vivant est classé en 3 domaines : les bactéries (*Bacteria*), les archées (*Archaea*) et les eucaryotes (*Eukaryota*). L'avènement de phylogénie moléculaire a permis de classer les champignons (*Fungi*) au sein des eucaryotes parmi les opisthocontes (*Opisthokonta*) (Woese *et al*. 1990 ; Burki *et al.*, 2020 ; Figure 6). Les opisthocontes partagent, entre autres caractères dérivés, l'utilisation du glycogène comme macromolécule de stockage et l'utilisation de la chitine comme macromolécule structurale (paroi cellulaire des *Fungi* et cuticule des *Ecdysozoa*). Ainsi, les champignons sont plus proches des animaux que des plantes *(Chloroplastida*), groupe au sein duquel ils étaient préalablement classifiés (Naranjo-Ortiz & Gabaldón, 2019).

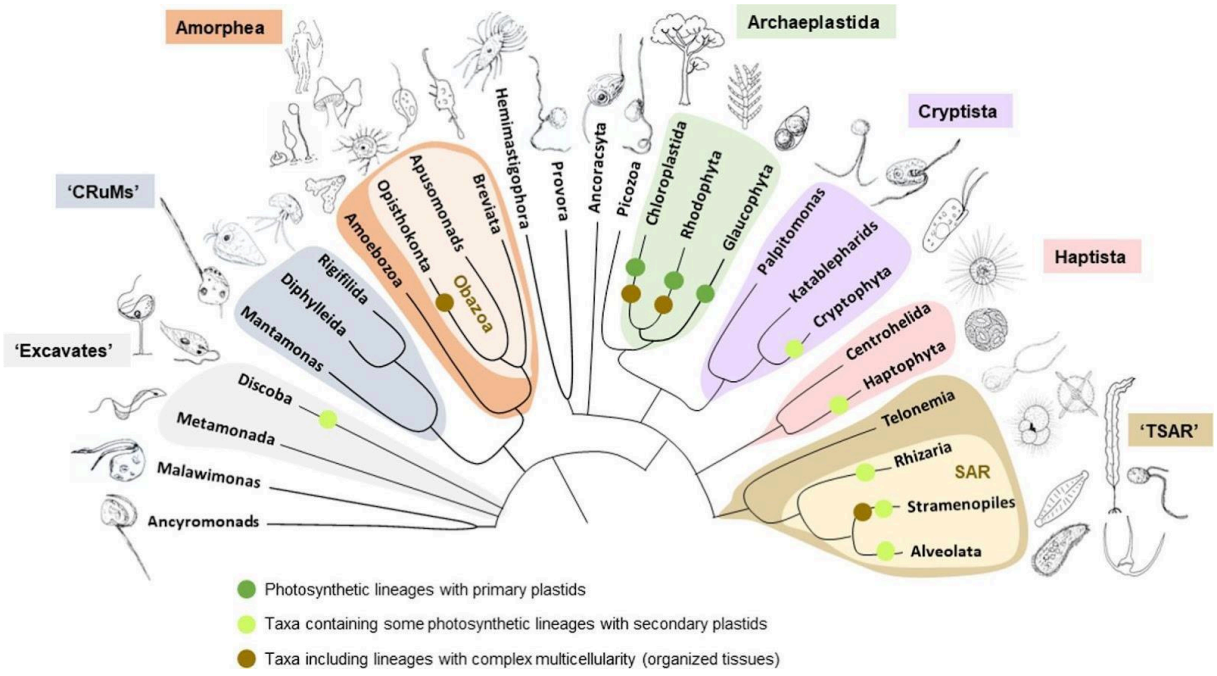



**Figure 6 : Schéma représentant les relations phylogénétiques entre les principaux groupes de l'arbre phylogénétique des eucaryotes. Les champignons avec les animaux font partie des *Opisthokonta* au sein des *Amorphea* (en orange). Extrait de López-García & Moreira, 2023.**

Les classifications les plus récentes recensent au moins 7 *phyla* dans le « règne » *Fungi* dont les plus étudiés sont les *Mucoromycota*, *Basidiomycota* et *Ascomycota* (Naranjo-Ortiz & Gabaldon, 2019 ; James *et al*., 2020 ; Li *et al.*, 2021 ; Figure 7). C'est au sein de ces trois *phyla* que sont retrouvées la majorité des espèces fongiques connues (>97%, James *et al*., 2020), parmi lesquelles on

retrouve les espèces fongiques domestiquées. Bien qu'il n'y ait pas de synapomorphie (caractère dérivé partagé au sein du phylum) permettant de définir spécifiquement les champignons, ils sont généralement caractérisés par la présence d'une paroi chitineuse, d'ergostérol dans leur membrane cellulaire et d'un mode particulier d'acquisition de nutriments, appelé "osmotrophie". L'osmotrophie consiste en une digestion externe due à la sécrétion d'enzymes fragmentant les macromolécules organiques (telles que la cellulose, la lignine, des lipides ou des protéines) en plus petits fragments (acides gras, sucres simples ou peptides) qui sont ensuite internalisés de manière passive ou active (Richards & Talbot, 2018). Le caractère souvent actif de l'acquisition des nutriments fait que le terme "absorbotrophie" lui est parfois préféré. Cependant, parce que c'est le terme le plus employé internationalement, le terme "osmotrophie" sera utilisé dans ce document.

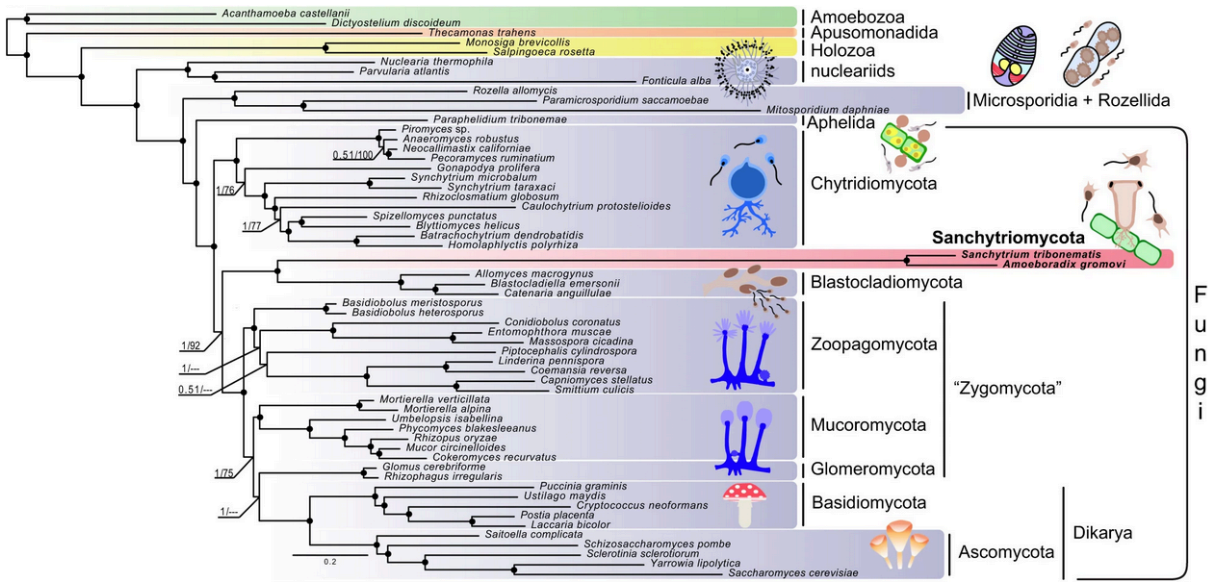



**Figure 7 : Arbre phylogénétique des champignons (*Fungi*) basé sur l'analyse des séquences de 264 protéines provenant de 59 espèces (Galindo *et al.*, 2021)**

Les *Fungi* représentent un groupe très divers d'organismes ayant un rôle essentiel, mais souvent peu visible, dans des écosystèmes aussi variés que les sols, les forêts, les roches, les océans ou les aliments (James *et al*, 2020). Ils ont notamment un rôle important dans le fonctionnement des écosystèmes, en décomposant la matière et en mettant ainsi les minéraux essentiels extraits à disposition des autres organismes ou en recyclant de la matière organique difficile à dégrader comme la lignine. Au sein des champignons, il existe une grande diversité de modes de vie hétérotrophes. Ainsi, on y retrouve des saprobiontes, qui se nourrissent à partir de matières organiques en décomposition, des pathogènes, qui se nourrissent de tissus vivants ou morts de plantes et d'animaux, et peuvent parfois être parasites de ceux-ci, des symbiontes, qui vivent en relation mutualiste avec des organismes autotrophes ou hétérotrophes, et également des prédateurs, par exemple capables de capturer et se nourrir de nématodes. En plus de la diversité de modes de vie et d'habitats, les

champignons se distinguent par la présence de formes mycéliennes, pluricellulaires, et de formes levures, unicellulaires. Certaines espèces sont capables de passer alternativement d'une forme levure à une forme filamenteuse (mycélienne) en formant des hyphes ou pseudo-hyphes, elles sont dites "dimorphes". C'est notamment le cas de *Candida albicans* (Sudbery, 2011), *Talaromyces marneffei* (Wang *et al.*, 2023) ou encore *Mucor circinelloides* (McIntyre *et al*, 2002 ; Lübbehüsen *et al.*, 2003). Chez les levures, la croissance se fait par bourgeonnement ou fission cellulaire alors que, chez les champignons filamenteux (mycéliens), la croissance se fait par l'élongation des hyphes en région apicale, l'ensemble du réseaux d'hyphes constituant le mycélium.

La plupart des espèces de champignons domestiquées connues le sont pour la production de produits fermentés et font partie du *phylum* des *Ascomycota*. Il s'agit du groupe avec la plus grande diversité connue chez les champignons avec plus de 98 000 espèces recensées (Bánki *et al*, 2023 ; https://www.catalogueoflife.org). Les ascomycètes sont caractérisés par la production de spores sexuées (ascospores) à l'intérieur de cellules spécialisées, les asques (ou ascii), qui ont donné le nom du phylum. L'asque est le sporocyste des ascomycètes, une grande cellule différenciée sous forme de sac dans laquelle se trouve, le plus souvent, quatre à huit spores produites à la suite de la méiose (Figure 8). Le cycle de vie des ascomycètes comprend trois phases : haploïde, dicaryotique et diploïde, qui sont séparées par trois étapes : la plasmogamie, la caryogamie et la méiose (Figure 8). La plasmogamie correspond à une étape durant laquelle les cytoplasmes de deux cellules haploïdes fusionnent pour donner une cellule présentant les deux noyaux « parentaux », dite "dicaryotique". Ces deux noyaux fusionnent lors de la caryogamie pour aboutir à une cellule diploïde, le zygote. Enfin, la méiose rétablit l'état haploïde, qui est l'état le plus courant durant le cycle de vie de nombre d'ascomycètes, parmi lesquels l'espèce *Penicillium roqueforti* qui va nous intéresser dans ce manuscrit. A l'issue de la méiose, les ascospores, les spores "sexuées" des ascomycètes, sont produites. Les ascomycètes, comme les autres *Fungi,* sont également capables de reproduction asexuée, soit par fragmentation du mycélium soit *via* la production de spores asexuées qui peuvent être produit par bourgeonnement ou par différenciation d'hyphes préexistants, les conidies (Wyatt *et al.*, 2013). Cette forte propension à la multiplication végétative chez le champignon a pu être un facteur facilitant la domestication de certaines lignées de manière inconsciente.

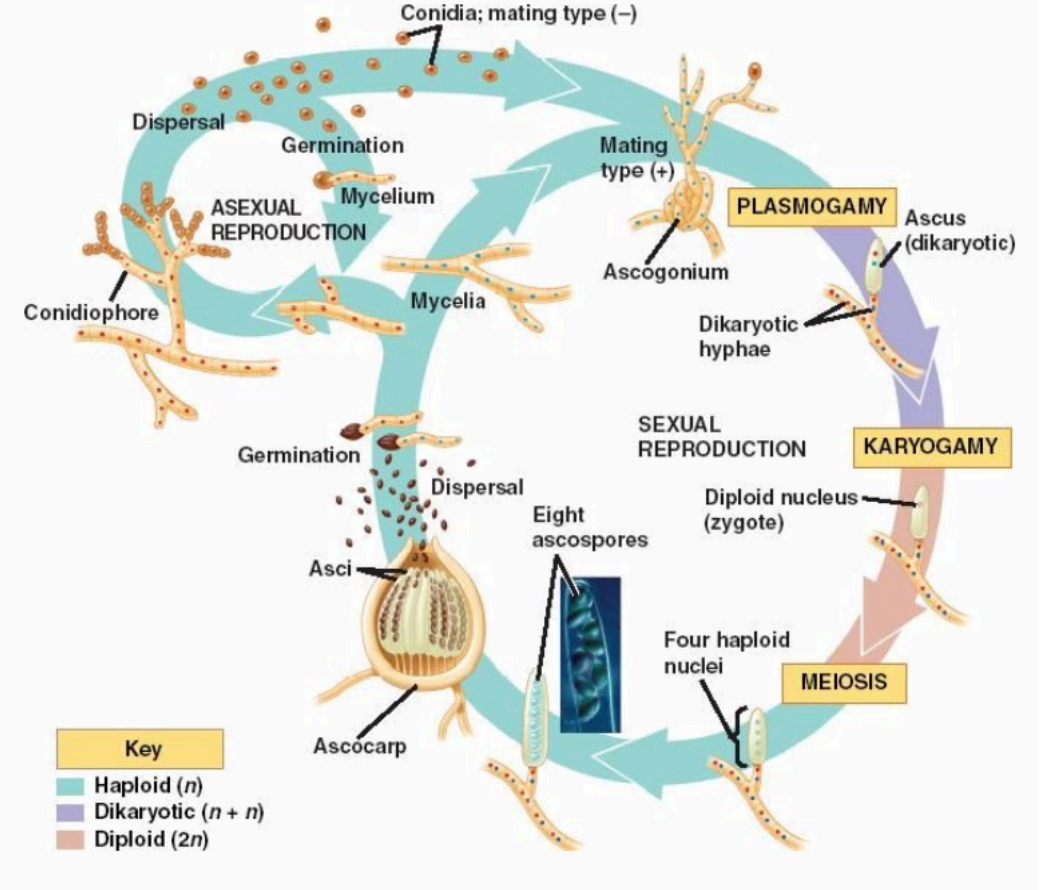



**Figure 8 : Cycle de vie typique des champignons filamenteux du phylum *Ascomycota*. En bleu sont représentées les phases haploïdes, en violet la phase dicaryotique lors de laquelle les noyaux « parentaux » sont dissociés, en orange la phase diploïde (pour le zygote) suite à la caryogamie, qui est la fusion des noyaux.**

## 2. Domestication des champignons : contexte

Contrairement à la plupart des espèces domestiquées, la domestication des microorganismes et notamment des champignons a majoritairement eu lieu initialement de manière non-intentionnelle. Ce n'est qu'à la fin du XVIIème siècle que les microorganismes ont été découverts, suite à l'invention du microscope, par Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723). Puis il a fallu attendre le XIXème siècle pour que l'implication de ces microorganismes dans les fermentations soit mise en évidence et par là que soient reconnues les espèces microbiennes domestiquées pour leur rôle dans la production alimentaire (Steensels & Verstrepen., 2014). Pourtant, ceux-ci accompagnent notre alimentation via les produits fermentés depuis des millénaires (Figure 9). Avec la révolution néolithique, les changements de mode de vie liés à la sédentarisation d'une partie des populations humaines, et à la domestication d'espèces animales et végétales ont accentué le besoin de conservation des aliments entre les périodes de production. La fermentation est utilisée depuis le néolithique, notamment pour la conservation des aliments, principalement pour les céréales et le lait, des aliments plus fortement retrouvés dans

l'alimentation humaine par l'apport de l'agriculture et à l'élevage. Les plus anciennes traces d'utilisation de produits fermentés coïncident avec la révolution néolithique, la plus ancienne boisson céréalière fermentée documentée remontant au onzième millénaire avant notre ère (Liu *et al*., 2019) et le plus ancien produit laitier fermenté documenté au cinquième millénaire avant notre ère (Tamang *et al*., 2020). La domestication des microorganismes entre dans ce contexte, avec un changement de pratiques qui a probablement eu un rôle critique historiquement, à savoir l'utilisation traditionnelle du « backslopping » (réensemencement), consistant à continuellement inoculer le produit d'une précédente fermentation réussie pour initier une nouvelle fermentation (Steensels *et al*., 2019). Cette pratique aujourd'hui encore utilisée (notamment pour la production de bière, de kéfir ou encore de yaourt) a pu permettre aux producteurs d'exercer inconsciemment une sélection sur les microorganismes. Aujourd'hui, les champignons participent à la production de nombreux produits fermentés qui reçoivent un regain d'intérêt avec le développement de nouveaux types de produits fermentés (Figure 9). L'augmentation du contrôle des « ingrédients » microbiologiques tend à favoriser l'utilisation de ferments industriels qui permettent de diminuer la variabilité des propriétés organoleptiques du produit fini et les risques sanitaires.




**Figure 9 : Exemple de nourritures et boissons fermentées traditionnelles et récentes (Terefe, 2016).**

Pour la production fromagère, les espèces fongiques domestiquées connues font principalement partie des *Ascomycota*. On y retrouve aussi bien des levures, comme *Saccharomyces cerevisiae* ou *Debaryomyces hansenii* (p.ex. pour la production de mozzarella ou de Saint-Nectaire),

que des champignons filamenteux présents en surface des fromages (p.ex. *Penicillium camemberti*, *Bisifusarium domesticum*, *Sporendonema casei*) ou encore à l'intérieur des fromages (comme *P. roqueforti* ; Figure 9).

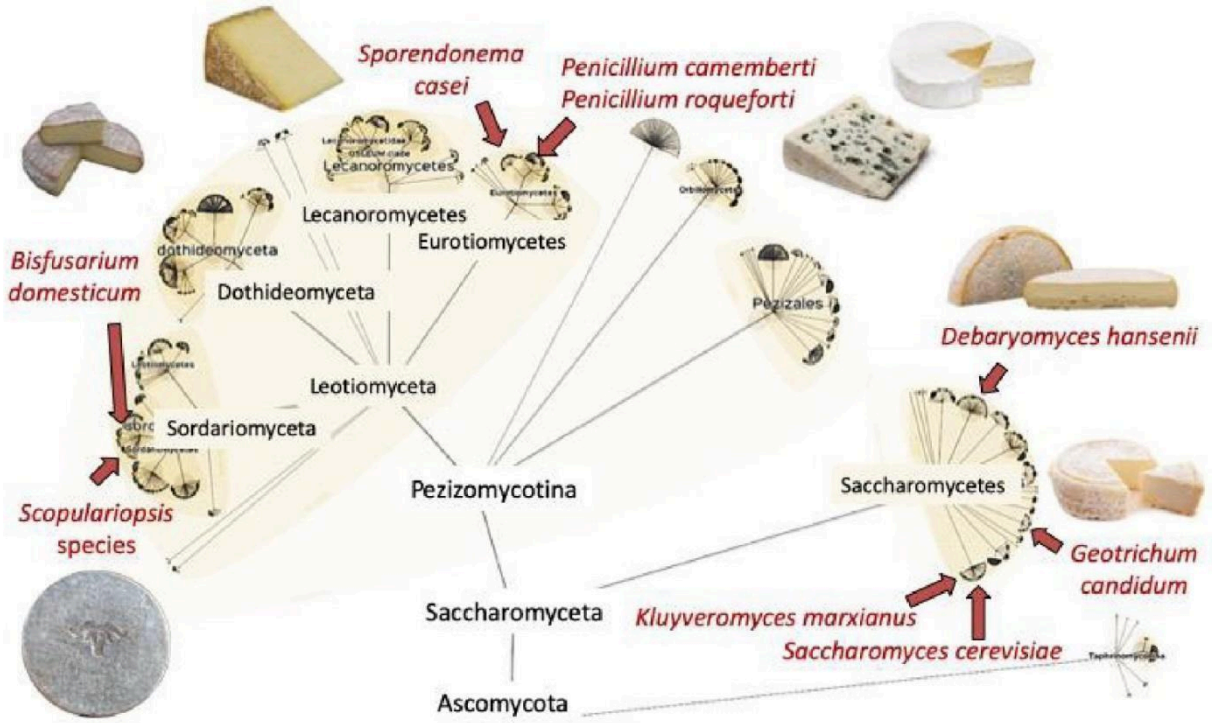


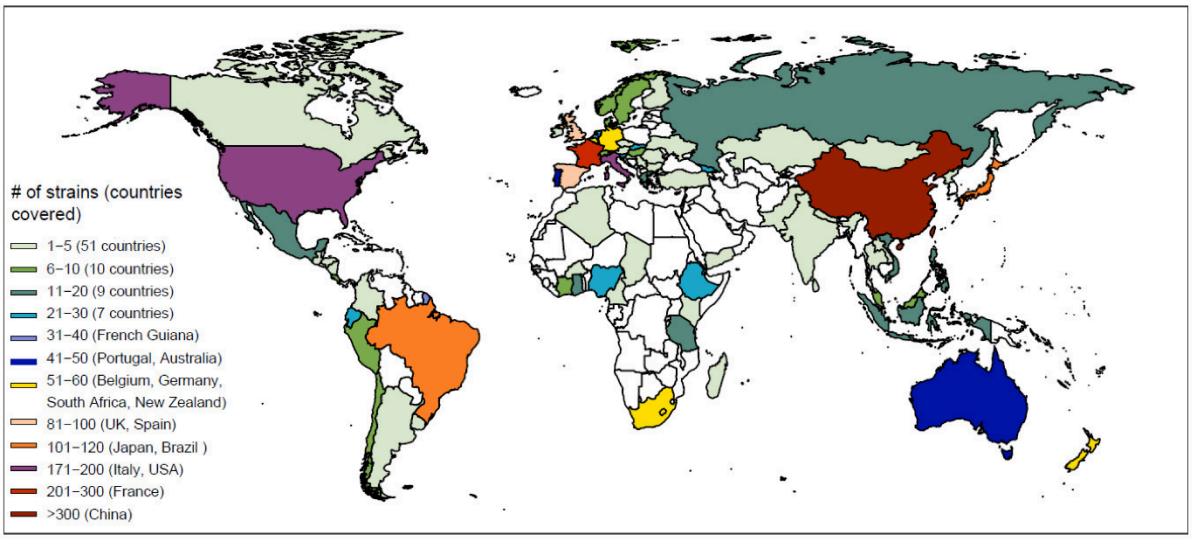

**Figure 9 : Position des espèces domestiquées pour la production fromagère sur l'arbre phylogénétique des *Ascomycota* (Ropars *et al.*, 2020).**

## 3. Exemple chez les levures

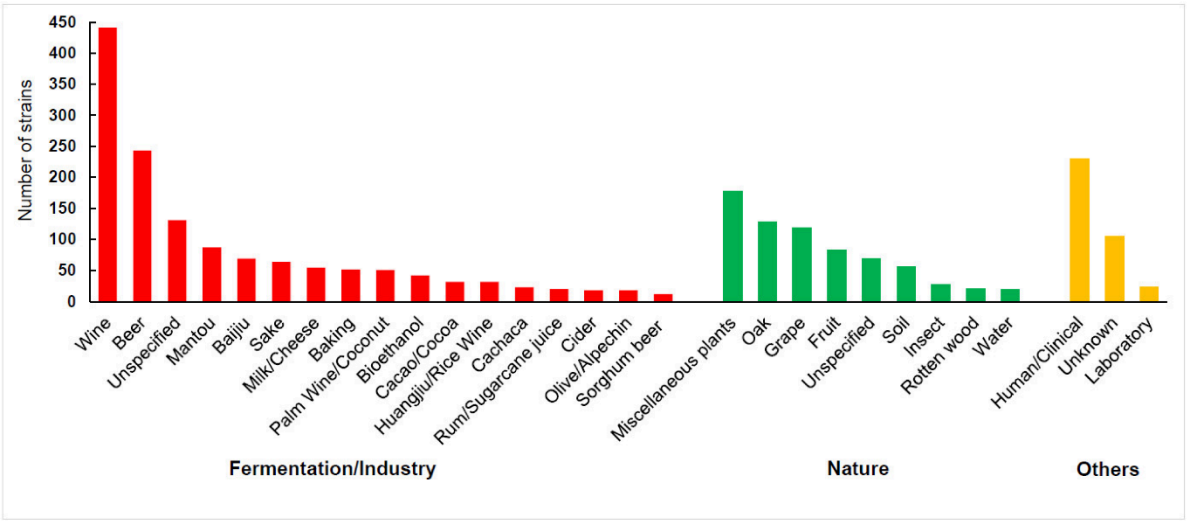
L'exemple emblématique de champignon domestiqué pour la production de produits fermentés est la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Depuis au moins le troisième siècle avant notre ère, *S. cerevisiae* est largement utilisée pour la production de pain, de vin et de bière (Gallone *et al*., 2016 ; Gallone *et al*., 2018 ; Bai *et al*., 2022). On a retrouvé des traces directes de *S. cerevisiae* dans l'alimentation (par le séquençage d'ADN fossile de fèces humaines) de membres de la civilisation du Hallstatt (âge de fer) (Maixner *et al*., 2023). Aujourd'hui, son utilisation dans les fermentations est très large de par sa distribution à travers le monde et de par les types de produits concernés (Figure 10). Depuis sa découverte et ses premières descriptions au XIX$^{ème}$ siècle, *S. cerevisiae* est devenue l'un des organismes modèles les plus étudiés, et est notamment le premier organisme eucaryote dont le génome a été complètement séquencé (Goffeau *et al*., 1996).

Pendant longtemps, *S. cerevisiae* était considérée comme une espèce exclusivement domestiquée, les souches occasionnellement isolées à partir d'environnements dits "sauvages" (c.a.d.

non créés par des humains) étaient alors considérées comme provenant de lignées férales (c.a.d. provenant de populations domestiquées retournées dans un environnement naturel ; Bai *et al*., 2022). Le développement des méthodes d'enrichissement et l'utilisation de milieux spécifiques, notamment de milieux enrichis en éthanol (Sniegowski *et al*., 2002), a permis d'améliorer nos capacités à isoler des souches de *S. cerevisiae* d'environnements naturels dans lesquels elles peuvent ne représenter qu'une faible proportion de la communauté microbienne (Bai *et al*., 2022). L'accessibilité à une nouvelle diversité de souches, notamment par ces méthodes, a permis de mettre en évidence le caractère ubiquitaire de la présence de *S. cerevisiae* dans les écosystèmes, et n'a pas permis de circonscrire de niche écologique préférentielle pour l'espèce en environnement naturel (Figure 10).




(A)




(B)

**Figure 10 : Origine géographique (A) et écologique (B) des souches de *Saccharomyces cerevisiae* dont le génome était publiquement disponible en 2021 (Bai *et al*., 2022).**

Depuis 2005, une distinction entre des populations de *S. cerevisiae* sauvages et domestiques a été réalisée sur base de la comparaison de séquence de 5 gènes de 81 souches (Fay & Benavides., 2005). Aujourd'hui, le séquençage des génomes de centaines de souches isolées d'environnements variés (vin, bière, saké, olive, sol, tronc d'arbre, fruit … ; Figure 10) a permis une étude approfondie de la structure des populations chez *S. cerevisiae*. On dénombre à ce jour 27 populations de *S. cerevisiae* différenciées génétiquement, associées soit à différents types de matrices, soit à différentes aires géographiques (Figure 11 ; Peter *et al*., 2018). Parmi les populations de *S. cerevisiae*, 11 sont identifiées comme étant sauvages, 2 comme partiellement domestiquées, 13 comme domestiquées et 1 comme férale (Figure 11). Cette caractérisation des populations de *S. cerevisiae* a permis de

déterminer une origine asiatique de l'espèce ainsi que la présence de plusieurs évènements de domestications indépendants expliquant la répartition des populations domestiquées (Figure 11 ; Gallone *et al*, 2016 ; Peter *et al*., 2018 ; Duan *et al.*, 2018 ; Bai *et al*., 2022).

La domestication de populations de *S. cerevisiae* pour des usages spécifiques correspond à une adaptation locale des populations à leurs environnements de domestication. Ainsi, les populations du vin présentent une plus forte résistance aux sulfites utilisés comme agents antiseptiques dans la production de vin (notamment liée à une surexpression d'une pompe à efflux du sulfite, SSU1), une utilisation plus efficace des peptides (liée à une acquisition de transporteur de peptide FOT par transferts horizontaux), ce qui est un caractère avantageux dans un milieu limité en azote comme le vin, ainsi qu'une plus grande résistance au cuivre et à une osmolarité élevée (Legras *et al*., 2018 ; De Guidi *et al.*, 2023). Les populations liées à la production de bières et de pains présentent une utilisation plus efficace du maltose, liée à la duplication de gènes impliqués dans le catabolisme du maltose (MAL) : les populations de bières peuvent également être associées à une utilisation plus efficace du maltotriose (Gallone *et al*, 2016) et celle associée au pain à une utilisation de l'isomaltose liée à l'expression des gènes IMA (Bigey *et al.*, 2021 ; De Guidi *et al.*, 2023). Aujourd'hui, les souches utilisées pour la production de pain sont issues de deux populations distinctes : une polyploïde présentant un temps de latence court avant fermentation et une population présentant une duplication de gènes du métabolisme du maltose (Bigey *et al*., 2021). La population de *S. cerevisiae* associée aux environnements laitiers présente des caractères adaptatifs liés à ces environnements, à savoir une forte capacité de croissance en présence de galactose associée à l'acquisition par transfert horizontal de gènes GAL impliqués dans le catabolisme du galactose (Legras *et al*., 2018). Ainsi, la domestication de *S. cerevisiae* a induit une spécialisation de populations aux conditions de l'environnement de domestication. Chez *S. cerevisiae* les principaux caractères adaptatifs identifiés ont été attribués à des modifications de ploïdie (aneuploïdie, diploïdie, tétraploïdie), à la duplication de gènes et/ou à des transferts horizontaux permettant une adaptation rapide.

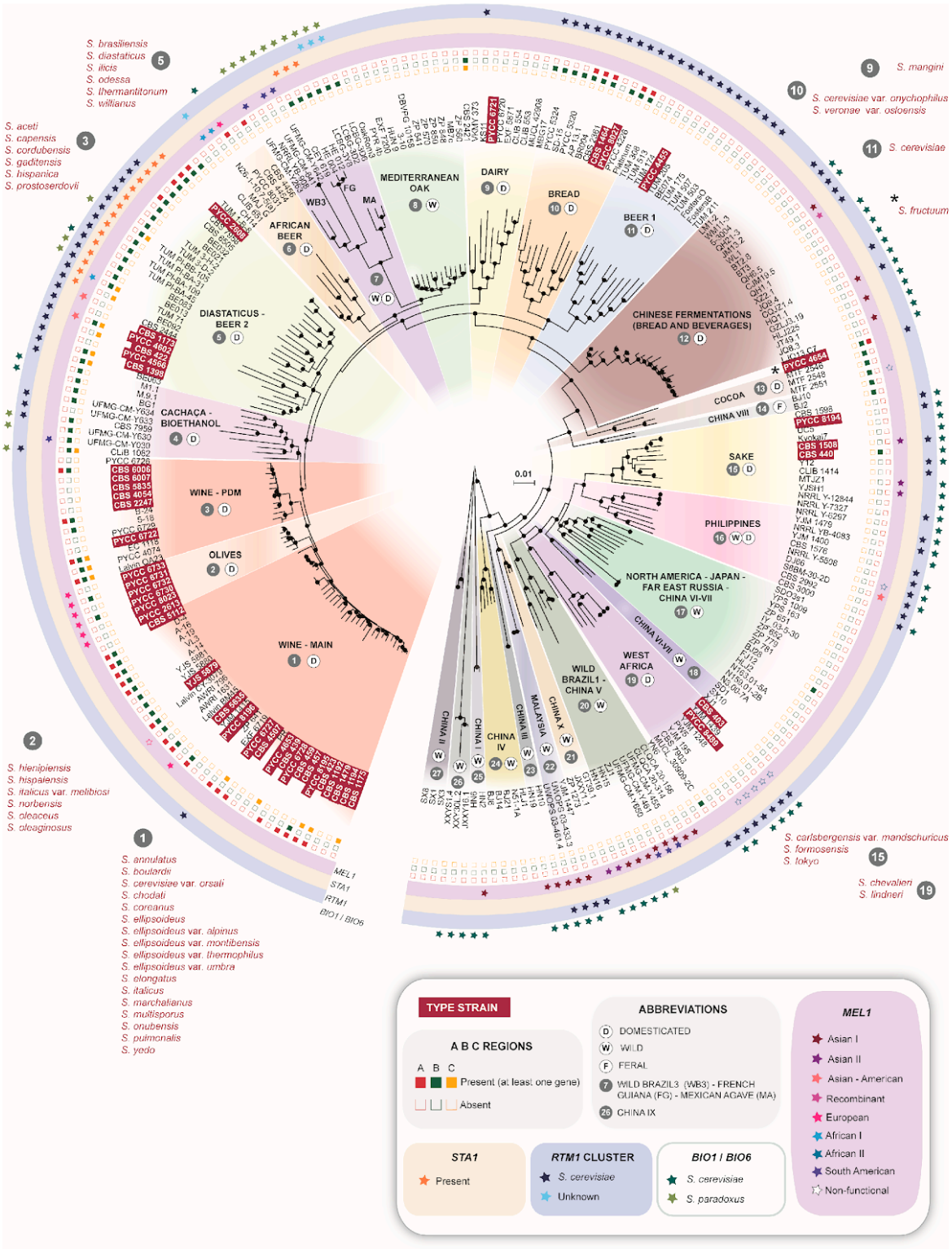



**Figure 11 : Arbre phylogénétique par maximum de vraisemblance des populations de *Saccharomyces cerevisiae* construit avec 248 souches et 1 520 302 SNPs (single nucleotide polymorphism). Les synonymies sont indiquées en rouge pour chacune des 27 populations concernées (Pontes *et al.*, 2020).**

D'autres espèces de levures ont été domestiquées pour des usages alimentaires, comme les espèces de levures psychrotolérantes *S. eubayanus* et *S. uvarum* domestiquées pour la production de bière à fermentation basse (lager ; avec une fermentation à froid) et/ou de cidre (Almeida *et al.*, 2014). Comme l'isolement reproductif n'est pas complet entre *S. eubayanus* et *S. cerevisiae*, des croisements générant des hybrides sont possibles. Ainsi, *S. pastorianus* est une espèce issue de ce type d'hybridation qui est utilisée aujourd'hui en fermentation basse du fait de son caractère psychrotolérant hérité de *S. eubayanus* (Monerawela & Bond., 2018, Gallone *et al*., 2019). Des levures comme *Toluraspora delbrueckii* ont également été domestiquées, notamment pour la production de bières, de vins, de produits panifiés (avec une diversification des gènes MAL chez les souches associées) et pour la production de produits laitiers fermentés (avec une acquisition de gènes GAL pour les souches isolées de produits laitiers ; Albertin *et al.*, 2014 ; Silva *et al*., 2022). D'autres, comme *Brettanomyces bruxellensis*, ont également des populations adaptées à des environnements de production alimentaire anthropiques comme le vin et présentent une plus grande résistance aux sulfites (Avramova *et al*., 2018). Sa présence n'étant pas voulue par les producteurs du fait de la production de composés phénoliques non désirés, le caractère « domestiqué » de l'espèce peut donc être discuté. Cependant, comme pour les espèces domestiquées, on retrouve des populations sauvages et des populations spécialisées dans des environnements conçus par l'homme (populations anthropisées), ce qui en fait un bon modèle à comparer aux espèces de microorganismes domestiqués (Harrouard *et al*., 2023).

## 4. Exemples chez les champignons filamenteux

L'étude des champignons filamenteux pour leurs caractères domestiqués est plus récente et moins poussée que chez *S. cerevisiae*. Pourtant, comme pour les levures, leurs usages pour la production de produits fermentés sont variés. Parmi les espèces de champignon filamenteux domestiqués emblématiques, on peut compter *Aspergillus oryzae* et *Aspergillus sojae* pour la production d'alcool traditionnel asiatique, de tempeh, de miso ou encore de sauce soja (Watarai *et al*., 2019 ; Frisvad *et al*., 2019 ; Chang & Hua, 2023). Ces espèces sont distinctes de leurs proches apparentées *Aspergillus flavus et Aspergillus parasiticus*, mais peuvent aussi être considérées comme des variétés, sous le nom d'*A. flavus* var. *oryzae* et *A. parasiticus* var. *sojae* (Kurtzman *et al*., 1986). Les deux lignées domestiquées pour des usages similaires présentent des caractéristiques convergentes, notamment une diminution de la toxigénicité et une augmentation des activités protéolytique et glycolytique (Steensels, *et al*., 2019). D'autres espèces ont été domestiquées pour la production de charcuterie, comme *P. salamii* et *P. nalgiovense,* avec une convergence phénotypique vers une plus faible lipolyse et protéolyse ainsi qu'une couleur plus claire chez les souches issues de charcuteries chez les deux espèces (Lo *et al.*, 2023). Cependant, la faible diversité génétique observée

ne permet pas de différencier les populations domestiquées des populations non-domestiquées dans ces espèces (Lo *et al*, 2023).

Historiquement, en Europe, la plupart des champignons filamenteux utilisés dans des produits fermentés l'ont été en production fromagère, parmi lesquels les plus emblématiques appartiennent au genre *Penicillium* (c.-à-d. *P. roqueforti* et *P. camemberti*), mais aussi d'autres genres comme *Bisifusarium*, *Sporendonema*, *Scopulariopsis*, *Mucor* ou encore *Geotrichum* (Ropars *et al*, 2012). Des convergences génétiques et phénotypiques ont été observées entre les espèces et populations domestiquées pourtant phylogénétiquement distantes (Ropars & Giraud, 2022). Parmi les cas de convergences génétiques figurent plusieurs espèces de *Penicillium* domestiquées, nommément, *P. camemberti*, *P. biforme* et *P. roqueforti*, qui possèdent des régions génomiques communes et identiques à 100%, obtenues par transferts horizontaux (Ropars *et al*., 2015). De la même manière, *P. nalgiovense* et *P. salamii* partagent des régions génomiques transférées horizontalement et absentes de leurs proches apparentés (Lo *et al.*, 2023). Les espèces domestiquées tendent également à perdre leurs capacités à produire des toxines du fait de voies de production incomplètes, ce qui est un caractère avantageux pour une utilisation alimentaire. C'est le cas chez *P. roqueforti* avec la perte de la capacité de production d'acide mycophénolique (Gillot *et al.*, 2017a), mais également chez *P. camemberti* var. *caseifulvum* qui n'est plus apte à produire de l'acide cyclopiazonique (Ropars *et al*., 2020) ou chez *A. flavus* var. *oryzae* et *A. parasiticus* var. *sojae* qui ont perdu leur capacité à produire de l'aflatoxine (Gibbons *et al*., 2012 ; Gibbons & Rinker, 2015 ; Stenseels *et al*., 2019). D'autres caractères convergents bénéfiques pour la production alimentaire ont également été sélectionnés. Ainsi, *Geotrichum candidum* et *P. camemberti* ont évolué vers un phénotype plus duveteux, une absence de pigmentation et une croissance plus lente que leurs plus proches apparentés (Ropars *et al*., 2020 ; Bennetot *et al*., 2023), les populations domestiquées de *P. roqueforti*, *P. biforme*, *P. camemberti* et *G. candidum* ont également pu développer une plus forte capacité d'exclusion d'espèces compétitrices (Ropars & Giraud, 2022). La production d'arômes perçus positivement par les consommateurs est également plus élevée pour les populations domestiquées chez *P. roqueforti* et *G. candidum* comme chez la levure *S. cerevisiae* (Alves *et al.*, 2015 ; Gillot *et al*, 2017a ; Caron *et al*., 2021 ; Bennetot *et al*., 2023).

Ainsi, de nombreux phénotypes peuvent être différents entre populations au sein d'une espèce, parmi lesquels des variations phénotypiques liées à la domestication, et la plupart de ces caractères correspondent à des caractères quantitatifs continus. L'étude génomique seule ne permet souvent pas de déterminer la variation responsable du changement de phénotype de façon certaine et l'impact de la variation génétique sur le phénotype. Un moyen de réduire le nombre de candidats en amont des variations phénotypiques observées entre populations (et pouvant être liées à la domestication) est d'utiliser des approches de génétique quantitative.

## 5. Outils d'étude de caractères continus : la génétique quantitative

### a) Principe

La génétique quantitative s'intéresse à déterminer la part de la variation de phénotype quantifiable due à la variation génétique. Pour qu'un caractère puisse être sélectionné dans une lignée, il faut qu'il soit héritable, c'est-à-dire qu'une part de la variance phénotypique s'explique par une variance génétique. Dans une population, la variance phénotypique notée $V_P$ peut se décomposer en la somme de la variance génétique $V_G$ de la variance environnementale $V_E$, et de la variance résultant de l'interaction entre l'environnement et le génotype $V_{GxE}$, soit $V_P = V_G + V_E + V_{GxE}$ (l'interaction $V_{GxE}$ étant souvent supposée négligeable). L'héritabilité au sens large ($H^2$) est la proportion de variance phénotypique due à la variance génétique : $H^2 = V_G / V_P$. Elle varie donc de 0 à 1. Une valeur de 0 signifie que l'ensemble de la variation phénotypique s'explique par la variation environnementale, autrement dit qu'il n'y a pas de variation génétique impactant ce caractère dans la population étudiée. Une valeur de 1 signifie que l'ensemble de la variation phénotypique s'explique par la variation génétique, autrement dit qu'il n'y a pas de variation environnementale impactant ce caractère dans les conditions de la mesure. La part de variance génétique $V_G$ est elle-même décomposable en i) variance génétique additive ($V_A$) qui correspond à la part de variance s'expliquant par variation allélique d'un locus indépendamment du fond génétique, ii) variance génétique de dominance ($V_D$), qui est présente si l'organisme est diploïde et qu'une région pouvant être hétérozygote présente un allèle dominant, et iii) la variance d'épistasie ($V_I$) qui a lieu si l'effet conjoint de deux loci diffère de la somme de leurs effets (c'est-à-dire s'il y a une interaction entre les loci). Comme *P. roqueforti*, qui est l'objet d'étude de ces travaux de thèse, est haploïde pour la plus grande partie de son cycle de vie, seules les variances additives et d'épistasie participent à $V_G$. La génétique quantitative s'intéresse à identifier les régions du génome (et si possible les gènes) responsables de cette variation et l'architecture générale de l'adaptation.

Une des premières étapes en génétique quantitative consiste à réaliser une cartographie génétique ou carte génétique. La carte génétique représente la position relative de marqueurs polymorphes en fonction du taux de recombinaison entre les marqueurs. Son unité est le centimorgan (cM), une distance de 1 cM entre deux marqueurs indiquant une probabilité de 1% qu'il y ait recombinaison entre les deux marqueurs durant un évènement de méiose. Il y a déséquilibre de liaison lorsque la fréquence d'association de deux allèles est différente d'une association aléatoire, c'est-à-dire de la multiplication des fréquences alléliques. La plupart du temps, un déséquilibre de liaison est révélateur d'un lien génétique dû à la proximité physique entre les marqueurs, mais il peut également être révélateur d'incompatibilités alléliques ou encore d'une structure de population.

La génétique quantitative utilise deux grands types de méthodes : d'une part les études d'association génomique au sein de populations (GWAS pour *genome wide association studies*) et d'autre part la cartographie des loci de caractères quantitatifs par analyses de descendance (cartographie QTL pour *quantitative trait locus* ; Figure 12). Les GWAS se basent sur l'analyse de génotypes de populations naturelles panmictiques (populations dans lesquelles tous les individus peuvent se croiser au hasard), mais sont peu utiles dans le cas où il y a des déséquilibres de liaison liés à une forte structure de population, d'autant plus si les populations sont clonales, ce qui est le cas pour au moins une population de notre espèce d'intérêt. Dans ce cas, les marqueurs co-ségrégeants (présentant un déséquilibre de liaison) peuvent être simplement liés à cette structure et non simplement à la proximité physique entre les marqueurs, ce qui limite les capacités à déterminer les régions impliquées dans la variation phénotypique. Un moyen de casser les déséquilibres de liaison associés à ces structures est de procéder à des croisements, c'est l'approche par cartographie QTL. Pour la cartographie QTL, la population étudiée est issue d'un croisement entre deux parents génétiquement et phénotypiquement différenciés, qui peuvent être issus de populations clonales différentes. Les évènements de recombinaison sont normalement aléatoirement répartis sur le génome et leur nombre dépend de la taille de la descendance analysée et du nombre de générations effectuées. Si la taille de la descendance est suffisamment importante pour que les évènements de recombinaison aient lieu tout le long du génome alors les déséquilibres de liaison persistants sont révélateurs d'incompatibilité allélique. Un point faible de cette approche est de restreindre la variabilité génétique aux variations entre les deux parents à l'origine du croisement, variations qui ne sont qu'une partie de la variabilité génétique expliquant les variations phénotypiques au sein de l'espèce. La capacité à identifier des loci contrôlant les caractères quantitatifs va dépendre de la puissance statistique de l'analyse (liée à la taille de la descendance et au nombre de marqueurs polymorphes génotypés), de l'héritabilité du caractère étudié (quantité de variance théoriquement explicable par la variation génétique) et du nombre de loci concernés (part de variance expliquée par chacun des loci).

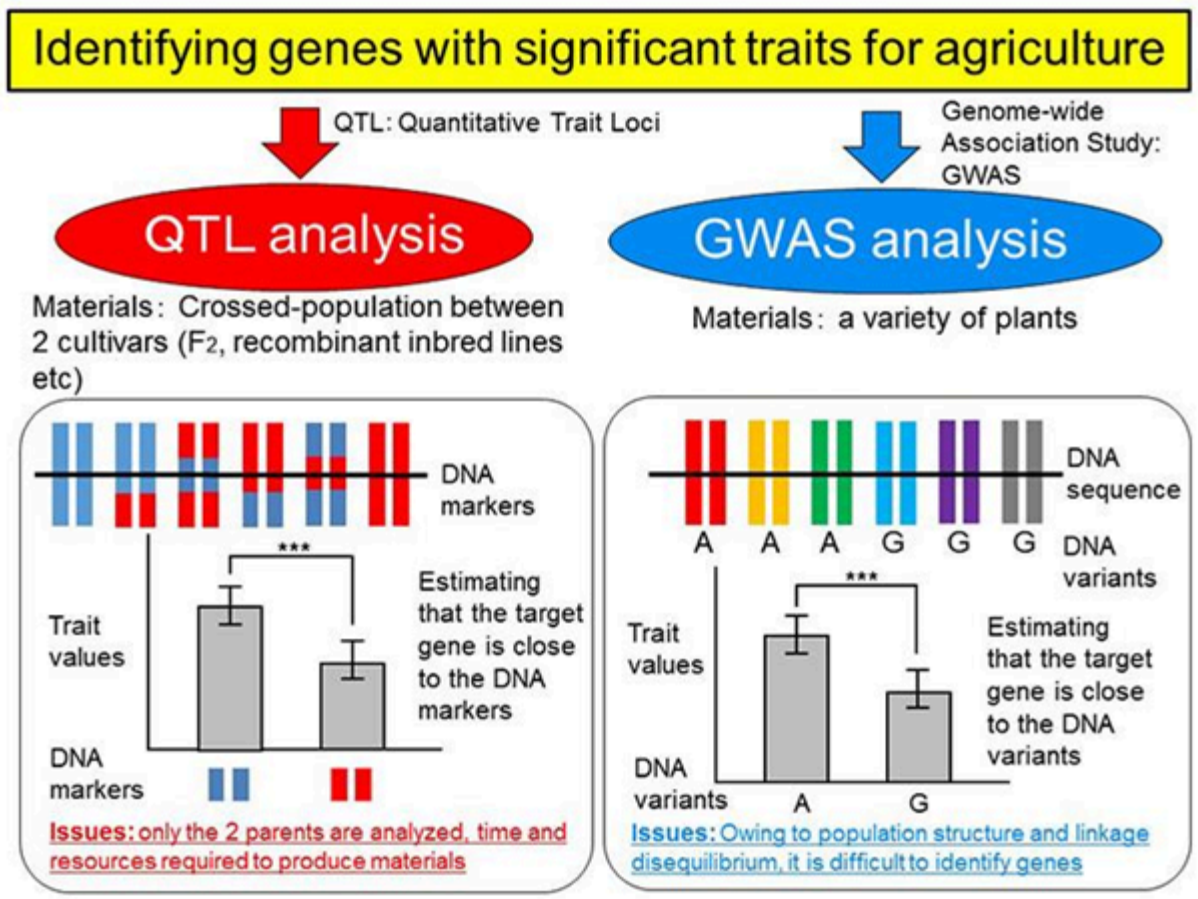



**Figure 12 : Principe, avantages et inconvénients des deux principales méthodes en génétique quantitative : l'étude par cartographie de locus à caractère quantitatif (QTL) et étude d'association génomique (GWAS). Pour la cartographie QTL chez les organismes majoritairement haploïdes, la génération F1 est équivalent à une F2 de population diploïde avec backcross ; source : Kobe university, https://www.kobe-u.ac.jp/en/NEWS/research/2016_06_24_01.html).**

### b) Utilisation chez les champignons

Chez les champignons, les approches par cartographie QTL ont moins été utilisées que chez les animaux et les plantes. Cependant, cette approche a tout de même été utilisée chez un bon nombre d'espèces de *Basidiomycota* et d'*Ascomycota* (Foulongne-Oriol *et al*., 2012a). Chez les *Basidiomycota,* l'approche QTL a principalement été utilisée chez des espèces consommées par les humains, notamment en étudiant l'architecture génétique de caractères d'intérêt pour la production alimentaire (résistance à des pathogènes, taux de croissance ou la couleur). C'est le cas chez *Pleurotus ostreatus* (Larraya *et al*., 2002, Larraya *et al*., 2003), *Pleurotus cornucopiae* (Zhang *et al*., 2021), *Agaricus bisporus* (Foulongne-Oriol *et al*., 2012b, Foulongne-Oriol *et al*., 2014) ou encore *Agaricus subrufescens* (Foulongne Oriol *et al.*, 2016). Quelques espèces pathogènes, comme *Cryptococcus*

*neoformans,* ont également fait l'objet d'études de l'architecture génétique de facteurs de virulence (Lin *et al*., 2006 ; Vogan *et al*., 2016). Chez les ascomycètes, c'est principalement pour l'étude de facteurs de virulence de pathogènes humains ou de phytopathogènes que les approches QTLs ont été employées, notamment chez *Aspergillus nidulans* (Christians *et al*., 2011), *Magnaporthe grisea* (Sreewongchai *et al.*, 2009), *Colletotrichum lentis* (Bhadauria *et al*., 2018), *Fusarium circinatum* (De Vos *et al*., 2011), *Fusarium graminearum* (Laurent *et al*. 2021) ou encore *Zymoseptoria tritici* (Lendenmann *et al.*, 2014 ; Stewart *et al.*, 2018 ; Stapley & McDonald, 2023). Plus récemment, l'approche a aussi été utilisée pour des espèces n'ayant pas de lien avéré avec des activités humaines comme la levure *Lachancea waltii,* pour l'étude de l'architecture génétique de la résistance à différents composés couvrant des familles chimiques variées (p. ex. azole, formamide, caféine) (Peltier *et al*., 2021).

Comme souvent lorsqu'il s'agit de l'étude des champignons, le modèle ayant bénéficié des études QTLs les plus nombreuses et variées est *S. cerevisiae*. Ce modèle a été étudié pour des phénotypes ayant un intérêt technologique, comme la croissance, la production de diverses molécules (p.ex. éthanol, isobutanol, acides ou molécules volatiles), la thermorésistance, la résistance à l'acide acétique, la consommation et l'utilisation d'azote, ou encore l'interaction avec d'autres microorganismes dans la production de vin (Steinmetz *et al*., 2002 ; Hu *et al*., 2007 ; Swinnen *et al*., 2012a ; Swinnen *et al*., 2012b ; Yang *et al*., 2013 ; Wilkening *et al*., 2014 ; Peltier *et al*., 2018 ; Ho *et al*., 2021 ; Bartle *et al*., 2021). Chez *S. cerevisiae*, cette approche a été utilisée dans l'optique d'amélioration variétale avec la réalisation d'un programme de sélection assistée par marqueurs pour l'obtention de souches consommant efficacement l'acide malique, dans l'optique d'une utilisation pour la production de vin (Vion *et al*., 2021). Pour le moment, l'approche QTL a été très peu utilisée chez d'autres champignons domestiqués pour la production de produits fermentés. Il serait donc intéressant de l'utiliser sur d'autres modèles.

# C. Le cas *Penicillium roqueforti*

## *1.* Position taxonomique de l'espèce *P. roqueforti*

Les champignons du genre *Penicillium* sont majoritairement des champignons psychrotolérants que l'on peut retrouver là où la matière organique est biodisponible. Le nom *Penicillium* (du latin *penicillius,* dérivé de *peniculus*) signifie « pinceau », le terme utilisé pour désigner la forme du conidiophore des champignons du genre *Penicillium*. Par ces conidiophores, les champignons du genre *Penicillium* produisent, le plus souvent en grand nombre, de petites conidies fortement hydrophobes, ce qui favorise leur dispersion aérienne. Comme la forme du conidiophore en pinceau est présente au-delà du genre des *Penicillium*, la forme anamorphe (forme de reproduction asexuée) de certaines espèces qui ne sont pas fortement apparentées est aussi appelée *Penicillium* (Samson *et al*., 2011). C'est le cas, par exemple, de *Talaromyces marneffei* (dont la forme anamorphe était appelée *Penicillium marneffei*), responsable de talaromycose encore parfois appelée pénicilliose, qui fait partie du clade *Talaromyces* (Houbraken *et al*., 2020 ; Cao *et al*., 2019 ; Zaongo *et al*., 2023). Aujourd'hui, le genre *Penicillium* forme un clade plus restreint dont la plupart des espèces sont soit des saprobiontes, soit des espèces phytopathogènes, le plus souvent contaminantes de fruits comme le sont par exemple *P. veridicatum*, *P. oxalicum* ou encore *P. digitatum* (Visagie *et al*., 2014). Quelques espèces sont aussi des pathogènes opportunistes humains comme *P. chrysogenum* (Avilés-Robles *et al.*, 2016). Leurs caractères de forte dispersion aérienne et de psychrotolérance ainsi que leurs modes de vie saprobiontes ou pathogènes de fruit font des champignons du genre *Penicillium* l'une des causes principales d'altération des denrées alimentaires. C'est le cas par exemple de *P. italicum* et *P. digitatum* pour les agrumes, *P. expansum* pour les pommes et poires, ou encore d'espèces de la série *Camemberti* autrefois regroupées sous le nom d'espèce *P. commune*, pour les produits laitiers ou la viande (Caccioni *et al*., 1998 ; Samson & Frisvad, 2004 ; Marcet-Houben *et al*. 2012 ; Ropars *et al*, 2020b). Au contraire, plusieurs espèces de *Penicillium* sont historiquement utilisées par l'être humain pour la production de produits fermentés (p.ex. *P. camemberti* pour les fromages, *P. nalgiovense* pour des produits de salaison) ou, plus récemment, la production de métabolites pour des applications diverses (p.ex. *P. rubens* pour la production de pénicilline (Leitão, 2009)).

Le genre *Penicillium* se divise en 2 sous-genres, *Aspergilloides* et *Penicillium,* qui se subdivisent en 19 et 13 sections respectivement (Figure 13). *Penicillium roqueforti* fait partie de la section *Roquefortorum* du sous genre *Penicillium* avec quatre autres espèces décrites : *P. paneum*, *P. carneum*, *P. psychrosexualis* et *P. mediterraneum* (Houbraken *et al*., 2020). Les deux espèces les plus souvent isolées, après *P. roqueforti*, sont *P. paneum* et *P. carneum* que l'on retrouve dans les sols et, principalement, en tant que contaminant de stockage de grain, notamment dans les ensilages, ou en

tant que contaminant alimentaire (fruits, produits laitiers, viandes…). Le nom d'espèce *P. roqueforti* a été utilisé pour la première fois pour désigner une souche type en 1906 par Charles Thom (Thom, 1906), puis par la suite des souches morphologiquement similaires. Les caractéristiques utilisées originellement pour identifier de nouveaux isolats comme faisant partie de l'espèce ont fait que le nom *P. roqueforti* désignait initialement un complexe d'espèces qui correspondait globalement à la section *Roquefortorum* actuelle (Frisvad & Samson, 2004 ; Samson *et al*., 2004 ; Houbraken *et al*., 2010 ; Houbraken *et al.*, 2016). En 1996, Boysen *et al.* ont séparé, sur la base de critères génétiques et métaboliques, les isolats de *P. roqueforti sensu lato* dans trois espèces, à savoir *P. roqueforti*, *P. carneum* et *P. paneum*. La section *Roquefortorum* a été étendue suite aux descriptions des espèces *P. psychrosexualis* (Houbraken *et al.,* 2010) et *P. mediterraneum* (Guevara-Suarez *et al.,* 2020).

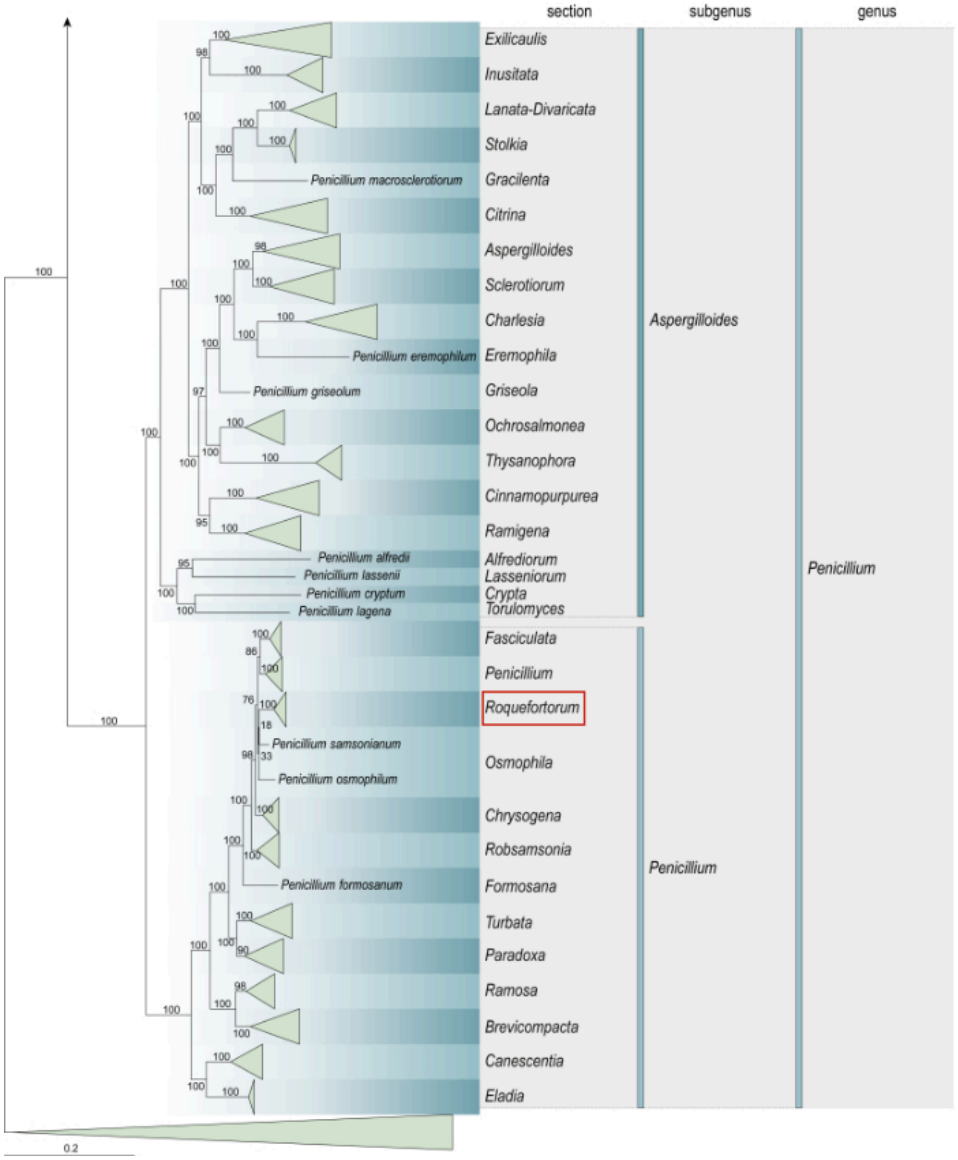



**Figure 13 : Phylogénie au sein du genre *Penicillium*. *Penicillium roqueforti* fait partie du sous-genre *Penicillium*, section *Roquefortorum* (en rouge). Tiré de Houbraken *et al*., 2020.**

## 2. Ecologie

*Penicillium roqueforti*, comme ses plus proches apparentés, est un champignon saprophyte pouvant être retrouvé dans les sols, le bois, la matière organique en décomposition ou encore en tant que contaminant alimentaire. Un point commun des environnements dans lesquels on retrouve *P. roqueforti* est leur richesse en matière organique. Sa tolérance au sels, aux acides organiques et à une faible activité de l'eau, ainsi que ses caractères micro-aérotolérant et psychrotolérant, permettent à *P. roqueforti* de contaminer une grande diversité de matrices alimentaires. Ainsi, il a pu être isolé de pains, de bières, de grains de riz, de maïs, de farines, d'olives, de pommes ou d'autres fruits ou encore de viandes (Pitt et Hocking, 1997). La tolérance aux acides organiques et à des milieux micro-aérobies est aussi un facteur favorisant sa capacité à contaminer les ensilages dans lesquels il peut poser problème du fait de la production de mycotoxines, et en particulier de la PR toxine (Auerbach *et al*., 1998 ; Mansfield *et al*., 2008 ; Alonso *et al*., 2013). En effet, l'ensilage est une méthode utilisée pour la conservation des fourrages qui fait intervenir une fermentation lactique anaérobie (Kung *et al.*, 2018). Pour ce faire, le fourrage (grains, herbe ou tubercules) est isolé de l'air extérieur dans un silo, en silo-fosse ou sous un film plastique. C'est dans ces conditions d'anaérobiose qu'a lieu la fermentation par des bactéries lactiques souvent ajoutées sous forme de ferments (Kung *et al.*, 2018). La contamination par *P. roqueforti* est particulièrement retrouvée dans des ensilages de grain de maïs et d'herbe (Alonso *et al*., 2013) quand les conditions d'anaérobiose ne sont pas complètes (p.ex. front d'attaque, poches d'air). Si *P. roqueforti* est un contaminant capable d'altérer de nombreuses matrices, il présente aussi un intérêt pour la production de produits fermentés. Dans ce contexte, cette moisissure est utilisée internationalement pour son rôle en production fromagère ; en effet, c'est la responsable des notes aromatiques et de la couleur des veines typiques des fromages dits « à pâte persillée », aussi appelés « bleus » (Cantor *et al*., 2004). Pour déterminer les phénotypes liés à une adaptation des populations domestiquées pour la production fromagère, il est donc important de comprendre les conditions environnementales de cet environnement. Ces conditions environnementales sont dynamiques et dépendent de la méthode de fabrication des fromages à pâte persillée.

Les fromages à pâte persillée sont des fromages à pâte molle. Comme tous les fromages, il y a, *a minima*, trois étapes de fabrication : le caillage, l'égouttage et l'affinage. Le caillage est une étape où se produit la coagulation du lait consécutive au clivage des protéines du lait (caséines), soit sous l'action des protéases (principalement la chymosine) présentes dans la présure, soit du fait de l'acidification du lait suite à la fermentation par des bactéries lactiques. Cette étape à généralement lieu avec des températures comprises entre 28 et 34°C (Cantor *et al*., 2004 ; Martin & Coton., 2017). Le gel obtenu par la coagulation des protéines et de la partie hydrophobe du lait, est appelé "caillé" (ou coagulum) et la partie liquide, contenant la fraction hydrophile du lait, le " petit lait" (ou lactosérum). Le caillé et le petit lait sont séparés lors de l'étape d'égouttage. Cette séparation est favorisée par une

découpe grossière du caillé et un brassage dans le cas de production de fromage à pâte persillée. Enfin, intervient la dernière étape, l'affinage, qui correspond à la période de maturation du fromage durant laquelle le fromage est entreposé en cave d'affinage ou en hâloir avec des températures basses entre 8°C et 15 °C (Cantor *et al*., 2004).

Pour la fabrication de fromages à pâte persillée, entre le moulage qui a lieu en fin d'égouttage et l'affinage, il y a une étape de salage parfois comprise dans la période d'affinage. Le salage se fait soit à sec en surface par saupoudrage (p.ex. pour le Roquefort), soit en masse dans le caillé (p.ex. pour la Fourme d'Ambert) soit par immersion dans une saumure saturée en sel (p.ex. pour le bleu de Bresse). La quantité en sel augmente donc dans les premiers jours d'affinage pour rapidement se stabiliser à une valeur entre 2 et 5% de sel dans la pâte (p.ex. 3% pour le Picon Bejes Tresviso, Tableau 1 ; Diezhandino *et al*., 2015). L'affinage dure de quelque semaines (p. ex. au minimum 5 à 6 semaines pour le bleu d'Auvergne ou le Gorgonzola) à quelques mois (au minimum 3 mois pour le Roquefort ou le Bleu des Causses). Classiquement, *P. roqueforti* est inoculé directement dans le lait ou le caillé avec d'autres ferments d'affinage. Cependant, certains fromages ont un persillage naturel, ce sont alors des souches de l'environnement de production qui vont coloniser le fromage. C'est le cas notamment des fromages sous l'appellation « Bleu de Termignon » en France ou du Castelmagno en Italie. Plusieurs étapes peuvent être différentes selon les appellations fromagères ; parmi celle-ci, on peut retrouver le choix du type de lait utilisé (lait de brebis, de vache ou de chèvre), le traitement du lait qui peut être cru ou pasteurisé, la manipulation du caillé, la méthode de salage qui peut être directement dans la masse ou en surface (durant quelques heures à plusieurs jours), un piquage ou non (favorisant l'installation de *P. roqueforti*) et enfin la durée d'affinage (Cantor *et al*., 2004).

Le microbiote présent dans les fromages évolue tout au long du processus de fabrication. Les microorganismes sont introduits dans cet écosystème directement par le lait, sous forme de ferments par la production, par le matériel utilisé, et via l'atmosphère des différents lieux de production. Parmi les ferments (ajoutés par le producteur), on utilise des ferments primaires (ou ferments lactiques), constitués principalement de bactéries lactiques des genres *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* ou *Lactiplantibacillus* (López-Díaz *et al.*, 2023). Les ferments primaires sont responsables de la conversion du lactose en acide lactique, ou lactate, lors des premiers jours de fabrication. On peut également employer des ferments secondaires (ou ferments d'affinage), parmi lesquels on retrouve de nombreux groupes microbiens en fonction du type de fromage produit. Pour les fromages bleus, *P. roqueforti* est le ferment secondaire incontournable. Son développement intervient principalement lors de l'affinage où il modifie la texture, l'aspect (veines) et les arômes du fromage (McSweeney & Fox, 2004). Dans le cadre de cette thèse, bien que les interactions microbiennes soient une composante majeure de l'évolution des microorganismes, nous nous sommes essentiellement intéressés à l'adaptation à des conditions physico-chimiques de l'environnement. La composition du microbiote

des fromages ne sera donc pas développée mais seulement son effet sur les caractéristiques physico-chimiques de la matrice.

Ainsi, pour la production de fromages bleus, *P. roqueforti* colonise secondairement le fromage lors de l'affinage. Cet affinage débute après la fermentation lactique par les ferments primaires. La quantité d'acide lactique est maximale en début d'affinage avec des concentrations proches de 50 $g.kg^{-1}$ de fromage en début d'affinage (Tableau 1). Ensuite, la concentration en lactate diminue principalement sous l'action de *P. roqueforti*, de levures (p.ex. *Kluyveromyces lactis*) et de bactéries du genre *Lactococcus* assurant la conversion du lactate en $CO_2$ (Belloch *et al.*, 2011 ; López-Díaz *et al.*, 2023). Le $CO_2$, également produit par fermentation hétérolactique, notamment par les *Leuconostoc,* forme des cavités dans le fromage (Pujato *et al.*, 2014 ; López-Díaz *et al.*, 2023). Les cavités formées permettent l'ouverture de la pâte ce qui, associé au piquage qui l'oxygène, favorise le développement secondaire de *P. roqueforti* et la formation des veines caractéristiques de ces produits. Le pH au sein des fromages évolue également durant l'affinage. Le principal acide organique présent dans les fromages à pâte persillée est l'acide lactique, mais d'autres acides faibles sont présents comme les acides acétique, citrique, butyrique et propionique (Bevilacqua & Califano, 1989 ; Izco *et al.*, 2002). On trouve également des acides aminés libérés par des protéases sécrétées et des acides gras libérés par des lipases (López-Díaz *et al.*, 2023). Le pH est au plus bas au début de l'affinage, durant lequel les quantités d'acide lactique sont maximales. Le pH remonte progressivement au cours de l'affinage pour atteindre des valeurs généralement entre 4.6 et 5.2, et jusqu'à 7 en fin d'affinage selon le fromage considéré (Cantor *et al*., 2004 ; López-Díaz *et al.*, 2023). Les lipides et protéines qui ont formé le caillé constituent l'essentiel du poids en masse sèche des fromages durant l'affinage. La dégradation des protéines et lipides au cours de l'affinage libère des acides aminés et des acides gras qui se retrouvent également en abondance dans les fromages (Izco *et al.*, 2002). Ainsi, l'affinage est une période durant laquelle l'environnement évolue. L'environnement d'affinage se caractérise comme étant un environnement pauvre en $O_2$ et riche en $CO_2$, riche en sel, en lipides, en protéines et en acide lactique et exposé à des températures basses. On note également l'existence de conditions environnementales variées au sein du fromage du fait, d'une part, de différents gradients de la surface vers le cœur du fromage et, d'autre part, de la présence de veines au sein de la masse. On observe ainsi de forts gradients de pH, de salinité, d'activité de l'eau ou de pression partielle en $O_2$ et $CO_2$ (Cantor *et al*., 2004). Le fromage n'est donc pas un environnement parfaitement homogène d'un point de vue des paramètres physico-chimiques.

**Table 1 : Evolution de la composition d'un fromage bleu de type Picon Bejes-Tresviso au cours de l'affinage. Tiré de Prieto *et al.*, 2000.**

| | Days of ripening | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 15 | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 |
| Total solids[b] | 55.2 ± 1.8a | 67.8 ± 1.4bc | 69.3 ± 1.0b | 65.4 ± 1.6c | 61.4 ± 0.6d | 59.9 ± 1.8d | 60.8 ± 2.3d |
| Protein[c] | 40.4 ± 1.5a | 38.3 ± 1.4ab | 37.2 ± 4.7ab | 37.8 ± 2.7ab | 38.0 ± 3.1ab | 35.7 ± 0.6b | 35.7 ± 2.3b |
| Fat[c] | 58.2 ± 2.4ab | 55.4 ± 2.0a | 56.1 ± 4.6a | 58.9 ± 5.0ab | 59.2 ± 5.4ab | 64.5 ± 2.1b | 63.4 ± 3.1b |
| Ash[c] | 3.3 ± 0.5a | 6.5 ± 0.2b | 4.9 ± 0.9b | 5.6 ± 0.5b | 5.1 ± 0.9b | 5.0 ± 1.7b | 6.0 ± 0.3b |
| NaCl[c] | 0.2 ± 0.1a | 3.3 ± 0.1b | 2.5 ± 0.3c | 2.8 ± 0.3bc | 2.8 ± 0.6bc | 2.7 ± 0.5bc | 3.2 ± 0.2b |
| Lactose[c] | 0.9 ± 0.2a | — | — | — | — | — | — |
| L-lactic acid[c] | 2.6 ± 0.3a | 0.8 ± 0.4b | 0.4 ± 0.2bc | 0.3 ± 0.2cd | 0.4 ± 0.2cd | 0.6 ± 0.3bd | 0.5 ± 0.1bd |
| D-lactic acid[c] | 0.06 ± 0.03a | 0.20 ± 0.03ab | 0.29 ± 0.14bc | 0.25 ± 0.16bc | 0.13 ± 0.05ac | 0.21 ± 0.02ac | 0.16 ± 0.08ac |

[a]Means within the same row not followed by the same letter differ significantly ($p < 0.05$).
[b]Expressed as g 100 $g^{-1}$ of cheese.
[c]Expressed as g 100 $g^{-1}$ of total solids.

## 3. Caractéristiques morphologiques et physiologiques

*Penicillium. roqueforti* est caractérisé par un mycélium blanc formant un thalle plat et par la formation de conidies bleues-vertes à grises dont la couleur et l'abondance peuvent différer selon le milieu croissance et le stade de développement du mycélium. Une forte variabilité de texture du mycélium, de forme de la marge des thalles, de taille du thalle et/ou de couleur peut être observée entre isolats (Gillot *et al.*, 2015 ; Figure 14). La texture va de duveteuse à fasciculée, la couleur va d'un bleu-vert gris plus ou moins profond à une couleur jaunâtre à brunâtre, la marge peut également changer en taille, régularité et texture en fonction des souches et des milieux considérés. En surface et au centre du thalle, la présence d'un exsudat jaunâtre à l'aspect cristallin est parfois observable. Ainsi, une grande diversité macromorphologique est observable au sein de l'espèce (Figure 14, Gillot *et al.*, 2015, Coton *et al.*, 2020).

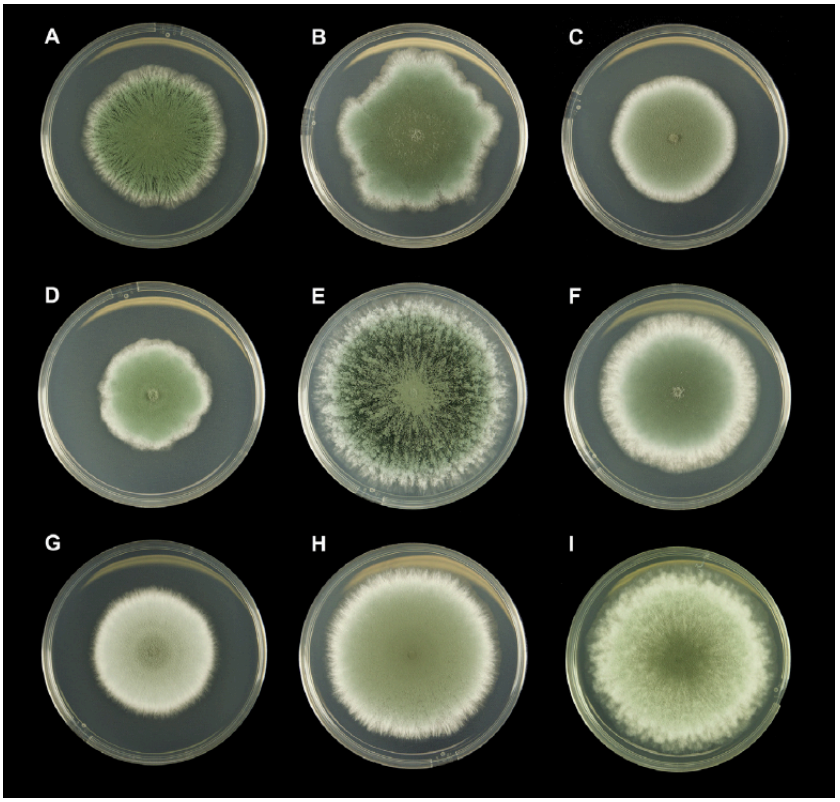



**Figure 14 : Exemple de la variabilité macromorphologique au sein de l'espèce *Penicillium roqueforti*. Les 9 souches ont été cultivées durant 7 jours à 25°C sur milieu "potatoe dextrose agar" (PDA). Tiré de de Coton *et al*., 2020.**

*Penicillium roqueforti* produit des conidiophores d'une taille comprise entre 100 et 200 µm de long en forme de grand pinceaux, à l'aspect rugueux, généralement terverticillés (Figure 15A). A l'extrémité terminale des pinceaux se trouvent des phialides cylindriques qui produisent les conidies (spores asexuées) sphériques d'un diamètre compris en 3 et 4.5 µm. Ce mode de reproduction asexuée est le plus fréquent, mais une reproduction sexuée a aussi été mise en évidence dans l'espèce. Les structures sexuées de *P. roqueforti* ont ainsi été décrites pour la première fois en 2014 dans des conditions particulières, à savoir après : 3 semaines de croissance à 25°C dans un milieu "avoine" contenant de la biotine (Ropars *et al*., 2012 ; Ropars *et al*., 2014). La reproduction sexuée se produit dans certaines conditions et lorsque les mycéliums de deux individus de types sexués différents (MAT-1-1 et MAT-1-2) se rencontrent ; il peut alors y avoir formation de l'ascogone, organe sexuel femelle, et des anthéridies qui vont transférer leur noyau dans le gamète femelle lors de la fécondation. Le dicaryon (cellule contenant les deux noyaux parentaux) développe des hyphes ascogènes (hyphe dicaryotique) formant les asques au sein desquels se produit la caryogamie (Kendrick, 2017). La caryogamie correspond à la fusion des deux noyaux parentaux d'une cellule dicaryotique formant le zygote qui suite à la méiose produit les ascospores. Autour de l'ascogone et des hyphes dicaryotiques, le mycélium se densifie et forme progressivement l'ascocarpe la structure de support des structures

sexuées (Kendrick, 2017). L'ascocarpe chez *P. roqueforti* se nomme cléistothèce (Figure 15B). C'est une structure sphérique sans ouverture, pouvant contenir plusieurs asques qui, à maturité, contiennent 8 ascospores (Ropars *et al*, 2014 ; Figure 15). Les ascospores sont libérés lors de la rupture du cléistothèce. La découverte de conditions favorables à la reproduction sexuée chez *P. roqueforti* a ouvert la porte à la génération d'individus avec de nouveaux génotypes, et donc phénotypes, qui pourrait permettre de diversifier les souches utilisées actuellement pour la production fromagère, et dont on sait que la diversité est considérablement réduite (Ropars *et al*., 2017 ; Dumas *et al*,. 2020).

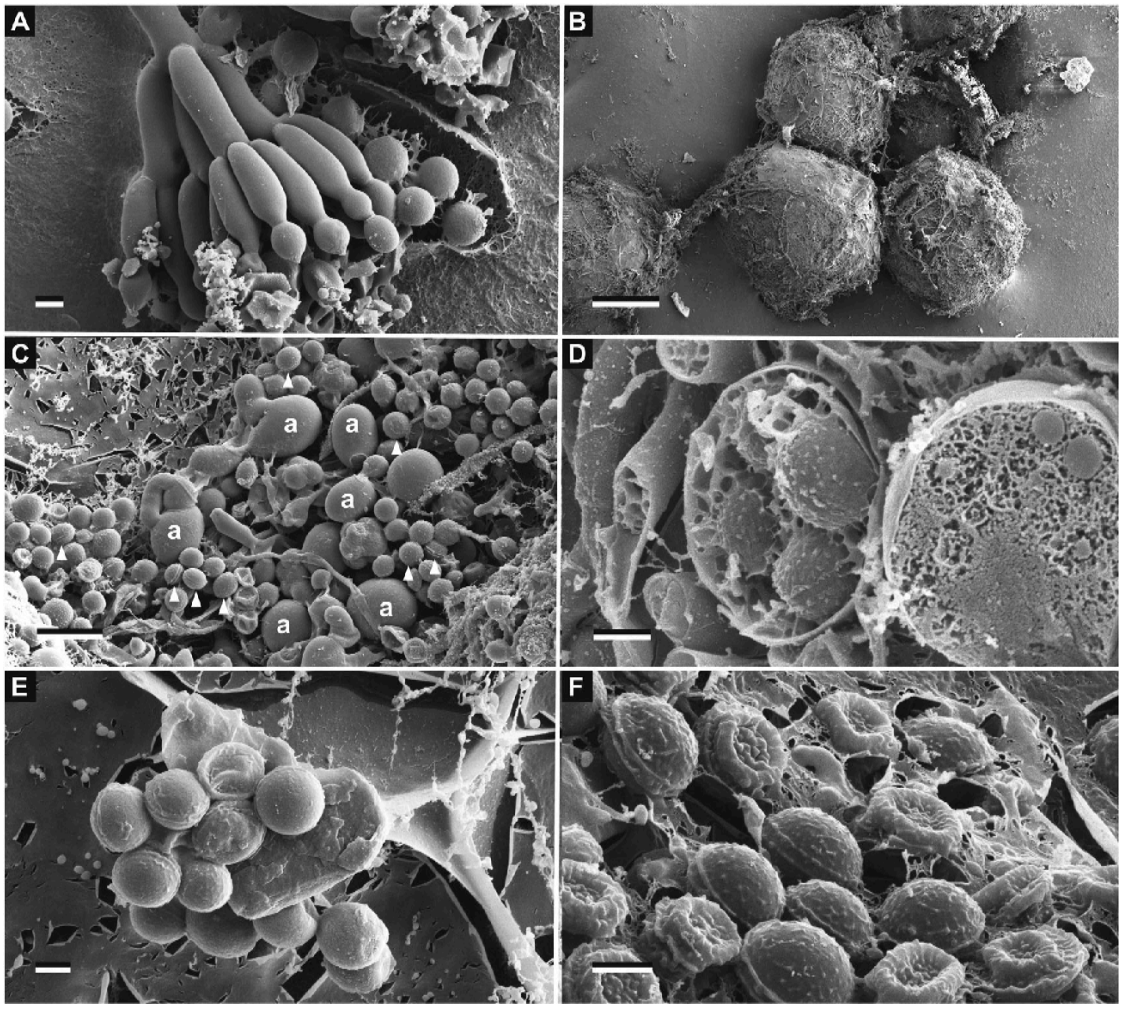



**Figure 15 : Images obtenues par microscopie électronique à balayage des structures asexuées et sexuées de *Penicillium roqueforti*. A. Conidiophore portant des conidies (la barre blanche représente 2 µm). B. Cléistothèces (la barre blanche représente 200 µm). C. Asques (indiqué par un a) et ascospores (la barre blanche représente 10 µm). D. Asques tranchées contenant des ascospores (la barre blanche représente 2 µm). Tiré de Ropars *et al*., 2016.**

L'espèce *Penicillium roqueforti* présente des caractéristiques physiologiques en cohérence avec ce que l'on connaît de son écologie, à savoir, les conditions présentes dans les fromages, les ensilages ou les aliments que *P. roqueforti* contamine. Un de ces phénotypes est son caractère micro aérotolérant. C'est une espèce dont la croissance est possible en conditions de fortes pressions partielles en $CO_2$ et de faible pressions partielles en $O_2$, avec une croissance observée pour des pressions partielles jusqu'à 0.3 % en $O_2$ ou 70 % en $CO_2$ (Taniwaki *et al*., 2001 ; Nguyen Van Long & Dantigny 2016 ; Nguyen Van Long *et al*, 2017). Cette aptitude semble partagée chez les *Penicillium* puisque les deux autres espèces de *Penicillium* testées par Nguyen van Long *et al.* (2017), *P. expansum*

et *P. brevicompactum,* sont capables de croître dans les mêmes conditions. Une pression partielle en $CO_2$ comprise entre 1% et 30% semble avoir un effet stimulant sur la croissance de *P. roqueforti* (Nguyen Van Long & Dantigny, 2016). Ces conditions sont compatibles avec des conditions présentes dans les cavités des fromages à pâte persillée mais aussi avec certaines conditions de stockage comme celles des plantes ensilées ou celles de stockage réfrigéré en atmosphère contrôlée de certaines denrées alimentaires. Une autre caractéristique de l'espèce *P. roqueforti* est sa tolérance aux acides organiques. En effet, il est capable de croître à des concentrations allant jusqu'à 4% en acide lactique, 0.5 % en acide acétique, 0.2 % d'acide propionique et 0.2 % en acide sorbique (Engel & Teuber, 1978 ; Coton *et al*., 2020). Une forte abondance et diversité d'acides organiques est une caractéristique commune aux fromages et aux ensilages dans lesquels on retrouve *P. roqueforti*. Les acides organiques peuvent également être utilisés comme conservateurs dans l'industrie agroalimentaire (p.ex. sorbate, citrate…). La croissance de *P. roqueforti* est maximale pour des teneurs en NaCl proche de 1% en milieu solide (à 0% en milieu liquide), avec une croissance possible de 2°C à 35°C, de 0 à 17.5 % en NaCl (en milieu solide) et pour un pH compris en 3 et 10.5 (Moreau, 1980 ; Cerning *et al*., 1987 ; Gock *et al*., 2003 ; Cantor *et al*., 2004 ; Nguyen Van Long *et al*., 2021). Ainsi *P. roqueforti* est un organisme microaérotolérant, psychrotolerant, halotolérant et tolérant aux acides faibles, ce qui en fait un organisme capable de croître dans les conditions d'affinage des fromages à pâtes persillées mais aussi dans les ensilages, et un contaminant alimentaire important.

## 4. Métabolisme de *P. roqueforti*

Dans les fromages, *P. roqueforti* est important pour son apport organoleptique (texture, arômes, couleur…) lors de la maturation des fromages à pâte persillée (Cantor *et al*., 2004). Cet apport est notamment dû à ses activités enzymatiques, particulièrement ses activités lipolytique et protéolytique. Deux lipases extracellulaires ont principalement été étudiées chez *P. roqueforti*, une ayant une activité maximale, pour l'une à pH légèrement acide (compris entre 5,5 et 7) et pour l'autre à pH alcalin (pH compris entre 7,5 et 9,5) (Menassa & Lambert, 1982 ; Lamberet & Menassa, 1983 ; Mase *et al.*, 1995). Aux valeurs de pH existant dans les fromages, c'est principalement la lipase acide qui peut être active. *Penicillium roqueforti* produit également des protéases extracellulaires, notamment des exopeptidases et endopeptidases (Cerning *et al*., 1987). L'influence de la présence de *P. roqueforti* sur l'activité protéolytique au sein des fromages a été démontrée notamment par une dégradation des caséines du fromage à 18% en absence de la moisissure contre 50% lorsqu'elle est inoculée (Cerning *et al*., 1987). Ces activités jouent un rôle essentiel en production fromagère notamment pour la texture et pour la production de composés volatils qui font la typicité des fromages (Cantor *et al*., 2004 ; Coton *et al*., 2020). En effet, la protéolyse induit la production de composés ammoniacaux et les acides gras libérés par la lipolyse sont des précurseurs d'aldéhyde, d'alcools secondaires, d'esters, de lactone et de méthylcétones qui contribuent au bouquet aromatique des

fromages (Cerning *et al*., 1987 ; Collins *et al*., 2003 ; Collins *et al*., 2004 ; Gillot *et al*., 2017a ; Caron *et al*., 2020). Une autre caractéristique importante des fromages à pâte persillée est la couleur bleutée des veines de ces fromages. Cette couleur est due à la pigmentation des conidies de *P. roqueforti,* principalement liée à la production de mélanine. La production de mélanine est liée à la présence d'un cluster de biosynthèse similaire à celui de la dihydroxynaphtalène mélanine (DHN-mélanine) décrit chez *A. fumigatus* (Bayry *et al.*, 2014 ; Cleere, 2017 ; Metin, 2023). Des souches *P. roqueforti* produisant des conidies dépigmentées ont été obtenues en ciblant la polycétide synthase (*alb1*) de la voie par une approche CRISPR/Cas9 montrant que la couleur des conidies est essentiellement due à la présence de mélanine (Seekles *et al.*, 2021 ; Cleere *et al*., 2024).

En plus des pigments et molécules volatiles, *P. roqueforti* est connu pour sa production d'une large diversité de métabolites secondaires, également appelés métabolites spécialisés, dont certains sont sécrétés (extrolites) et, parmi lesquels se trouvent des mycotoxines. Ces composés ont probablement pour rôle d'apporter, notamment, un avantage compétitif dans la niche écologique et/ou un rôle dans la communication microbienne (Hautbergue *et al.*, 2018). En outre, ces molécules peuvent également présenter un intérêt biotechnologique du fait de leurs activités biologiques notamment en pharmacologie (Nielsen *et al*., 2017 ; Keller., 2019 ; Stroe *et al*., 2023). Chez *P. roqueforti,* de nombreux métabolites secondaires ont été étudiés, aussi bien de mycotoxines que de molécules ayant des applications médicales. Les molécules les plus étudiées dont les clusters de gènes de biosynthèse sont connus et les voies de biosynthèse au moins partiellement élucidées sont la PR toxine, la roquefortine C, l'acide mycophénolique, l'andrastine A et l'isofumigaclavine A (Figure 16, Chavez *et al*. 2023). Le cluster de gènes de biosynthèse des annulatines est présent chez *P. roqueforti* et fonctionnel comme l'a montré son expression hétérologue chez *Aspergillus nidulans* (Xiang *et al.*, 2022). Cependant, la production des annulatines n'a, jusqu'à présent, pas été détectée chez *P. roqueforti,* suggérant que leur biosynthèse n'est pas effective dans les conditions étudiées mais il n'y a pas eu d'études larges (p. ex. approche OSMAC- one strain many compounds-) permettant de déterminer des conditions dans lesquelles le cluster de gènes s'exprime.

Les métabolites secondaires décrits chez *P. roqueforti* font principalement partie de cinq classes : les terpènes, les polycétides, les alcaloïdes, les peptides et les lactones. Parmi les terpènes, caractérisés par la présence d'unité isoprène, on retrouve la PR toxine et ses intermédiaires ou dérivés de la famille des érémophilanes (érémofortines, PR-imine, PR-amide ou PR-acide). Plus récemment des sesquiterpènes et sesterterpènes ont été décrits comme étant produits par *P. roqueforti* comme les peniroquesines A-C et la roquefornine A (Wang *et al*., 2018 ; Wang *et al*., 2020 ; Mo *et al*., 2023). Cependant les souches sur lesquelles se base la mise en évidence de ces terpènes n'ont été identifiées que sur des bases morphologiques et sur la base de la séquence ITS ce qui ne permet pas de savoir avec certitude si ce sont bien des souches de *P. roquefort*i ou des souches d'autres espèces de la section *Roquefortorum*. Par le passé des métabolites comme la patuline ou la marcfortine A ont ainsi pu être à

tort attribués à *P. roqueforti* alors qu'ils ne semblent être produits que par d'autres espèces de la section *Roquefortorum* (Nielsen *et al*., 2006). Parmi les polycétides qui se caractérisent par la condensation d'unité malonyl ou/et acétyl, on retrouve l'acide mycophénolique et l'andrastine A, mais aussi acide orsellinique ou le scytalone qui est un intermédiaire de la production de DHN mélanine (Omura *et al*., 1996 ; Nielsen *et al*., 2005 ; Metin 2023). Les alcaloïdes sont des molécules contenant de l'azote et pouvant être dérivés d'acides aminés ou de petits peptides, c'est le cas des roquefortines C et D, mais aussi des clavines comme l'isofumigaclavine A et B, la festuclavine ou l'agroclavine toutes isolées à partir de cultures de *P. roqueforti* (Ohmomo et al., 1975 ; Frisvad *et al*., 2004 ; Nielsen *et al*., 2006 ; Coton *et al*., 2020 ; Table 2).

**Table 2 : Classe des principaux métabolites secondaires retrouvés dans les cultures de *Penicillium roqueforti* et/ou dont le cluster de production est connu.**

| Nom | Classe | Cluster de biosynthèse |
|---|---|---|
| PR toxine | terpène | connu |
| Eremofortines A-E | terpène | connu (commun PR toxine) |
| Andrastine A-F | polycétide/terpène | connu |
| Acide mycophénolique | polycétide/terpène | connu |
| Acide orsellinique | polycétide | à déterminer |
| Scytalone | polycétide | connu (commun DHN mélanine) |
| annulatines D et F | polycétide/flavonoïdes | connu (expression hétérologue) |
| Cis-bis(methylthio)silvatine | peptide | à déterminer |
| D-Phe-L-Val-D-Val-L-Tyr | peptide | à déterminer |
| D-Phe-L-Val-D-Val-L-Phe | peptide | à déterminer |
| Roquefortines C-D | Alcaloïdes/indole | connu |
| Isofumigaclavine A-B | Alcaloïdes/clavine | connu |
| Festuclavine | Alcaloïdes/clavine | connu (intermédiaire de l'isofumigaclavine A) |
| Agroclavine | Alcaloïdes/clavine | à déterminer |
| Citreoisocoumarine | lactone | à déterminer |

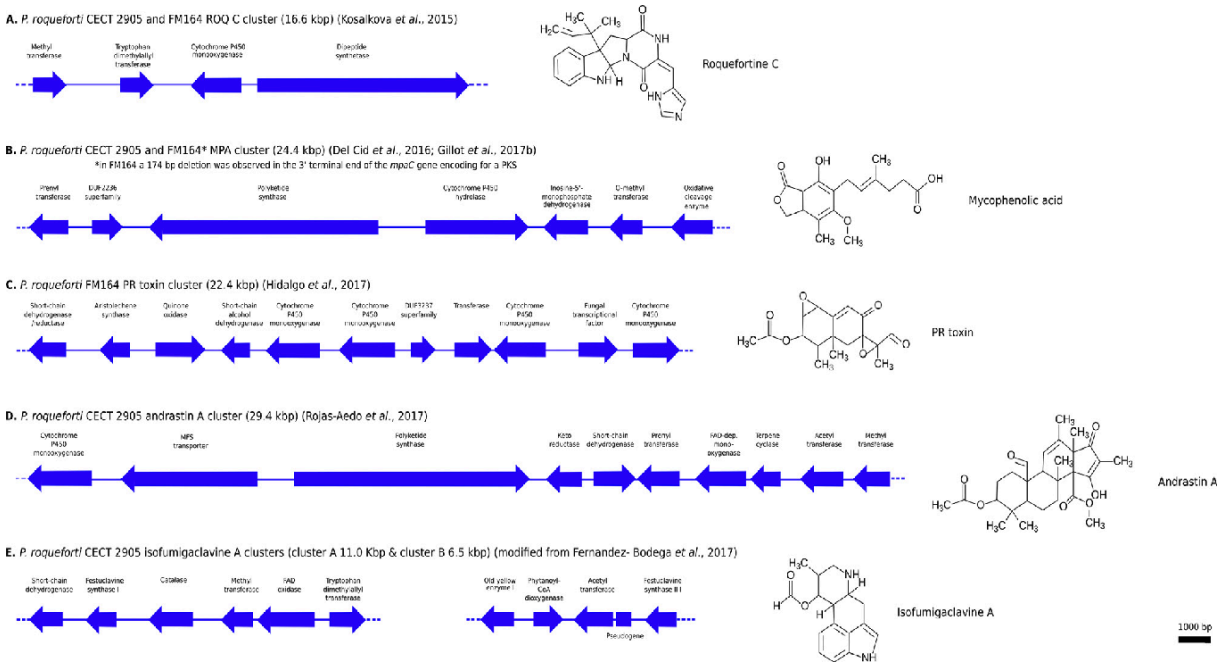



**Figure 16 : Clusters de biosynthèse identifiés des principaux métabolites secondaires excrétés étudiés chez *Penicillium roqueforti*. Tiré de Coton *et al*., 2020.**

Parmi ces métabolites secondaires, seuls la PR toxine, la roquefortine C et l'acide mycophénolique sont considérés comme des mycotoxines (Frisvad *et al*., 2004). Du fait de la moindre toxicité de l'acide mycophénolique et de son faible niveau de production, ce sont principalement la PR toxine et la roquefortine C qui font l'objet de préoccupations lorsque *P. roqueforti* est retrouvé en tant que contaminant (p.ex. dans les plantes ensilées) (Chavez *et al*., 2023). Plusieurs études ont montré que la production de métabolites secondaires dépendait de la souche étudiée. Ces différences de production pourraient potentiellement être dues à une adaptation locale en lien avec une structuration en populations, c'est l'un des questionnements scientifiques de cette thèse.

La PR toxine est l'extrolite le plus toxique produite par *P. roqueforti* avec, notamment, un effet inhibiteur de la respiration mitochondriale et un effet carcinogène (Hymery *et al*., 2014). En production fromagère, la PR toxine est instable, notamment du fait de la forte abondance en acides aminés et en ammoniac qui favorise sa transformation en PR-amide et en PR-imine (Wei *et al*., 1973 ; Chang *et al*., 1993 ; Chang *et al*., 2004a ; Chang *et al*., 2004b ; Fontaine *et al*., 2015). Le cluster de production de la PR toxine a été identifié et la voie de synthèse partiellement élucidée par des approches de "silencing" de gènes (Hidalgo *et al*., 2014 ; Hidalgo *et al*., 2017). Le cluster de gènes s'étend sur une région de 22.4 kb (Figure 16.C) et contient 11 gènes, dont les rôles ne sont pas encore complètement élucidés. Parmi ces 11 gènes, un est un régulateur de transcription (ORF 10), les 10 autres sont suspectés d'intervenir dans des étapes de la voie de biosynthèse. Le précurseur de la voie

de production est le farnesyl pyrophosphate qui, sous l'action de l'aristolochène synthase (ORF2), est cyclisé en aristolochène, considéré comme le précurseur principal des érémophilanes dont la PR toxine est un représentant (Chavez *et al*., 2022). La voie de biosynthèse fait ensuite intervenir divers intermédiaires parmi lesquels on retrouve les érémofortines A, B et C, qui sont des érémophilanes également régulièrement retrouvées dans les cultures de *P. roqueforti* (Figure 17). Le "silencing" de gènes de la voie de biosynthèse a conduit, en plus de la chute de production en PR toxine, à une augmentation significative de la production en acide mycophénolique, suggérant une forme de communication entre les deux voies de biosynthèse (Hidalgo *et al*, 2014). Les expériences de "silencing" de gènes ont ciblé 7 des 10 gènes de la voie de biosynthèse, ce qui en fait une voie de biosynthèse particulièrement bien étudiée (Hidalgo *et al.*, 2014 ; Hidalgo *et al*., 2017 ; Figure 17). Cependant, des questions restent encore en suspens ; il existe notamment deux hypothèses quant au niveau d'intervention de l'érémofortine A dans la voie de biosynthèse. En effet, l'érémofortine A est considérée soit comme un intermédiaire de la voie soit comme un coproduit résultant d'une déviation dans la voie de biosynthèse après production d'érémofortine B, aboutissant, d'une part, à la production de PR toxine et, d'autre part, à la production d'érémofortine A (Figure 17 ; Riclea et Dickschat, 2015 ; Hidalgo *et al*, 2017).

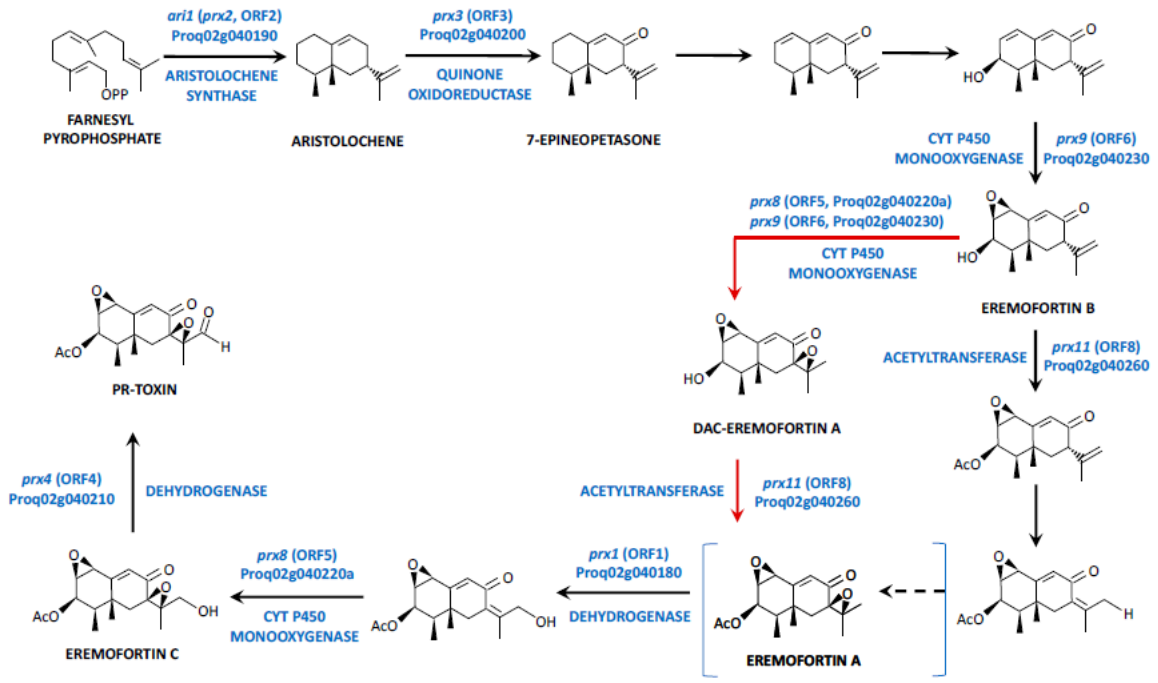



**Figure 17 : Voie de biosynthèse de la PR toxine. Tiré de Chavez *et al*., 2023.**

L'acide mycophénolique est un autre métabolite secondaire bien connu chez *P. roqueforti*, composé d'un noyau phtalide et d'une chaîne latérale terpénique (Hymery *et al*., 2014). Ce métabolite est particulièrement connu pour son utilisation en tant qu'immunosuppresseur pour éviter les rejets

d'organes chez les patients ayant subi une greffe de foie, de rein ou de cœur. Son cluster de gènes de biosynthèse a pour la première fois été déterminé chez *P. brevicompactum* (Reguira *et al*., 2011), qui est aujourd'hui l'espèce utilisée pour sa production industrielle. Depuis, son cluster de production a également été identifié chez *P. roqueforti,* où il fait intervenir 7 gènes : *mpaA*, *mpaB*, *mpaC*, *mpaDE*, *mpaF*, *mpaG* et *mpaH*. Comme pour la PR toxine, la voie de biosynthèse du MPA a largement été élucidée et le niveau d'intervention de chacun de ces gènes a été mis en évidence essentiellement chez *P. brevicompactum* puis confirmé par des expériences de "silencing" de gènes chez *P. roqueforti* (Figure 18 ; Del-Cid *et al*., 2016). Le séquençage du cluster de gènes chez trois souches de *P. roqueforti* a mis en évidence des variations dans leurs séquences, dont une délétion de 174 pb dans le gène *mpaC* (Gillot *et al*., 2017b). Une étude sur 55 souches a permis d'identifier la présence de cette délétion par amplification ciblée de la région, et mis en évidence une corrélation entre la présence de cette délétion, une absence de production d'acide mycophénolique et la présence de deux régions issues de transferts horizontaux (nommément *CheesyTer* et *Wallaby*)(Gillot *et al*, 2017a). Plus récemment, la présence de ces deux régions transférées horizontalement a été liée aux structures de population au sein de l'espèce (Dumas *et al*., 2020).

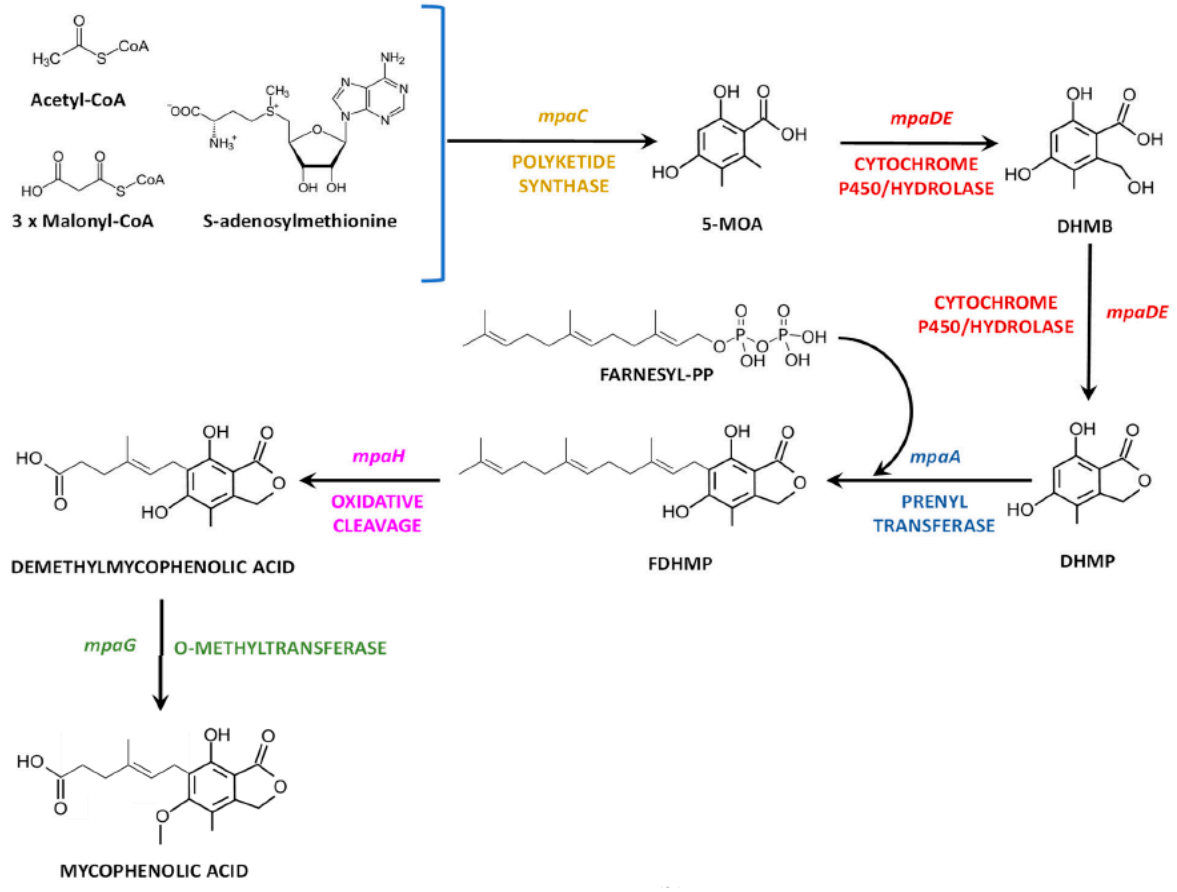



**Figure 18 : Voie de biosynthèse de l'acide mycophénolique. Tiré de Chavez et al., 2023.**

Parmi les voies de biosynthèse récemment décrites de métabolites couramment retrouvés dans les cultures de *P. roqueforti*, on retrouve également les clusters de production de l'andrastine A, la roquefortine C et de l'isofumigaclavine A. La production de l'andrastine A fait intervenir un cluster contenant dix gènes mis en évidence par homologie avec le cluster auparavant décrit chez *P. chrysogenum* (Matsuda *et al*., 2013 ; Rojas-Aedo et al., 2017). L'extinction de ces dix gènes chez *P. roqueforti* par ARN interférant a montré leurs implications dans la production d'andrastine A et aboutit à une proposition de voie de biosynthèse (Rojas-Aedo et al., 2017). La voie de biosynthèse de la Roquefortine C, un alcaloïde connu pour ses propriétés neurotoxiques et ses propriétés antimicrobiennes, a d'abord été décrite chez *P. chrysogenum*. Chez *P. roqueforti* la voie de biosynthèse est tronquée et fait intervenir trois enzymes (Kosalkova *et al*., 2015). En effet, le cluster de biosynthèse contient trois gènes de moins que chez *P. chrysogenum* chez qui la voie de biosynthèse aboutit à la formation de méléagrine, les roquefortines C et D en étant des intermédiaires de production (Garcia-Estrada *et al*., 2011 ; Ali *et al*., 2013). Le cluster de biosynthèse de l'isofumigaclavine A a quant à lui été déterminé par homologie avec le cluster mis en évidence chez *Aspergillus fumigatus* chez qui le cluster de production contient 11 gènes et aboutit à la formation de fumigaclavine C. Chez *P. roqueforti* le cluster est scindé sur deux *loci* distincts, clusters A et B. Ensemble les deux clusters contiennent dix gènes, avec deux gènes absents et un gène présent au deux *loci* (Fernandez-Bodega *et al*., 2017).

## 5. Structuration en populations

Peu avant le début de cette thèse, sur la base de la comparaison des séquences de génomes entiers, une structuration en quatre populations génétiquement et phénotypiquement différenciées a été identifiée (Dumas *et al*., 2020). Deux populations ont été domestiquées pour la production fromagère et les deux autres populations non-domestiquées sont retrouvées en dehors de l'environnement fromager mais dans des milieux anthropisés (Dumas et al., 2020). Les deux populations non-domestiquées et leurs représentants peuvent être retrouvés en tant que contaminants sur divers types de matrices alimentaires. L'une des deux populations est fortement associée à la contamination d'ensilage, alors que la deuxième est plus fortement associée à la contamination alimentaire et de bois d'ouvrage ou bois de coupe (Dumas et al, 2020 ; Figure 19). Ainsi, les milieux d'isolement des souches de chacune de ces populations sont fortement associés à des milieux anthropisés, ce qui soulève la question de l'existence d'un réservoir naturel distinct des activités humaines.

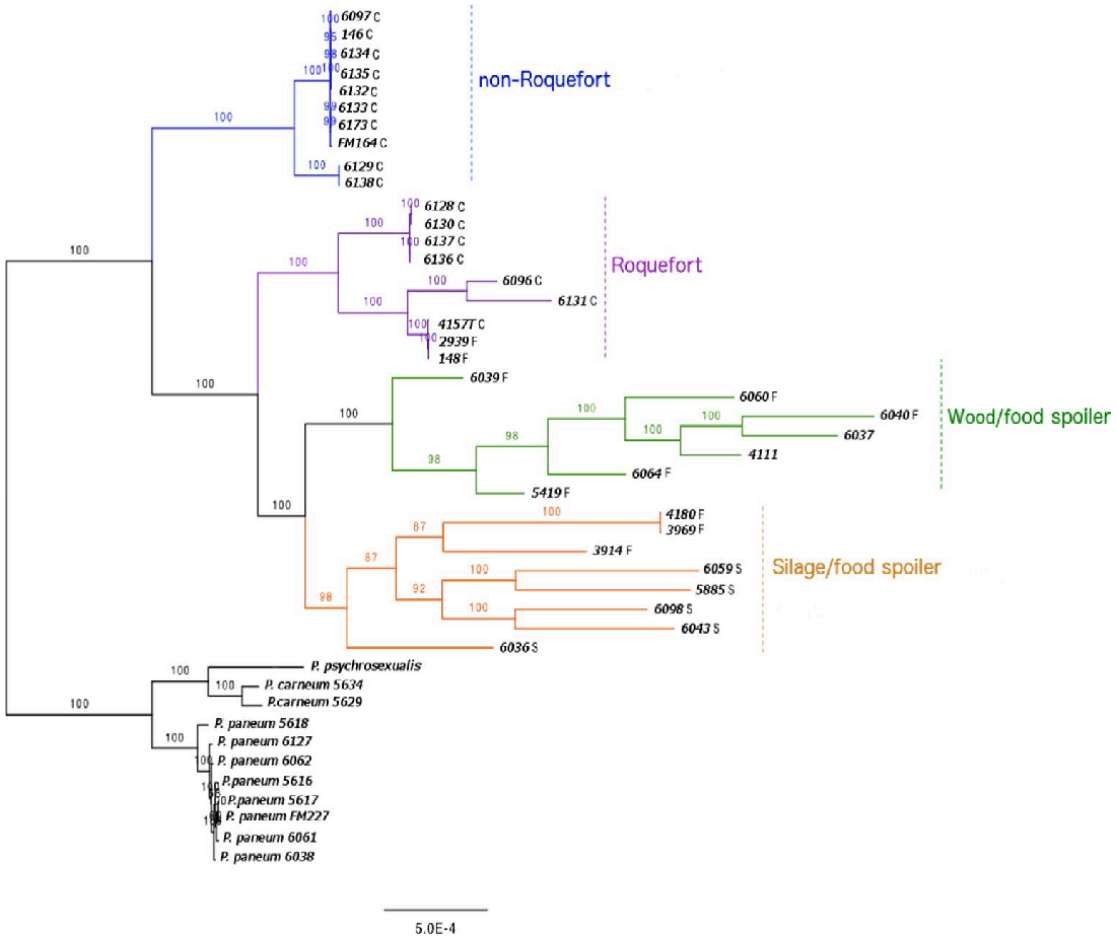



**Figure 19 : Arbre généalogique de souches obtenu par maximum de vraisemblance à partir de la séquence de 6 905 gènes présents en simple copie, au sein de l'espèce *Penicillium roqueforti* ; population associée aux fromages bleus non-Roquefort en bleu, population associée au Roquefort en violet, population associée au bois et à la contamination alimentaire en vert et population associée aux ensilages et à la contamination alimentaire en jaune. Les valeurs de support des nœuds sont obtenues par 1000 réplications. Tiré de Dumas *et al*., 2020.**

Une comparaison des scénarios évolutifs possibles à partir de modèles démographiques a révélé que les populations ensilage/contamination et bois/contamination ont divergé le plus récemment (Dumas *et al*, 2020). Les deux populations non-domestiquées présentent une diversité génétique plus importante que les populations fromagères qui ont subi de forts goulets d'étranglements au cours de leurs histoires démographiques respectives (Dumas *et al*., 2020). La même étude a montré que les deux populations fromagères sont issues de deux événements de domestication distincts. La population non-Roquefort est la population ayant divergé le plus anciennement des autres populations et la population avec la plus faible diversité génétique. Cette perte drastique de la diversité génétique dans la population non-Roquefort est liée à un fort goulet d'étranglement récent probablement dû à la sélection d'une seule lignée clonale aujourd'hui utilisée pour la production internationale de fromages

bleus à l'échelle industrielle (Dumas *et al*., 2020). En revanche, la population Roquefort a conservé un peu plus de diversité génétique, probablement du fait de l'obligation d'utilisation de souches locales dans le cadre du cahier des charges de l'AOP Roquefort. Cette obligation a pu limiter le risque de conservation d'un seul clone pour l'ensemble de la production, contrairement à la population non-Roquefort (Dumas *et al*., 2020).

Dans la même étude, Dumas *et al* (2020) ont détecté la présence de flux de gènes (migration) entre les deux populations non-fromagères, et une absence de flux avec les deux populations domestiquées. L'étude met également en évidence, la présence de transfert horizontaux menant à l'acquisition de douze d'îlots génomiques chez certaines souches de *P. roqueforti* (Figure 20). Six de ces îlots génétiques sont propres à la population non-Roquefort quant cinq d'entre eux en sont absents (Figure 20). La présence de ces régions probablement issues de transfert horizontaux indique la présence de larges éléments mobiles dans les génomes de *P. roqueforti*. Parmi les îlots propres à la population non-Roquefort, on retrouve les régions *CheesyTer* et *Wallaby*. La région *Wallaby* a été récemment décrite comme étant un *Starship*, un type d'éléments transposable récemment découvert chez les champignons (Gluck-Thaler *et al.*, 2022). La présence de *CheesyTer* et *Wallaby* chez *P. roqueforti*, régions associées à la population non-Roquefort, a été corrélée avec une meilleure exclusion des compétiteurs fongiques, une plus forte croissance sur milieu fromage, une plus faible croissance sur milieu minimum, une diminution de la fertilité et une absence de production d'acide mycophénolique (Ropars *et al*., 2015 ; Ropars *et al*., 2016, Gillot *et al*., 2017a, Figure 21). Il est à noter que ces régions ont été détectées chez d'autres espèces de *Penicillium* domestiquées (Cheeseman *et al*., 2014 ; Ropars *et al*., 2015, Figure 20). La diminution de la fertilité chez les souches fromagères peut être mise en lien avec un maintien clonal des souches domestiquées qui a pu permettre la dégénérescence de ces fonctions qui ne sont alors plus utilisées.

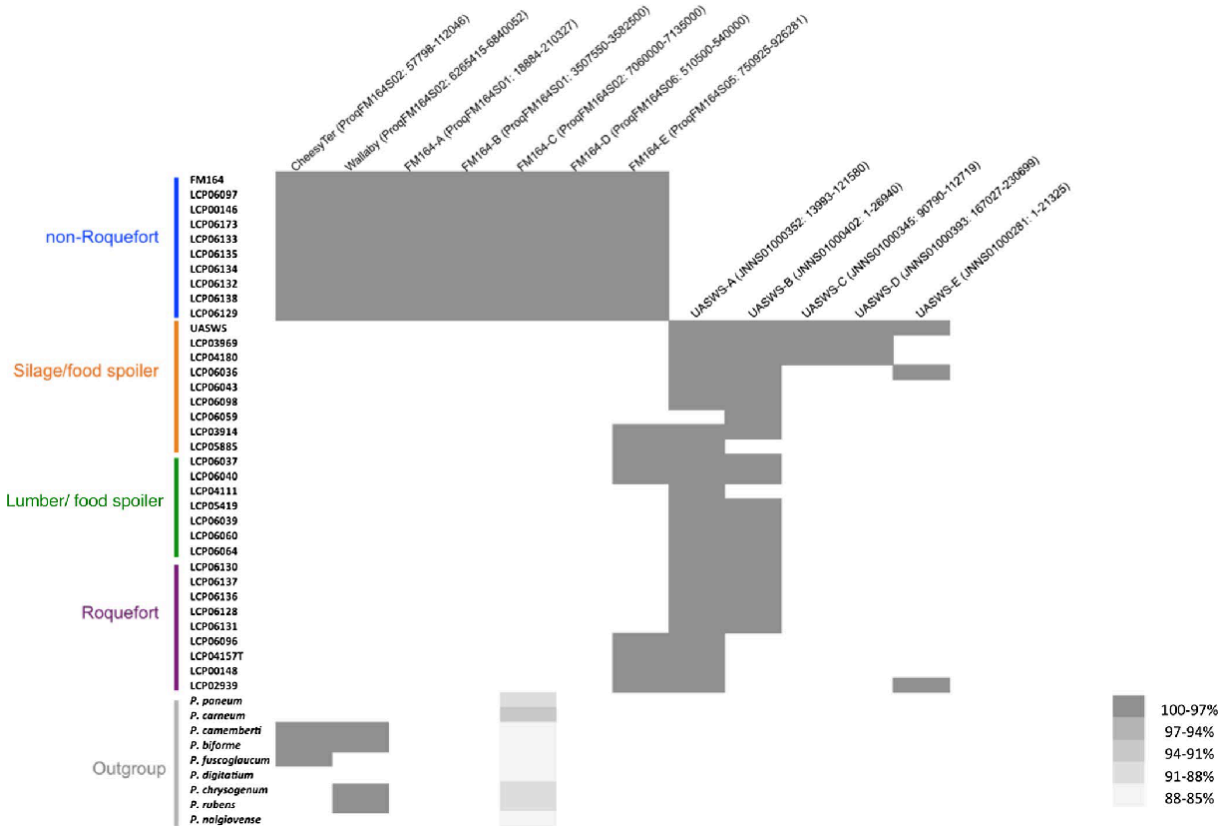



**Figure 20 : Présence ou absence de 11 îlots génomiques dans le génome des 35 souches de *Penicillium roqueforti* étudiées. Le groupe externe est constitué de génome de souche de 9 autres espèces de *Penicillium*. L'intensité du gris indique le pourcentage d'identité des îlots génomiques. Tiré de Dumas *et al*., 2020.**

En plus de la comparaison génomique des populations de *P. roqueforti*, Dumas *et al*. (2020) ont révélé plusieurs différences phénotypiques entre ces populations. Les résultats principaux étaient les suivants; i) pour la population Roquefort, une sporulation sur milieu pain qui peut être mise en lien avec le mode traditionnel de production des spores, destinées à l'inoculation des caillés de bleus, sur pain seigle ; ii) pour la population non-Roquefort, une plus grande activité lipolytique, une plus forte résistance au sel ainsi qu'une meilleure colonisation de fromages expérimentaux, qui sont tous des caractères pouvant être avantageux pour la production fromagère, en particulier en contexte industriel (Dumas et al., 2020 ; Figure 20). L'analyse de 52 composés aromatiques (Gillot et al, 2017b) produits par des souches des deux populations domestiquées sur des modèles de fromages simplifiés a montré des profils aromatiques significativement différents pour les deux populations (Dumas et al., 2020). Notamment, la population Roquefort se distingue par une production d'une plus grande diversité de composés volatils.

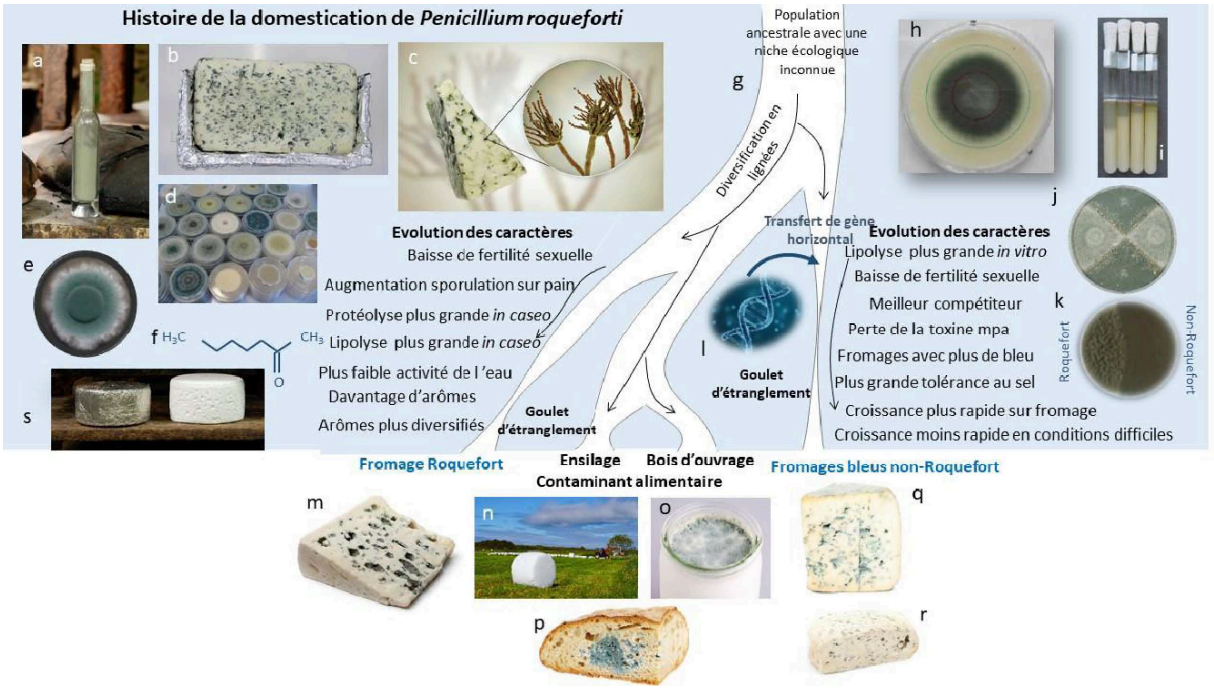



**Figure 21 : Histoire de la domestication de *Penicillium roqueforti* depuis une population ancestrale dont la niche écologique n'est pas connue et caractéristiques phénotypiques des populations domestiquées, fromage Roquefort et fromages bleus non-Roquefort. Tiré de Ropars et al., 2020.**

Sur la base de ces quatre populations, Caron *et al*. (2021) se sont intéressés à examiner les différences induites par l'utilisation de souches de *P. roqueforti* des dites populations sur le microbiote et les caractéristiques organoleptiques de fromages expérimentaux de type Roquefort (Figure 21). Cette étude a mis en évidence un très faible impact de la population de *P. roqueforti* sur l'abondance relative des principaux micro-organismes présents dans les fromages (Caron *et al*., 2021). En revanche, la population d'origine des souches utilisées présentait un impact significatif sur l'activité de l'eau, la surface de bleu dans les tranches de fromage, la lipolyse, la protéolyse et la production de composés aromatiques dans les fromages produits (Caron *et al*., 2021). Ainsi, les fromages produits avec une souche de la population Roquefort présentaient une plus faible activité de l'eau, ce qui peut permettre de limiter les risques de contamination par des microorganismes d'altération (Caron *et al*., 2021). Les activités protéolytique et lipolytique *in caseo* étaient plus fortes dans les fromages produits avec les souches de la population Roquefort que dans les fromages produits avec les souches des autres populations (Figure 22c., Caron *et al*., 2021) alors qu'*in vitro* c'est la population non-Roquefort qui présentait la plus forte activité lipolytique (Dumas *et al*., 2020). Cette activité enzymatique accrue a induit la production d'une plus grande quantité de composés aromatiques perçus positivement, notamment de 2-heptanol (Figure 22d). La plus grande diversité et quantité de composés aromatiques produits par les populations fromagères, et plus particulièrement la population Roquefort, donnait des notes plus fruitées et « fromagères » aux fromages produits. Le différentiel d'activité enzymatique peut également avoir un lien avec la plus faible activité de l'eau observée, notamment par une

libération d'acides aminés et de petits peptides lors de la protéolyse. Enfin, les souches fromagères (c.à.d. Roquefort et non-Roquefort) ont permis la production de fromages avec une plus grande surface de bleu sur leurs tranches, révélant une meilleure croissance ou une plus forte conidiation dans le fromage (Figure 22b, Caron *et al*., 2021). Cette meilleure colonisation du fromage pourrait être liée à une meilleure résistance aux conditions présentes dans un fromage, notamment la salinité, l'abondance en acide lactique et des pressions partielles faibles en $O_2$ et fortes en $CO_2$. Ainsi, les populations de *P. roqueforti* présentent des différences qui ont notamment un effet sur l'apparence et la saveur des fromages (Gillot *et al.*, 2017 ; Ropars *et al*., 2020 ; Dumas et al., 2020 ; Caron *et al*.,2021).

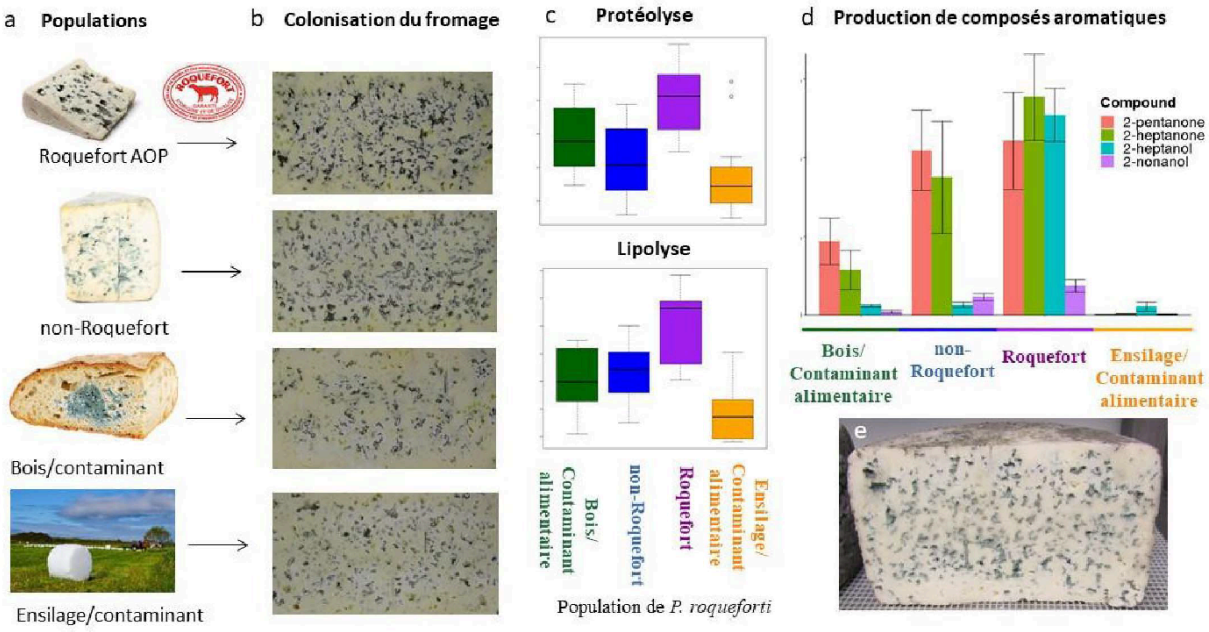



**Figure 22 : Principaux résultats de l'étude de Caron *et al*, 2021, présentant l'analyse de fromages fabriqués selon le mode de production du Roquefort avec des souches des 4 populations introduites dans Dumas *et al*, 2020. Tiré de Ropars *et al*, 2020.**

## D. Objectifs de la thèse

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet ANR Fungadapt, fruit de la collaboration entre le LUBEM de l'Université de Bretagne Occidentale et le laboratoire ESE de l'Université Paris-Saclay, et dans la continuité des travaux énoncés ci-avant s'intéressant aux caractéristiques des populations de *P. roqueforti*. L'objectif de cette thèse est d'approfondir nos connaissances sur les possibles différenciations phénotypiques des populations de *P. roqueforti* témoignant d'une spécialisation de niche et d'en chercher les déterminants génomiques. Cet approfondissement vise à mieux comprendre les mécanismes de l'adaptation et de la domestication des microorganismes à travers un modèle, *P. roqueforti* et à déterminer des pistes pour des améliorations variétales futures possibles.

Pour cela, la thèse s'est articulée autour de trois questionnements scientifiques qui feront l'objet des trois prochains chapitres :

- En faisant varier des conditions abiotiques en lien avec leurs biotopes d'origine, les populations de *P. roqueforti* ont elles des croissances différentes, possiblement liées à une adaptation locale ?

- Les populations de *P. roqueforti* ont elles des profils de production de métabolites secondaires non-volatiles différents pouvant également être liés à une adaptation locale ?

- Quelles sont les régions du génome responsables des variations phénotypiques d'intérêt, notamment pour la production fromagère (en termes de protéolyse, lipolyse, croissance, couleur et production de métabolites secondaires) ?

# II. Chapitre 1 : Différenciation phénotypique des populations de *Penicillium roqueforti*

## A. Introduction et contribution

Une adaptation locale de populations peut dans certains cas être caractérisée par des différences physiologiques augmentant la valeur sélective des populations dans les conditions de leurs biotopes d'origine. L'impact de la variation d'un facteur abiotique sur la valeur sélective peut être approximé via l'étude de la croissance (p.ex. optimum de croissance et/ou de tolérance à des valeurs limites) pour des conditions abiotiques en lien avec les conditions présentes dans leurs biotopes. Chez *Penicillium roqueforti,* les quatre populations décrites par Dumas *et al*. en 2020 sont liées aux environnements fromagers, et à la contamination d'aliments, d'ensilages ou de bois de coupe.

Peu avant le début de l'étude qui fait l'objet de ce premier chapitre, le séquençage de génomes de souches provenant de fromages « Bleus de Termignon », pour lesquels *P. roqueforti* n'est pas inoculé, a mis en évidence l'existence d'une cinquième population. Ainsi, ce chapitre, qui est présenté sous la forme d'un article publié, a consisté dans un premier temps à décrire la nouvelle population « Termignon ». En plus de la description d'une cinquième population au sein de l'espèce *P. roqueforti*, nous avons exploré les potentielles différences phénotypiques entre populations.

Ce premier chapitre a donc cherché à apporter des réponses au premier questionnement scientifique, à savoir :

*En faisant varier des conditions abiotiques en lien avec leurs biotopes d'origine, les populations de* P. roqueforti *ont elles des croissances différentes, possiblement liées à une adaptation locale ?*

Pour ce faire, nous avons suivi la croissance en fonction de différentes conditions abiotiques en lien avec le biotope des populations de plusieurs souches, choisies de manière aléatoire au sein des différentes populations. Nous avons ainsi fait varier un à un des paramètres liés à l'environnement ou à la composition de la matrice : la température, la salinité, le pH, la concentration en acide lactique, la présence d'un fongicide (sorbate de potassium, tébuconazole, natamycine), ainsi que le type de carbohydrates.

Dans le cadre de cette étude et donc de l'article, ma contribution a consisté en la réalisation des phénotypages des souches de *P. roqueforti* via une approche de néphélométrie laser, les modélisations et l'analyse statistique des résultats de phénotypage, et la corédaction de la première version de l'article.

## B. Article

Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié dans *Evolutionary Application* en juillet 2023.

Crequer, E., Ropars, J., Jany, J.-L., Caron, T., Coton, M., Snirc, A., Vernadet, J.-P., Branca, A., Giraud, T. & Coton, E. (2023) A new cheese population in *Penicillium roqueforti* and adaptation of the five populations to their ecological niche. *Evolutionary Applications*, **16**, 1438–1457. Doi: 10.1111/eva.13578

Check for updates

Received: 24 January 2023 | Revised: 26 April 2023 | Accepted: 22 June 2023

DOI: 10.1111/eva.13578

ORIGINAL ARTICLE

Evolutionary Applications Open Access WILEY

# A new cheese population in *Penicillium roqueforti* and adaptation of the five populations to their ecological niche

Ewen Crequer[1,2] | Jeanne Ropars[2] | Jean-Luc Jany[1] | Thibault Caron[2] | Monika Coton[1] | Alodie Snirc[2] | Jean-Philippe Vernadet[2] | Antoine Branca[2] | Tatiana Giraud[2] | Emmanuel Coton[1]

[1]Univ Brest, INRAE, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, Plouzané, France

[2]Université Paris-Saclay, CNRS, AgroParisTech, Laboratoire Ecologie Systématique et Evolution, UMR 8079, Gif-sur-Yvette, France

**Correspondence**
Emmanuel Coton, Univ Brest, INRAE, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, F-29280, Plouzané, France.
Email: emmanuel.coton@univ-brest.fr

**Funding information**
Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: ANR-19-CE20-0002-02 Fungadapt and ANR-19-CE20-0006-01 Artifice

## Abstract

Domestication is an excellent case study for understanding adaptation and multiple fungal lineages have been domesticated for fermenting food products. Studying domestication in fungi has thus both fundamental and applied interest. Genomic studies have revealed the existence of four populations within the blue-cheese-making fungus *Penicillium roqueforti*. The two cheese populations show footprints of domestication, but the adaptation of the two non-cheese populations to their ecological niches (i.e., silage/spoiled food and lumber/spoiled food) has not been investigated yet. Here, we reveal the existence of a new *P. roqueforti* population, specific to French Termignon cheeses, produced using small-scale traditional practices, with spontaneous blue mould colonisation. This Termignon population is genetically differentiated from the four previously identified populations, providing a novel source of genetic diversity for cheese making. The Termignon population indeed displayed substantial genetic diversity, both mating types, horizontally transferred regions previously detected in the non-Roquefort population, and intermediate phenotypes between cheese and non-cheese populations. Phenotypically, the non-Roquefort cheese population was the most differentiated, with specific traits beneficial for cheese making, in particular higher tolerance to salt, to acidic pH and to lactic acid. Our results support the view that this clonal population, used for many cheese types in multiple countries, is a domesticated lineage on which humans exerted strong selection. The lumber/spoiled food and silage/spoiled food populations were not more tolerant to crop fungicides but showed faster growth in various carbon sources (e.g., dextrose, pectin, sucrose, xylose and/or lactose), which can be beneficial in their ecological niches. Such contrasted phenotypes between *P. roqueforti* populations, with beneficial traits for cheese-making in the cheese populations and enhanced ability to metabolise sugars in

Tatiana Giraud and Emmanuel Coton have co-supervised the study.

*Nota bene*: A short video summary of our previous studies and this current study on the domestication of cheese fungi is available at https://www.youtube.com/watch?v=iN0A6dudWqI&ab_channel=PixVideosProductionCompany

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
© 2023 The Authors. *Evolutionary Applications* published by John Wiley & Sons Ltd.

the lumber/spoiled food population, support the inference of domestication in cheese fungi and more generally of adaptation to anthropized environments.

KEYWORDS
carbon sources, domestication, fungicide tolerance, fungus, growth modelling, physiology

## 1 | INTRODUCTION

Domestication, for which humans operate strong selection for identified traits in a species, has been used since Charles Darwin's "*On the origin of species*" book (1859) as a model case of adaptive divergence. Adaptive divergence under domestication has been documented in various lineages in animals and plants (e.g., evolution of dogs from wolves and corn from teosinte; Steensels et al., 2019), but also in bacteria and fungi (e.g., the lactic acid bacteria *Oenococcus oeni*, Lorentzen et al., 2019, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Pontes et al., 2020). Adaptive divergence can result in highly differentiated domesticated varieties. For example, the spread and adaptation of maize to different agro-ecological and cultural environments has led to a multitude of varieties (Meyer & Purugganan, 2013). In dogs, the extreme behavioural and morphological differences between the 500 breeds are the result of directional selection for different behaviours, aspects and usages Hayward et al., 2019. The magnitude of morphological differences between dog breeds is higher than that between wild Canidae (Wayne, 1986).

Fungi represent an interesting clade to study adaptive divergence as they exhibit small genomes and short generation times compared to most plant and animal models. Ascomycota (one of the two main groups of fungi, encompassing most moulds and yeasts) are particularly used for fermented food to produce a variety of beverages and food from animal products (e.g., cheese and dry cured sausages; Venturini Copetti, 2019) or plant products (e.g., wine, bread, tempeh and soya sauce; Nout et al., 1995). Among domesticated Ascomycota, *S. cerevisiae*, the baker's yeast, has been extensively studied (Gallone et al., 2016; García-Ríos et al., 2017; Legras et al., 2018; Peter et al., 2018). Adaptive divergence has been demonstrated in *S. cerevisiae*, with population subdivision and differences between populations in terms of phenotypes relevant for fermentation, such as sulfite resistance, maltotriose fermentation and growth at low temperature (Gallone et al., 2016; García-Ríos et al., 2017). Moulds in Ascomycota have also been domesticated for fermenting food products. For example, *Aspergillus oryzae* (Gibbons et al., 2012; Watarai *et al*., 2019) and *Aspergillus sojae* (Chang, 2004), intensively used in Asia as koji moulds for the production of various fermented products (e.g., miso, sake and shoyu), have evolved beneficial traits for fermentation and human consumption, such as starch breakdown ability (Gibbons et al., 2012) and the lack of toxin production (Kiyota et al., 2011). *Penicillium camemberti*, the fungus used for making bloomy rind soft cheeses (e.g., Brie and Camembert), has also been domesticated. This clonal lineage is indeed genetically differentiated from non-cheese closely related populations and exhibits beneficial traits for cheese production, for example in terms of colour, growth rate, competitive ability and reduced mycotoxin production (Ropars et al., 2020).

Another filamentous ascomycete fungus of interest for the study of adaptive divergence is *Penicillium roqueforti*, because of its importance in several countries for making different types of renowned blue cheeses (e.g., Roquefort, Fourme d'Ambert, Gorgonzola, Danish blue, Stilton and Cabrales). Within *P. roqueforti*, four genetically differentiated populations have been identified so far (Dumas et al., 2020), one population being associated with mouldy silage and spoiled food, one with lumber and spoiled food, and two different cheese populations, resulting from independent domestication events. One of the cheese populations, called non-Roquefort, corresponds to a clonal lineage (Dumas et al., 2020) largely used for the production of many blue cheeses in various countries (e.g., Gorgonzola, Cabrales, Danish blue and Stilton), but not for Roquefort cheeses produced under the protected designation of origin (PDO) label. Strains belonging to the non-Roquefort population harbour large horizontally transferred genomic regions, in particular the *CheesyTer* and *Wallaby* genomic regions (Cheeseman et al., 2014; Ropars et al., 2015), conferring advantages in terms of growth and competitive abilities (Dumas et al., 2020; Ropars et al., 2015). These two horizontally transferred genomic regions are absent from the other three identified *P. roqueforti* populations but have also been acquired, completely or partially, by other cheese-making *Penicillium* fungi (e.g., *Penicillium camemberti* and *P. biforme*; Cheeseman et al., 2014; Ropars et al., 2015). The non-Roquefort lineage has acquired multiple beneficial traits for commercial cheese production, very different from non-cheese populations, such as faster growth on cheese, better exclusion of spoilers, the ability to make bluer cheeses and more attractive aromas (Caron et al., 2021; Coton et al., 2020; Dumas et al., 2020; Gillot et al., 2017).

The other known cheese population is strongly associated with the Roquefort protected designation of origin (PDO; Dumas et al., 2020; Gillot et al., 2015). This Roquefort population is differentiated from the non-Roquefort population and displays higher genetic and phenotypic diversities (Dumas et al., 2020; Gillot et al., 2017), which is probably due to the requirement to use local strains for the Roquefort PDO (Cahier des charges de l'appellation d'origine "Roquefort", 2017). This has prevented Roquefort-cheese producers from using the clonal non-Roquefort lineage, so that they kept using their strains originating from different cultures on local farms in the area. The Roquefort population also displays beneficial traits for cheese production, including the production of typical aromas and blue veined cheeses with larger blue areas than the

17524571, 2023, 8, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eva.13578 by Cochrane France, Wiley Online Library on [13/10/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

non-cheese populations (Caron et al., 2021; Dumas et al., 2020). The Roquefort population, however, seems more adapted to ancient production modes, with for example greater spore production on bread, the original medium used to produce *P. roqueforti* conidia for cheese inoculation (Dumas et al., 2020). The Roquefort population also displays slower growth, which was likely beneficial for cheese production before refrigeration, to preserve cheeses over a span of several months (Dumas et al., 2020).

*Penicillium roqueforti* cheese strains analysed so far all came from cheeses inoculated with spores from cultivated strains. However, some local blue cheeses can be spontaneously colonised by *P. roqueforti*. This is the case for "Bleu de Termignon" cheeses produced by only a handful of cheese makers in the French Alps, with small-scale production. Spontaneous colonisation could result from the presence of feral strains in the farm environment or ripening caves, i.e., spores released from cheeses, corresponding to a known or unknown domesticated cheese population. Alternatively, the strains spontaneously colonising Termignon cheeses could correspond to a genuinely wild population. However, Roquefort-like cheeses produced with the non-cheese populations described so far produced blue cheeses with little or unpleasant aromas (Caron et al., 2021), pointing more to a feral origin or a locally domesticated population.

In addition to the cheese populations, two other populations have indeed been identified in *P. roqueforti*, one largely associated with silage and spoiled food (e.g., bread, fruits and jam) and the other mainly found in lumber and spoiled food (e.g., inner fridge wall and mouldy wild apple; Dumas et al., 2020). These non-cheese populations display higher levels of sexual fertility than the cheese populations and grow faster under harsh conditions (Dumas et al., 2020; Ropars et al., 2016, 2020). The non-cheese populations also present higher genetic diversities than the cheese populations and have diverged from each other more recently than their common ancestor from the cheese populations (Dumas et al., 2020). They may therefore correspond either to populations recently adapted to human-made environments different from cheeses or to ancestral-like, wild populations.

The occurrence of genetically differentiated populations in distinct ecological niches suggests adaptive divergence in *P. roqueforti*. Indeed, these ecological niches are either plant- or dairy-related and vary in terms of environmental conditions (e.g., temperature, pH and salt concentration) and composition (nutrients). Such contrasting environments likely require different metabolic activities for a fungus to thrive in. For example, temperature is much lower during cheese ripening (8 to 14°C according to the (Cahier des charges de l'appellation d'origine « Bleu d'Auvergne », 2016; Cahier des charges de l'appellation d'origine « Bleu du Vercors-Sassenage », 2017)) than for optimal silage production (20–30°C; Borreani & Tabacco, 2010; Ferrero et al., 2021; Weinberg et al., 2001). pH in Roquefort cheeses is around 4.7 and ranges from 3.7 to 5 in silage depending on the forage type (e.g., maize or grass) and on the dry matter percent of the crop. Blue cheeses are among the cheeses with highest salt concentrations (Hashem et al., 2014). Beyond contributing to the organoleptic qualities as a taste enhancer, salt prevents contamination by undesired microorganisms, as it impairs both fungal and bacterial growth by reducing water availability (also called water activity, $a_w$). Water availability is under regulation for cheese import in the USA, for consumer safety, as it prevents the growth of pathogenic microorganisms such as *Listeria* spp. Salt represents nearly 4% weight in Roquefort, leading to very low water activity values (Caron et al., 2021). For non-cheese food, the specific temperature, pH and water activity depend on the type of food and storage conditions. Cheese and silage are environments with high organic acid concentrations due to fermentation, with in particular large quantities of lactic acid (Bevilacqua & Califano, 1989). Lactic acid may be used as a carbon source by some microorganisms (Eschrich et al., 2002; Jiang et al., 2014; Schink et al., 2022) but also exhibits antimicrobial activities, being therefore commonly used as a food preservative.

Carbon sources are very different between the ecological niches of the distinct *P. roqueforti* populations. For example, maltose, starch, pectine, cellobiose and xylose are associated with plant material, while the sugars in cheese are lactose and galactose, but they are present only at the beginning of cheese making and mostly metabolised by bacteria (Lee et al., 2014). Some of the *P. roqueforti* ecological niches can include fungal inhibitors or fungicides; for example, the two *P. roqueforti* populations occurring on spoiled food may be exposed to chemical preservatives commonly used for food preservation (e.g., potassium sorbate and natamycin). In *P. roqueforti*, sorbate resistance has been reported in some strains isolated from spoiled food, which has been attributed to the presence of a horizontally transferred region named *SORBUS* (Punt et al., 2022). In addition, the *P. roqueforti* population associated with silage may be exposed to triazoles, commonly used as fungicides on crops. The existence of specific adaptation to silage and food ecological niches by their *P. roqueforti* populations has not been investigated so far.

In order to improve our understanding of adaptive divergence in *P. roqueforti*, we investigated here (i) the genetic differentiation of strains isolated from Termignon blue cheeses from other populations, by comparing their genomes to available genomes of strains from other ecological niches, and by looking for three horizontally transferred regions (*Wallaby*, *CheesyTer* and *SORBUS*) previously found in some *P. roqueforti* populations or strains, and (ii) the phenotypic differentiation between *P. roqueforti* populations for traits likely under differential selection in the different ecological niches. We studied the impact of temperature, pH, salt concentration, various carbon sources and fungal inhibitors on the growth rate and latency of the different *P. roqueforti* populations using laser nephelometry, a mid-throughput method which measures fungal growth by estimating particle density in liquid media based on the detection of light reflection by cells. We thereby tested the hypothesis that the Termignon cheeses are made with a specific *P. roqueforti* population, that has evolved adaptive traits for cheese making, and, more generally, that the different *P.*

17524571, 2023, 8, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eva.13578 by Cochrane France, Wiley Online Library on [13/10/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

*roqueforti* populations exhibit adaptation to their respective ecological niches.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Strain collection and conidia suspension preparation

For comparative genomics, we analysed the genomes of 51 *P. roqueforti* strains (Table S1). Among them, we randomly selected for phenotypic experiments seven strains from each of the non-Roquefort and Roquefort populations, six strains from the lumber/spoiled food population, and eight strains from the silage/spoiled food population, which presents the highest genetic diversity (Dumas et al., 2020). We also used the four available strains sampled from Termignon blue cheeses. All strains are part of the ESE or UBOCC (https://nouveau.univ-brest.fr/ubocc/fr) culture collections (Table S1).

Conidia suspensions were prepared for the different experiments by cultivating the fungal strains for 6 days at 25°C on potato dextrose agar (PDA, Difco, Fisher Scientific). Two millilitres of Tween 80 (0.045%, v/v) were then added on each plate and conidia were scraped off the surface. Conidia concentrations in the suspensions were estimated using Malassez cells and adjusted to $10^6$ conidia. $mL^{-1}$ with Tween 80. Fresh suspensions were prepared for each experiment.

### 2.2 | Genome sequencing and population genomics

DNA was extracted from Termignon cheese isolates and all new strains sequenced using the Illumina technology for this project from fresh haploid mycelium and conidia after monospore isolation and growth for 5 days on malt agar using the Nucleospin Soil Kit (Macherey-Nagel). Sequencing was performed using the Illumina paired-end technology (Illumina Inc.) at the INRAe GenoToul and CNRS I2BC platforms. We also generated an improved long read-based genome assembly of the LCP06133 strain. Its DNA was extracted from mycelium and conidia with the NucleoBond High Molecular Weight DNA kit (Macherey-Nagel), with the mechanical disruption of about 30 mg of lyophilized mycelium with beads for 5 min at 30 Hz. Its genome was sequenced using the Oxford Nanopore MinION technology with an R9 flow cell without multiplexing. The Nanopore library was prepared with the SQK-LSK109 ligation sequencing kit and sequencing was performed in-house. We assessed the run quality using Porechop version 0.2.3_sequan2.1.1 (Wick et al., 2017). All raw data are available at NCBI under the project ID PRJNA933571. We also used some available genomes (Dumas et al., 2020; Table S1).

We trimmed all Illumina reads and cleaned adapters with Trimmomatic v0.36 (Bolger et al., 2014). We removed the three bases at the beginning and end of reads using the *Leading* and *Trailing* options, dropped reads having a length inferior to 36 with the *MINLEN* option and performed a sliding window trimming approach using the *Slidingwindow* option and 4:25 as values. Cleaned reads were mapped on the new high-quality *P. roqueforti* LCP06133 reference genome assembly (project ID PRJNA933571) using *Bowtie2* version 2.3.4.1 (Langmead & Salzberg, 2012). This reference genome was built using raw ONT reads with Canu version 1.8 (Koren et al., 2017) with the option genomeSize = 28 m and polished twice using Illumina reads (Dumas et al., 2020) with Pilon version 1.24 (Walker et al., 2014), after a mapping using *Bowtie2* (Langmead & Salzberg, 2012) with a maximum length (–X) of 1000 bp for both runs. Redundant contigs were removed based on a self-alignment. In Bowtie2, the maximum length (–X) was set to 1000 and the preset "very-sensitive-local" was used. SAMtools v1.7 (Li et al., 2009) was used to filter out duplicate reads and reads with a mapping quality score above 10 for SNP calling. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) were called using the GATK v4.1.2.0 Haplotype Caller (McKenna et al., 2010), generating a gVCF file per strain. GVCFs were combined using GATK CombineGVCFs, genotypes with GATK GenotypeGVCFs, and SNPs were selected using GATK SelectVariants. SNPs were filtered using GATK VariantFiltration and options QUAL <30, DP < 10, QD < 2.0, FS > 60.0, MQ < 40.0, SOR >3.0, QRankSum < −12.5, ReadPosRankSum < −8.0. All processes from cleaning to variant calling were performed with Snakemake v5.3.0 (Koster & Rahmann, 2012) using an internally developed script.

We used Splitstree v4.16.2 (Huson & Bryant, 2006) for the neighbour-net analysis. We used the R package *ade4* v.1.7–20 (Bougeard & Dray, 2018; Chessel et al., 2004; Dray & Dufour, 2007; Thioulouse et al., 2018) for principal component analyses (PCA, centred and unscaled). We used NGSadmix v.33 (Jørsboe et al., 2017) from the ANGSD (Korneliussen et al., 2014) package (version 0.933-110-g6921bc6) to infer individual ancestry from genotype likelihoods based on realigned reads, by assuming a given number of populations. A Beagle file was first prepared from bam using ANGSD with the following parameters: "-uniqueOnly 1 -remove_bads 1 -only_proper_pairs 1 -GL 1 -doMajorMinor 1 -doMaf 1 -doGlf 2 -SNP_pval 1e-6". The Beagle file was used to run NGSadmix with 4 as the minimum number of informative individuals. The analysis was run for different *K* values, ranging from 2 to 6. A hundred independent runs were carried out for each number of clusters (*K*).

The nucleotide diversity $\pi$ (Nei's Pi; Hudson et al., 1992; Nei & Li, 1979), the Watterson's $\theta$ (Watterson, 1975), the fixation index $F_{ST}$ (Hudson et al., 1992) and the absolute divergence $d_{XY}$ (Nei & Li, 1979) were calculated using the *popgenome* v.2.7.5 package in R (Pfeifer et al., 2014). Fixed, private and shared sites were counted using custom scripts available at https://github.com/BastienBennetot/fixed_shared_private_count, with bcftools version 1.11 (using htslib 1.13 + ds). The strain ESE00421 was not included for these computations. The pairwise homology index (PHI) test was performed using Splitstree v4.16.2 (Huson & Bryant, 2006).

Mating types in the Termignon population were determined using a mapping approach: the two mating-type alleles previously



17524571, 2023, 8, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eva.13578 by Cochrane France, Wiley Online Library on [13/10/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

identified in *P. roqueforti* (Ropars et al., 2012) were used as references to map the Termignon strain reads.

We assessed the presence of the horizontally transferred regions *Wallaby* and *CheesyTer* in the genomes of the Termignon strains (as they were previously searched for in the other genomes), and of the *SORBUS* region in all the genomes analysed here, by mapping the Illumina reads on the published sequences (Cheeseman et al., 2014; Punt et al., 2022; Ropars et al., 2015).

## 2.3 | Growth media and conditions for phenotypic studies

For all tested conditions, we used potato dextrose broth (PDB, Difco, Fisher Scientific), except to evaluate carbon source impact on growth, for which we used a minimum medium (see below). For assessing temperature impact on growth, microplates were incubated at nine different temperatures (4, 8, 12, 20, 22, 25, 27, 30 and 32°C). For evaluating the pH impact on growth, PDB (initial pH 5.2) was adjusted to the targeted pH values (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 or 14) using either hydrochloric acid or sodium hydroxide. To assess the effect of salt concentration on growth, we added NaCl (Sigma-Aldrich, Germany), using 11 concentrations (1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6, 8 and 10%), corresponding to the following of water activity values (fraction of water available for growth, $a_w$): 0.996, 0.991, 0.988, 0.986, 0.983, 0.980, 0.977, 0.974, 0.967, 0.960, 0.946 and 0.929. To evaluate the impact of lactic acid on growth, this acid was added to PDB to obtain the target concentrations (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1 and 1.5 M) and pH was adjusted to 5.2 ± 0.1 with sodium hydroxide. All media were sterilised at 121°C for 15 minutes and stored at 4°C until use, except for pH-modified media which were instead filtered at 0.45 μm to avoid pH change during autoclaving.

To study the impact of carbon sources on growth, we supplemented the "M0" minimum medium (urea: 0.5 g.$L^{-1}$, magnesium sulphate: 0.25 g.$L^{-1}$, biotin and thiamin: 50 mg.$L^{-1}$, citric acid and zinc sulphate: 5 mg.$L^{-1}$, iron alum: 1 mg.$L^{-1}$, copper sulphate: 0.25 mg.$L^{-1}$ manganese sulphate, boric acid, sodium molybdate: 0.05 mg.$L^{-1}$) with 20 g.$L^{-1}$ of either sucrose, glucose, lactose, galactose, maltose, cellobiose, xylose, starch, pectin or sodium lactate. The media were then sterilised at 121°C for 15 min.

To assess the impact of fungicides on growth, we supplemented PDB with either potassium sorbate (Sigma-Aldrich, Germany, 0.5 or 1 g.$L^{-1}$), natamycin (Sigma-Aldrich, Germany, 2 or 5 mg.$L^{-1}$) or tebuconazole (Sigma-Aldrich, Germany, 2.5, 5 or 10 mg.$L^{-1}$). We sterilised PDB 2X at 121°C for 15 min and inhibitor solutions by filtration at 0.45 μm, and then combined PDB 2X, inhibitor filtrate and sterile water in order to obtain the targeted inhibitor concentrations.

## 2.4 | Growth monitoring by laser nephelometry

We added 190 μL of broth culture media in sterile 96-well microplates (Thermo Scientific) and completed each well with either 10 μL of conidia suspension at $10^6$ conidia.$mL^{-1}$ or with 10 μL of Tween 80 (0.045% v/v) for negative controls. For incubation, microplates were stored in a plastic box containing sterile distilled water to regulate humidity during incubation. Measures were obtained using a laser nephelometer (NEPHELOstar$^{PLUS}$, BMG labtech) with a laser diode at 635 nm. At the beginning of each measurement, a 20-s 500 rpm double-orbital agitation step was performed by the nephelometer microplate reader (Savary et al., 2022). Each microplate was monitored four times a day for days 1–2, thrice a day for days 3–7, twice a day for days 8–14 and once a day for days 15–21 or until the signal reached saturation. For each experiment, a minimum of three replicas per strain and condition were performed for more robust estimates of growth parameters.

## 2.5 | Fungal growth kinetic follow-up and modelling

Growth kinetics were obtained with nephelometric measurement, i.e., measurement of forward scattered light that is directly proportional to the suspended particle concentration (i.e., the turbidity) and to mycelium dry matter (Joubert et al., 2010), see Figure S1. The results are expressed in an arbitrary unit named relative nephelometry unit (RNU which can range from zero to several thousands until detector saturation), corresponding to the measure of the scattered light at an angle relative to the incident light source to avoid possible transmitted light interference, as a function of time. In order to estimate growth latency and growth rate for each strain and parameter tested, we performed a primary modelling step with the MatLab software (R2018b, Natick, Massachusetts: The MathWorks Inc.; see Figure 2a). We fitted a growth curve to the measured values for each strain and tested parameter using the modified Gompertz Equation (1) (Zwietering et al., 1990), as it is the most robust for fungal growth modelling (Declerck et al., 2001; Savary et al., 2022).

$$y = y_0 + a \times \exp\left[-\exp\left[\left(\frac{\mu_m \times \exp(1)}{a}\right)(\lambda - t) + 1\right]\right] \quad (1)$$

where $y_0$ is the value for time 0, $y$ is the turbidity signal (in RNU) measured at time $t$, $a$ is the maximal amplitude of the turbidity signal in RNU, $\mu_m$ is the growth rate (RNU.$h^{-1}$) in the exponential phase (hereafter called "maximal growth rate" as typically done in modelling growth studies) and $\lambda$ is the lag time in hours (i.e., the time before fungal growth is detected). See Figure S1 for an illustration of the parameters.

We included a negative control in each microplate (i.e., a well with only medium) for which the measures obtained were fitted with a polynomial model adapted to this type of data, i.e., with limited variation of signal. For each well, each fitted value for the negative control was subtracted to the value of the same time point obtained in inoculated wells in order to standardise the kinetics modelling across plates and conditions.



17524571, 2023, 8, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eva.13578 by Cochrane France, Wiley Online Library on [13/10/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Using the output parameters of the primary modelling, we performed a secondary modelling for each of the studied parameters (i.e., temperature, pH, lactic acid concentration and water activity), to determine the cardinal values, i.e., the minimum, optimal and maximum values of these factors for growth, as well as the growth rate at the optimal value (i.e., the maximal growth rate across conditions, hereafter called "optimal growth rate" as typically done in growth rate modelling studies; see Figure 2a). We used cardinal models to fit the maximal growth rate and inverse latency (the inverse of the latency as this can be modelled with the same model as for the growth rate, in contrast to latency), to assess the impact of the tested abiotic factors on microbial growth using Equations (2) to (5).

$$Y_m = Y_{opt} \cdot CM(X) \quad (2)$$

where CM(*X*) is the value returned by the cardinal model for *X*, the model being as in Equations (3), (4) or (5) depending on the studied parameter *X*, $Y_{opt}$ corresponds to the optimal growth rate (RNU/hour) or optimal reciprocal latency (inverse of latency, $\lambda^{-1}_{opt}$) to model the effect of the various factors on the optimal growth rate or optimal inverse latency, noted *Y* in the equation.

To determine temperature and water activity cardinal values (i.e., minimum, optimal and maximum values for growth; Figure 2a), we used the Rosso model (Rosso et al., 1993, 1995), largely used to model the effect of temperature and water activity on fungal growth (Dagnas & Membré, 2013), and presented in Equation (3).

$$CM(X) = \begin{cases} 0 & X \le X_{min} \\ \dfrac{(X - X_{max}) \cdot (X - X_{min})^2}{(X_{opt} - X_{min}) \cdot \{(X_{opt} - X_{min}) \cdot (X - X_{opt}) - (X_{opt} - X_{max}) \cdot [X_{opt} + X_{min} - 2X]\}} & X_{min} < X < X_{max} \\ 0 & X < X_{max} \end{cases} \quad (3)$$

where *X* represents the studied parameter (temperature or water activity), and $X_{min}$, $X_{max}$ and $X_{opt}$ are the minimum, maximum and optimal parameter values for growth, respectively (Figure 2a). As the maximal water activity value is 1 (pure water), $a_{w\,max}$ was fixed at 1 (Pinon et al., 2004). As the growth rate was always lower than that measured in the maximal tested water activity value, $a_{w\,opt}$ was fixed at the highest $a_w$ value used, i.e., 0.996 (Savary et al., 2022). See Figure S1 for an illustration of the parameters.

For determining pH growth limits, we used the Presser model (Presser et al., 1998) presented in Equation (4), that is the most appropriate when growth rate and latency are stable in a large range of pH as is the case in fungi:

$$CM(X) = \left(1 - 10^{pH_{min} - pH}\right) \cdot \left(1 - 10^{pH - pH_{max}}\right), pH_{min} < pH < pH_{max} \quad (4)$$

where $pH_{min}$ and $pH_{max}$ are the minimum and maximum pH values for which fungal growth is possible, respectively.

To model growth parameters as a function of lactic acid concentration, we applied the model developed by Le Marc et al. (2002), designed for estimating the minimum inhibitory concentration:

$$CM(X) = 1 - [LA] / [LA]_{max}, [LA] < [LA]_{max} \quad (5)$$

where [LA] represents the total concentration in lactic acid and $[LA]_{max}$ the maximum lactic acid concentration for fungal growth.

Growth rates and latencies obtained from primary modelling were fitted with these equations by minimising the sum of squared error (*nlinfit* function, MATLAB R2018b). Five percent confidence intervals were computed using the Jacobian matrix (*nlparci* function, MATLAB R2018b). We assessed how well our models predicted the data by computing the root mean square error (RMSE), measuring the error of a model in predicting quantitative data, and the determination coefficient ($r^2$), measuring the proportion of variance in the growth parameter explained by the factor variation in the model. We kept only the values of the growth dynamics that could be modelled with sufficient confidence, hence strain replica values with coefficient $r^2$ below 0.95 were excluded from further analyses. For population comparisons, we used a single value per strain and parameter, corresponding either to the mean of the replicates per strain (growth curve modelling) or to the secondary modelling outcome.

## 2.6 | Statistical analyses on phenotypes

In order to evaluate the impact of fungicides (lactic acid, potassium sorbate, tebuconazole and natamycin), controlling for intrinsic growth variations among strains, we computed relative latency and growth rate by dividing the measured growth values by a reference value for each strain. The reference values were the individual growth values obtained in PDB without fungicide.

Statistical analyses for testing differences in phenotypes between populations were performed using the R software (version 4.2.1, https://www.r-project.org/). For population comparisons, Shapiro–Wilk and Bartlett tests (package *rstatix* v.0.7.1, R) were performed to assess normality and homoscedasticity of residuals in each population. If the data or the log-transformed data did not deviate from normality and homoscedasticity, populations were compared using ANOVA type I and Tukey tests were used as post-hoc tests. If the log-transformed and square-root transformed data significantly deviated from normality, a Kruskal–Wallis test was performed on raw data to compare populations, followed by Dunn tests as post-hoc tests.

To illustrate phenotypic population differentiation, we performed a principal component analysis (PCA) based on the phenotypes, i.e., the parameter values obtained in growth curves in all experiments using the *FactoMiner* v2.7 R package (Lê et al., 2008).



17520571, 2023, 8, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eva.13578 by Cochrane France, Wiley Online Library on [13/10/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Identification of a specific Termignon cheese population

After filtering, we obtained 190,387 SNPs in total in the set of 51 genomes. The neighbour-net network (SplitsTree, Figure 1a) revealed a novel *P. roqueforti* population, specific to Termignon cheeses, and most closely related to the non-Roquefort population (Figure 1; Table S2). The Termignon population displayed reticulations up to the tips of the network, suggesting that recombination may occur. The pairwise homology index tests in fact indicated signs of recombination in the Termignon population, as in the silage/spoiled food and lumber/soiled food populations ($p < 0.0001$), but not in the Roquefort or non-Roquefort populations ($p = 0.99$). Three strains in the Termignon population carried the MAT1-1 mating type (ESE00424, ESE00428 and ESE00685) while the fourth one carried the MAT1-2 mating type (ESE00426). A fifth strain had been isolated from a Termignon cheese (ESE00425) but actually belonged to the Roquefort genetic cluster.

The PCA based on SNPs (Figure 1b), and the $F_{ST}$ and $d_{XY}$ values (Table S2) showed a high differentiation of the non-Roquefort and Roquefort populations from other populations and one to each other, in agreement with the previous inference of strong divergence following independent domestication of these two lineages. The Termignon population again appeared differentiated from the other populations, especially on the first and fourth axes of the PCA, and the $F_{ST}$ and $d_{XY}$ values (Figure S2; Table S2). The Termignon population appeared genetically closer to the non-Roquefort population on the splitstree but closer to the non-cheese populations on the PCA. The strong differentiation of the cheese populations from other populations in the PCA is likely due to the existence of a high number of fixed SNPs in each of the Roquefort and non-Roquefort populations due to strong bottlenecks (Table S2). The high percentage of identical and fixed alleles shared between the Termignon and the non-Roquefort populations (Table S2) explains, on the other hand, that they are branched together in the neighbour-net network, i.e., showing that they are most closely related to each other. The silage/spoiled food and lumber/spoiled food populations had the highest diversity levels. These two populations also had the highest shared polymorphism level (Table S2), in agreement with the previous inference showing that their split represents the most recent divergence in *P. roqueforti*. Indeed, previous ABC demographic inference based on whole-genome sequencing have revealed that these two populations split the most recently, while the Roquefort and non-Roquefort populations diverged much earlier (Dumas et al., 2020).

The NGSAdmix analysis, which gives a probability of assignment to genetic clusters with a pre-defined number of clusters K, also supported the existence of five genetically differentiated clusters, with five well defined clusters at K = 5, each including multiple strains assigned at 100% and with 70% of the runs finding this subdivision (Figure 1c). At K = 6, different subdivisions were inferred in the different runs, with balanced proportions for the various solutions, that inferred subclusters in either of the populations (Figure S3). However, the splitstree and PCA (Figure 1a,b) showed that the main level of genetic subdivision was at K = 5. The second order rate of change in the likelihood (ΔK) peaked at K = 4 (Figure S3), indicating that the subdivision in four clusters is the strongest population subdivision level (the strongest increase in likelihood when increasing K by 1 was between K = 4 and K = 5). The neighbour-net network, the barplots, the PCA and the $F_{ST}$ values (Figure 1; Table S2) nevertheless showed that the subdivision in five clusters is genuine and appeared biologically the most relevant regarding ecological niches. We therefore considered the subdivision into five clusters in the following.

A few strains displayed intermediate percentages of assignation at several clusters at K = 5 and at higher K values. Such low percentages of assignation can result from admixture between groups or from low assignation power, for example because a few strains are differentiated from other strains within their cluster. The LCP06131 strain, for example, displayed intermediate assignment levels in barplots (Figure 1c; Figure S3), but the splitstree showed that this strain is still much closer genetically to other strains in the Roquefort cluster than to other clusters, and without reticulations. The LCP06679 strain appeared close to ESE00421 and LCP06036 in the splitstree but has been assigned to the silage/food spoiler population by the NGSAdmix analysis and in a splitstree with additional genomes (unpublished data); this strain was therefore considered to belong to the silage/spoiled food population in phenotypic analyses. Among the phenotyped strains, three strains showed intermediate percentages of assignment. The ESE00421 strain was phenotyped but appeared intermediate between clusters in all analyses (splitstree, PCA and NGSAdmix; Figure 1 and Figure S3), suggesting that it may be an admixed strain, i.e., resulting from a cross between clusters. We therefore excluded this strain from the statistical tests on phenotype differences. Two other phenotyped strains, UBOCC-A-118017 and LCP06059, displayed intermediate assignment percentages, but fell in the middle of the silage/spoiled food cluster in the splitstree. The UBOCC-A-118017 strain appeared intermediate between the Termignon and silage/spoiled food clusters in the PCA but the LCP06059 strain clustered well in the silage group. Because of these assignment uncertainties, we tested differences between clusters with and without these two strains. We present below the statistical test results with the two strains included. Similar results were obtained when removing them from the dataset, unless specified otherwise.

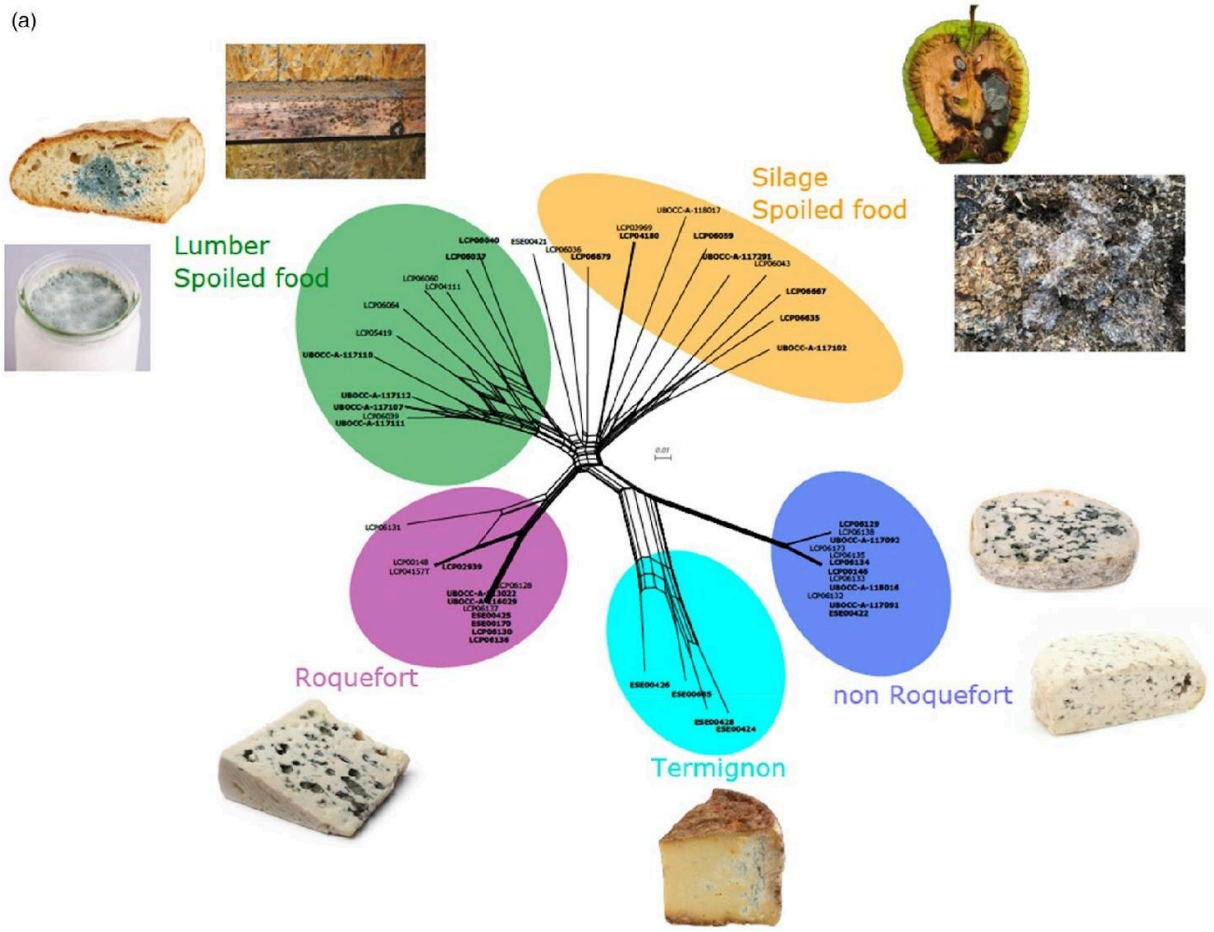
The four Termignon strains carried the whole *CheesyTer* region in their genome, while only two (ESE00424 and ESE00685) harboured the *Wallaby* region. Only two strains (LCP04180 and LCP03969), both isolated from spoiled foods and belonging to the silage/spoiled food population, carried the *SORBUS* horizontally transferred region.

### 3.2 | *Penicillium roqueforti* populations exhibit distinct growth responses to abiotic factors

We tested whether growth behaviour differed between the five identified *P. roqueforti* populations in response to various abiotic



17524571, 2023, 8, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eva.13578 by Cochrane France, Wiley Online Library on [13/10/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License



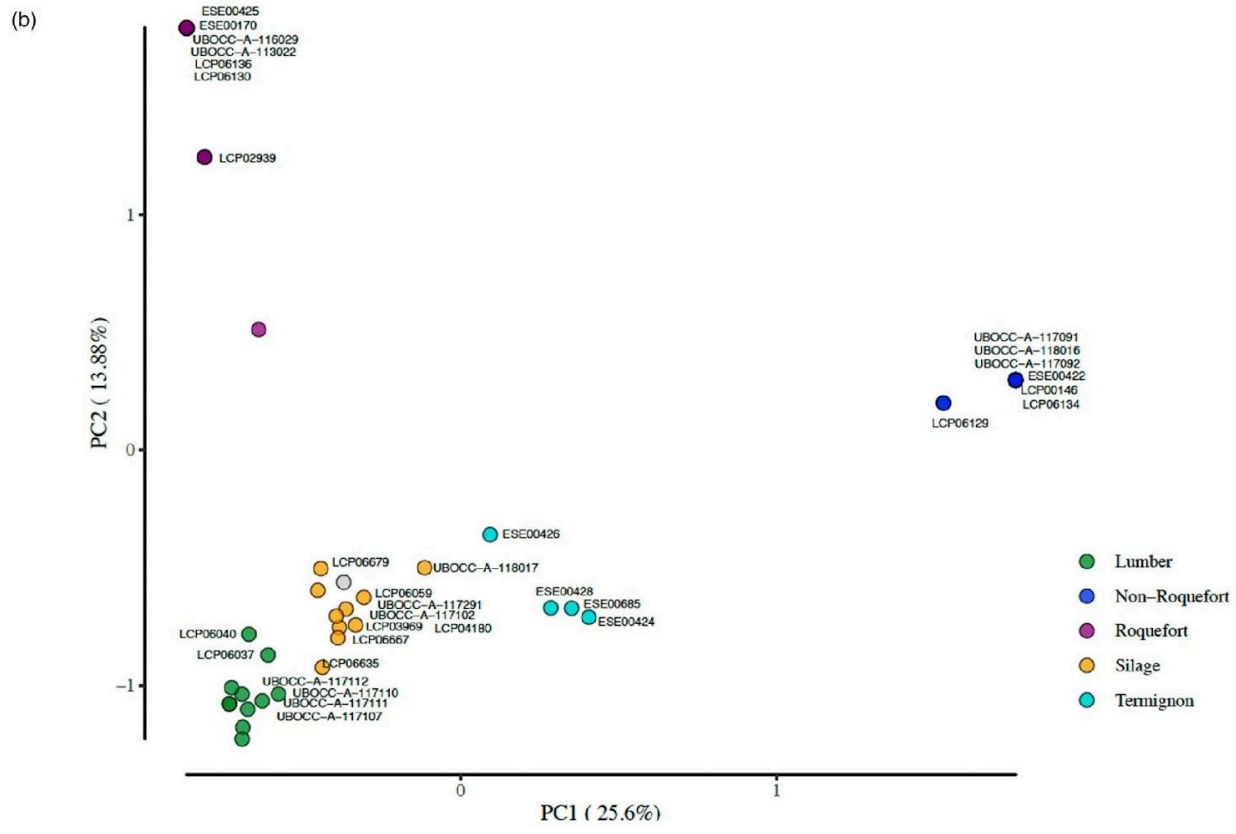




FIGURE 1 (Continued)



17525571, 2023, 8, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eva.13578 by Cochrane France, Wiley Online Library on [13/10/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

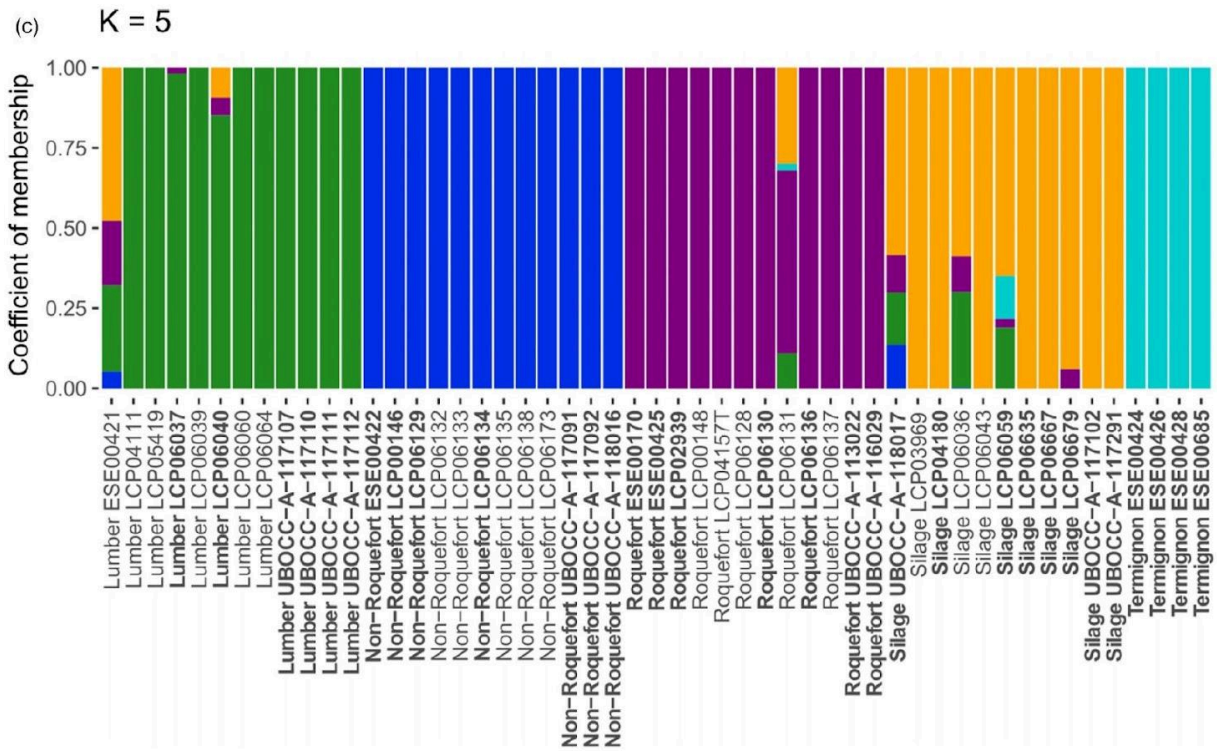



**FIGURE 1** Representation of the genomic data and the differentiation between the five populations of *Penicillium roqueforti*: the three cheese populations (Roquefort, non-Roquefort and Termignon) and the two non-cheese populations (silage/food spoiler and lumber/spoiled food). (a) Reticulated network of *P. roqueforti* strains based on 190,387 single nucleotide polymorphisms, showing the five distinct populations with pictures of their respective environments of collection. The ID of the strains used for phenotyping are in bold. (b) Principal component analysis based on 190,387 single nucleotide polymorphisms. The names of the strains used in phenotype comparisons are indicated. The strain ESE00421 with intermediate assignments in various clusters with NGSadmix is shown in grey. (c) Population subdivision inferred with NGSadmix for K = 5 populations (see Figure S3 for K = 2 to 6). Colored bars represent the coefficients of membership in the K gene pools based on genomic data. Each bar represents a strain, its name being indicated at the bottom of the figure. The ID of the strains used for phenotyping are in bold. The same colour code as on the other figures is used in all three panels.

factors. The principal component analysis (PCA) performed on the 33 phenotyped strains with the 39 inferred growth parameters (Table S3) separated well the different *P. roqueforti* populations (Figure 2). The first dimension separated the non-Roquefort and the lumber/spoiled food populations, the novel Termignon population being intermediate. This first PCA dimension was positively associated with the optimal growth rates obtained from secondary modelling in the temperature, water activity, pH and lactic acid concentration assays, and growth rate in lactose, pectin, xylose and sucrose, and negatively with minimum reciprocal latency and relative growth rate in potassium sorbate at 0.5 $g.L^{-1}$. This suggests that the non-Roquefort population grows more slowly, is more tolerant to 0.5 $g.L^{-1}$ potassium sorbate, has shorter minimal latency, and that the lumber/spoiled food population can better use lactose, pectin, xylose and sucrose for growth than the other populations.

The second PCA dimension separated the silage/spoiled food and cheese populations, the Termignon population once again appearing intermediate (Figure 2). This second PCA dimension was positively associated with maximal pH, optimal water activity and optimal temperature, and negatively with minimal temperature. This suggests that cheese populations are less tolerant to higher pH and have lower optimal growth temperature than the silage/spoiled food population.

The third PCA axis separated the silage/spoiled food and non-Roquefort populations on the one hand from the Roquefort and lumber/spoiled food populations on the other hand, the Termignon population appearing intermediate (Figure S4). This PCA dimension was negatively associated with maximal lactic acid concentration. This suggests that non-Roquefort and silage populations present better tolerance to high lactic acid concentrations compared to the other populations.

### 3.3 | The non-Roquefort population displays the highest salt and pH tolerance

Statistical tests confirmed a distinct growth behaviour of the non-Roquefort population compared to the other populations, revealing significant differences in terms of salt and pH tolerance. The populations indeed showed significant differences in the minimum water activity for growth (ANOVA Table S4, becoming non-significant when the LCP06059 and UBOCC-A-118017 strains are excluded). *Post-hoc* tests did not detect any significant differences between



17524571, 2023, 8, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eva.13578 by Cochrane France, Wiley Online Library on [13/10/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

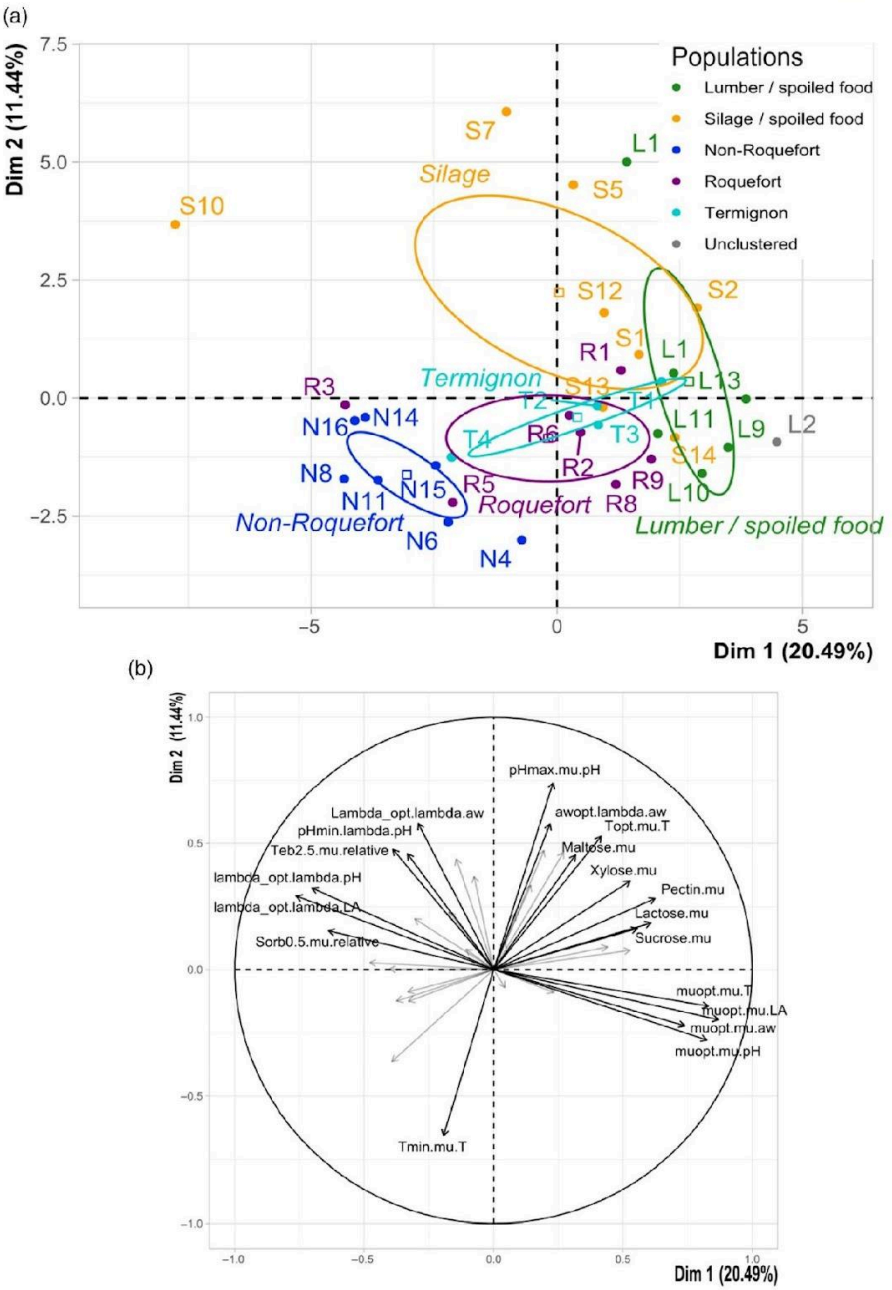



FIGURE 2 Principal component analysis (PCA) illustrating the phenotypic differences between *Penicillium roqueforti* populations based on growth response to temperature, water activity (salt), pH, various carbon sources (sucrose, glucose, lactose, galactose, maltose, cellobiose, xylose, starch, pectin and lactic acid) and to exposure to fungal inhibitors (lactic acid, potassium sorbate, tebuconazole and natamycin). (a) Strains on the first two axes of the PCA. A confidence ellipse is drawn for each of the five populations. The percentage of variance explained by the axes are indicated. The same colour code is used as in the other figures: green for the lumber/spoiled food population, orange for the silage population, dark blue for the non-Roquefort cheese population, purple for the Roquefort cheese population and light blue for the Termignon cheese population. The strain IDs are provided in Table S1. (b) Association between the two PCA axes and the variables. Pectin.mu, lactose.mu, Maltose.mu, Xylose.mu, Sucrose.mu correspond to growth rate with pectin, lactose, maltose, xylose or sucrose as sole carbon sources, respectively. awopt.lambda.aw corresponds to optimal water activity (salt concentration minimising latency). Tmin.mu.T and Topt.mu.T corresponds to the minimal and optimal growth temperature; muopt.mu.T, muopt.mu.aw, muopt.mu.ph and muopt.mu.LA correspond the optimal parameter values for growth rate in terms of temperature, water activity (salt concentration), pH and lactic acid concentration, respectively. lambda.opt.lambda.aw, lambda.opt.lambda.pH and lambda.opt.lambda.LA, correspond to the optimal parameter values for inverse latency in terms of water activity (salt concentration), pH and lactic acid concentration, respectively. See Figure S1 for an illustration of parameter determination.



17524571, 2023, 8, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eva.13578 by Cochrane France, Wiley Online Library on [13/10/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

pairs of populations (Figure 3b; Table S4). The means nevertheless indicated that the silage/spoiled food and non-Roquefort populations tended to tolerate lower minimum water activity (i.e., had higher salt tolerance) than lumber / spoiled food and Termignon populations (Figure 3b; Table S3). The non-Roquefort population was also characterised by a significantly lower optimal water activity for latency (mean of 0.993 for the shortest latency) than the Roquefort population (mean of 0.995 for the shortest latency, Table S3). This means that the shortest latency for the non-Roquefort population was observed at a higher salt concentration (0.5% in NaCl) than for the Roquefort population (0.2% in NaCl). These findings support previous inference suggesting adaptation to highly salted environments in the non-Roquefort population (Dumas et al., 2020).

The non-Roquefort population also tolerated more acidic pH, its mean minimal pH for growth being significantly lower than those for the silage/spoiled food, Roquefort and Termignon populations (mean $pH_{min}$: 1.82 vs. 2.19, 2.20 and 2.27, respectively, Table S3). The maximal pH for growth for the non-Roquefort population was also significantly lower than for the silage/spoiled food population (mean $pH_{max}$: 10.34 vs. 10.51; Figure 3D, Table S3). The Termignon population displayed an intermediate maximal pH value (mean $pH_{max}$: 10.44) between cheese and non-cheese populations (Figure 3).

We detected a significant difference between populations in the minimal temperature for growth, post-hoc tests indicating a significantly lower minimal temperature for the Termignon population than for each of the two non-cheese populations (Figure 2; Table S4). However, the estimated minimal temperatures ($T_{min}$) were all below 0°C, which has little biological or practical relevance in terms of cheese making, food storage or silage storage. Differences between populations were not significant for the other estimated cardinal temperature values, while there was a tendency for a lower temperature optimum for the non-Roquefort population compared to the silage population (Table S4).

### 3.4 | Better capacity to use various carbohydrates for the silage/spoiled food and lumber/spoiled food populations

We also compared the ability of the different *P. roqueforti* populations to use various carbohydrates and lactic acid as carbon sources because cheese presents low concentrations in carbohydrates but a high concentration in lactic acid, in contrast to silage. The lumber/spoiled food population showed a significantly higher mean growth rate in potato dextrose broth than the non-Roquefort population (Figure 4a,b; Table S4). We detected significant differences in growth rate between populations in lactose, sucrose, xylose and pectin (Figure 4b; Table S5). The lumber/spoiled food population indeed showed significantly faster growth than the non-Roquefort population in sucrose, xylose, and pectin (plant-derived sugars; Figure 4b; Table S5) and than the Roquefort population in lactose (dairy-derived sugar, Figure 4b; Table S5). The silage/spoiled food population grew significantly faster than the non-Roquefort population in pectin and than the non-Roquefort and Roquefort populations in lactose (Figure 4b; Table S5). The differences between the silage and non-Roquefort populations in terms of growth rate in pectin and lactose were not significant any more when removing the LCP06059 and UBOCC-A-118017 strains from the analysis. We did not detect any significant growth rate differences between populations for the other tested carbon sources (galactose, lactic acid, maltose or cellobiose, Figure 4b; Table S5). Figure 5 also illustrates the intermediate position of the Termignon population in the PCA (Figure 2), with in particular intermediate phenotypes between cheese and non-cheese populations in terms of growth rates on lactose, xylose and maltose.

### 3.5 | *Penicillium roqueforti* populations exhibit different growth responses to lactic acid exposure but no difference for other fungicides

As *P. roqueforti* populations can be exposed to various fungicides or fungal inhibitors depending on their ecological niches, we tested whether some of the *P. roqueforti* populations had higher tolerance than others. We detected significantly different behaviours between populations in response to the presence of lactic acid, a fungal inhibitor produced during lactic fermentation, with a higher tolerance of the non-Roquefort population (Figure 5a). The non-Roquefort population growth rate was less impacted by lactic acid than other populations. Indeed, the maximal lactic acid concentration for growth was higher for the non-Roquefort population (mean of 1.05 M) than the other populations (means between 0.65 and 0.76 M, Figure 5a; Table S4); *Post-hoc* tests indicated that the difference between non-Roquefort and Roquefort population was significant. The non-Roquefort population showed higher relative growth rate at lactic acid concentrations ranging from 0.1 to 0.4 M (Figure 5b; Table S6) than other populations. This may result from an adaptation of the non-Roquefort population to the cheese environment where lactic acid is an important inhibitor. We detected no significant latency or growth rate differences between populations when exposed to the other fungicides, i.e., potassium sorbate and natamycin, used in the food industry, or tebuconazole, the main fungicide used on crops (Table S6). Among the phenotypically tested strains, LCP04180, the only phenotyped strain carrying the *SORBUS* region associated with sorbate-resistance, had a latency that was the least impacted by a sorbate concentration at 1 $g.L^{-1}$ (Table S3).

## 4 | DISCUSSION

In this study, we revealed a new *P. roqueforti* population, specific to Termignon cheeses, in which this blue mould is not inoculated. We detected differences between the cheese and non-cheese *P. roqueforti* populations in terms of growth response to various abiotic factors. The non-Roquefort cheese population appeared as the most phenotypically differentiated population, with higher tolerance to salt, more acidic pH and lactic acid. These results are in agreement



17524571, 2023, 8, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eva.13578 by Cochrane France, Wiley Online Library on [13/10/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

with the previous suggestion that the non-Roquefort population has been subjected to strong selection for traits beneficial for cheese-making (Dumas et al., 2020). The Termignon population appeared phenotypically intermediate between cheese and non-cheese populations. The non-cheese populations show faster growth in various carbohydrates compared to the non-Roquefort and/or Roquefort populations, with faster growth of the lumber/spoiled food population in sucrose, xylose and pectin, and faster growth of the silage/spoiled food population in lactose and pectin. This suggests that the non-cheese populations are adapted to ecological niches that are rich in diverse carbohydrates, and particularly in plant-derived sugars.

## 4.1 | A specific *Penicillium roqueforti* population in Termignon cheeses

The Termignon strains, that spontaneously colonise cheeses in small-scale traditional cheese-making processes, formed a specific population, genetically differentiated from the four previously identified populations (Dumas et al., 2020). This population may be an unidentified, genuinely wild population, or a locally domesticated population. The Termignon population displayed substantial genetic diversity, both mating types, horizontally transferred regions previously detected in the non-Roquefort population, and intermediate phenotypes between cheese and non-cheese populations, in particular in terms of maximal pH and growth rates on lactose, xylose and maltose. Its intermediate phenotypes between cheese and non-cheese populations suggest that it may have been selected for traits beneficial for cheese making, although less strongly than the other cheese populations. The fact that the Termignon strains are not cultivated or inoculated could let us think that they are not genuinely domesticated. They could however be feral strains deriving from an ancient cultivated *P. roqueforti* population, which would explain why the Termignon population is genetically most closely related to the non-Roquefort cheese population, carried the *CheesyTer* and for two strains the *Wallaby* regions (specific so far to the cheese non-Roquefort population), and displayed phenotypes intermediate between cheese and non-cheese populations. They would thus be descendants of the domesticated population from which the non-Roquefort lineage would have been selected for and further improved, and thus remnants of a larger population from which most of the genetic diversity has been lost. We only isolated five strains from Termignon blue cheeses to date, including one that was actually assigned to the Roquefort population, so that we cannot rule out that strains belonging to other *P. roqueforti* populations may also colonise Termignon cheeses. However, Termignon cheeses are produced by only a handful of French farmers and at small scales (only a few hundred cheeses produced per year), so they may be mainly colonised by strains from the newly described population.

The identified Termignon population represents a potential new source of strain diversity for making blue cheeses, a highly valuable asset given that the Roquefort and the non-Roquefort populations have recently lost most of their diversity (Dumas et al., 2020). The discovery of this new population, with the two alternative mating types, paves the way for strain improvement, through the generation of offspring by crosses between populations, leveraging on the protocol developed to induce sexual reproduction in *P. roqueforti* (Ropars et al., 2016). This will generate novel genetic and phenotypic diversity for cheese making. All strains analysed so far from the non-Roquefort populations carried the MAT1-2 mating type, while most strains of the Roquefort populations harboured the MAT1-1 mating type. The presence of the two mating types in the Termignon population despite the low number of strains available reinforces the view that this population may be recombining, as suggested by the reticulation on the network and the Phi tests. This finding is of interest for future crosses with the two other cheese populations. New beneficial traits for cheese making could be obtained and sexual reproduction could counteract the degeneration occurring in the clonal Roquefort and non-Roquefort lineages (Ropars et al., 2014, 2016).

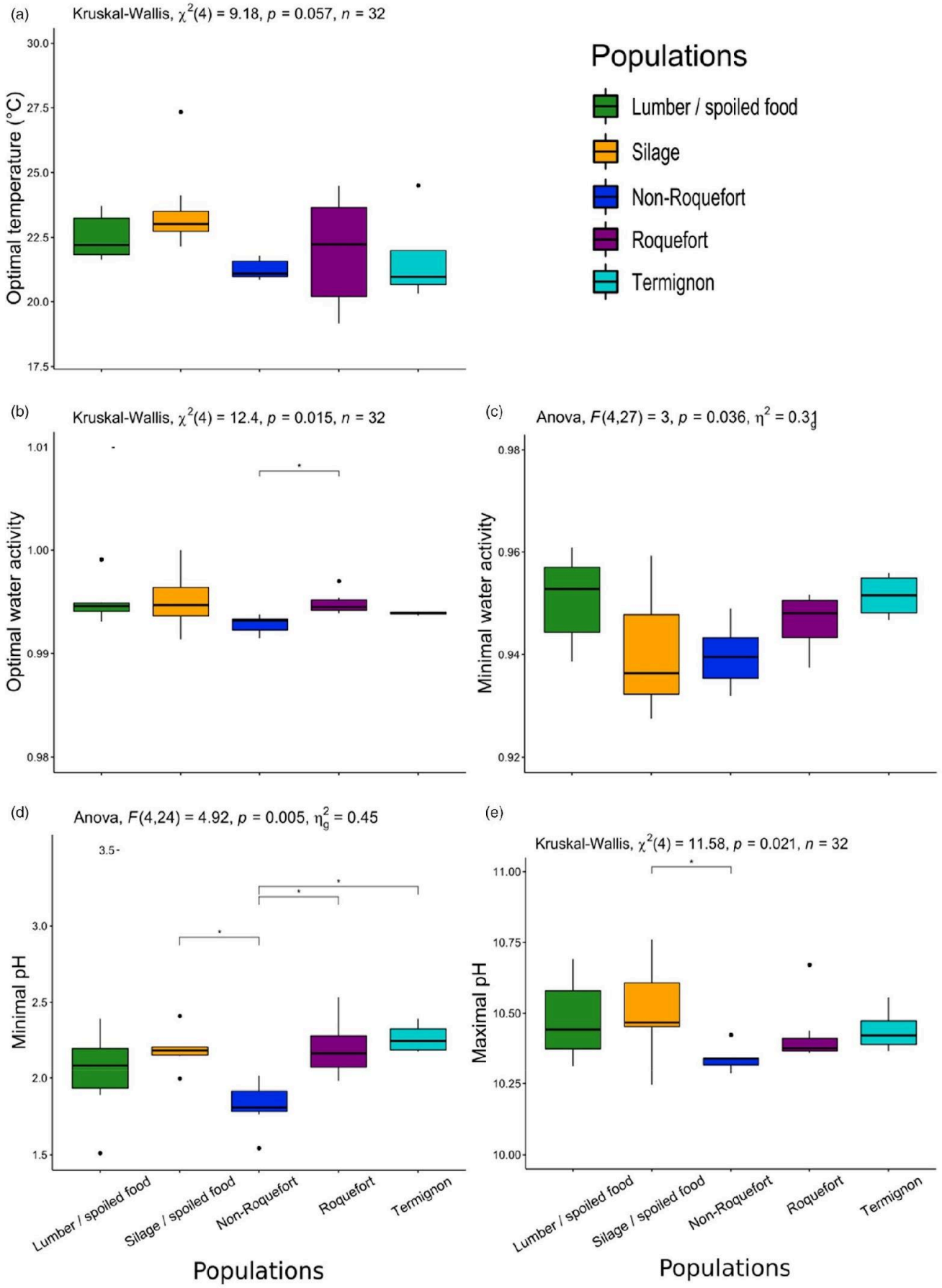
## 4.2 | Specific traits in *Penicillium roqueforti* populations beneficial in their ecological niches

We detected signs of adaptation of the *P. roqueforti* populations to their ecological niches, in particular for the non-Roquefort cheese population and the non-cheese populations. A feature of cheese is its high salt content compared to other *P. roqueforti* ecological niches (wood, fruits and even bread). Salt has been traditionally used for taste enhancing and for its antimicrobial effect improving food conservation. Salt impairs growth of living organisms by decreasing water availability and through the toxicity of NaCl ions (Morin-Sardin et al., 2016; Venâncio et al., 2017). The domestication of fungi for cheese making may thus have led to salt tolerance as adaptation to the blue cheese environment, where salt

FIGURE 3 Growth parameters with differences between the *Penicillium roqueforti* five populations. The same colour code is used as in the other figures: green for the lumber/spoiled food population, orange for the silage population, dark blue for the non-Roquefort cheese population, purple for the Roquefort cheese population and light blue for the Termignon cheese population. The results of the global test for a population effect is given at the top of each panel. Pairwise significant differences are indicated by asterisks. The boxplots represent the median (centre line), the first quartile and third quartile (box bounds), the maximum and minimum excluding outlier points (whiskers), points being the outliers, i.e., with values either below the first quartile minus 1.5 fold the interquartile range or above the third quartile plus 1.5 fold the interquartile range. (a) Optimal temperature, (b) Optimal water activity, (c) Minimal water activity (i.e., the fraction of available water for growth, which decreases for increasing salt concentrations), (d) Minimal pH and (e) Maximal pH.

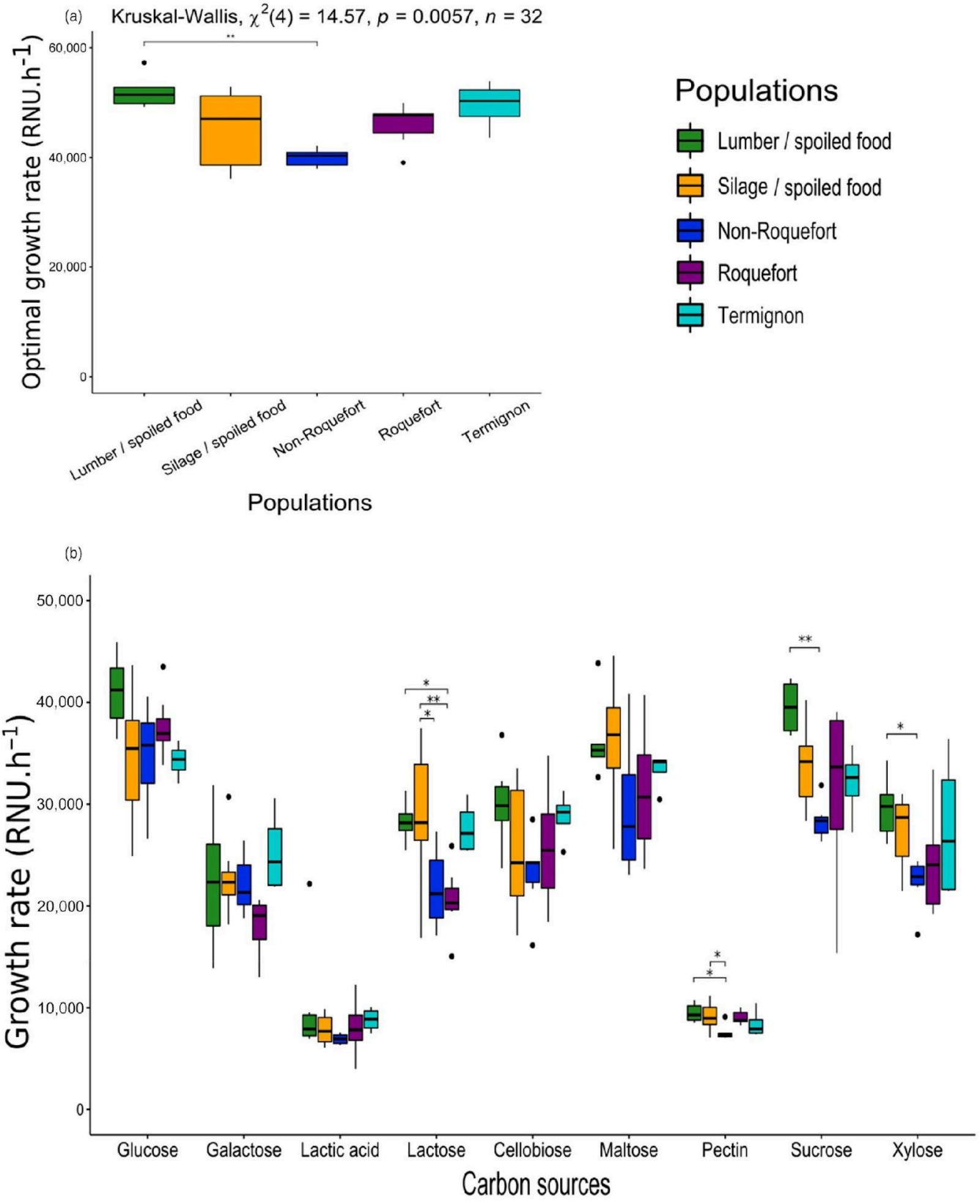


17524571, 2023, 8, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eva.13578 by Cochrane France, Wiley Online Library on [13/10/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License






17524571, 2023, 8, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eva.13578 by Cochrane France, Wiley Online Library on [13/10/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License




concentration is 1.5%–3.5% (El-Bakry, 2012; Hashem et al., 2014). In fact, we found here a higher salt tolerance in the non-Roquefort population than in the other populations. This supports previous findings that showed higher salt tolerance for the non-Roquefort population based on growth experiments on malt agar and cheese-based media (Dumas et al., 2020). The Roquefort and Termignon



17524571, 2023, 8, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eva.13578 by Cochrane France, Wiley Online Library on [13/10/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

FIGURE 4 Differences in growth rate with various carbon sources between the *Penicillium roqueforti* populations. Pairwise significant differences are indicated by asterisks. The same color code is used as in the other figures: green for the lumber/spoiled food population, orange for the silage population, dark blue for the non-Roquefort cheese population, purple for the Roquefort cheese population and light blue for the Termignon cheese population. The boxplots represent the median (centre line), the first quartile and third quartile (box bounds), the maximum and minimum excluding outlier points (whiskers), points being the outliers, i.e., with values either below the first quartile minus 1.5 fold the interquartile range or above the third quartile plus 1.5 fold the interquartile range. (a) Optimal growth rate, i.e., estimated growth rate at the optimal temperature, in potato dextrose broth, obtained from temperature secondary modelling. The results of the global test for a population effect is given at the top. (b) Growth rate in minimal medium with glucose, galactose, lactic acid, lactose, cellobiose, maltose, pectin, sucrose and xylose as sole carbon sources.

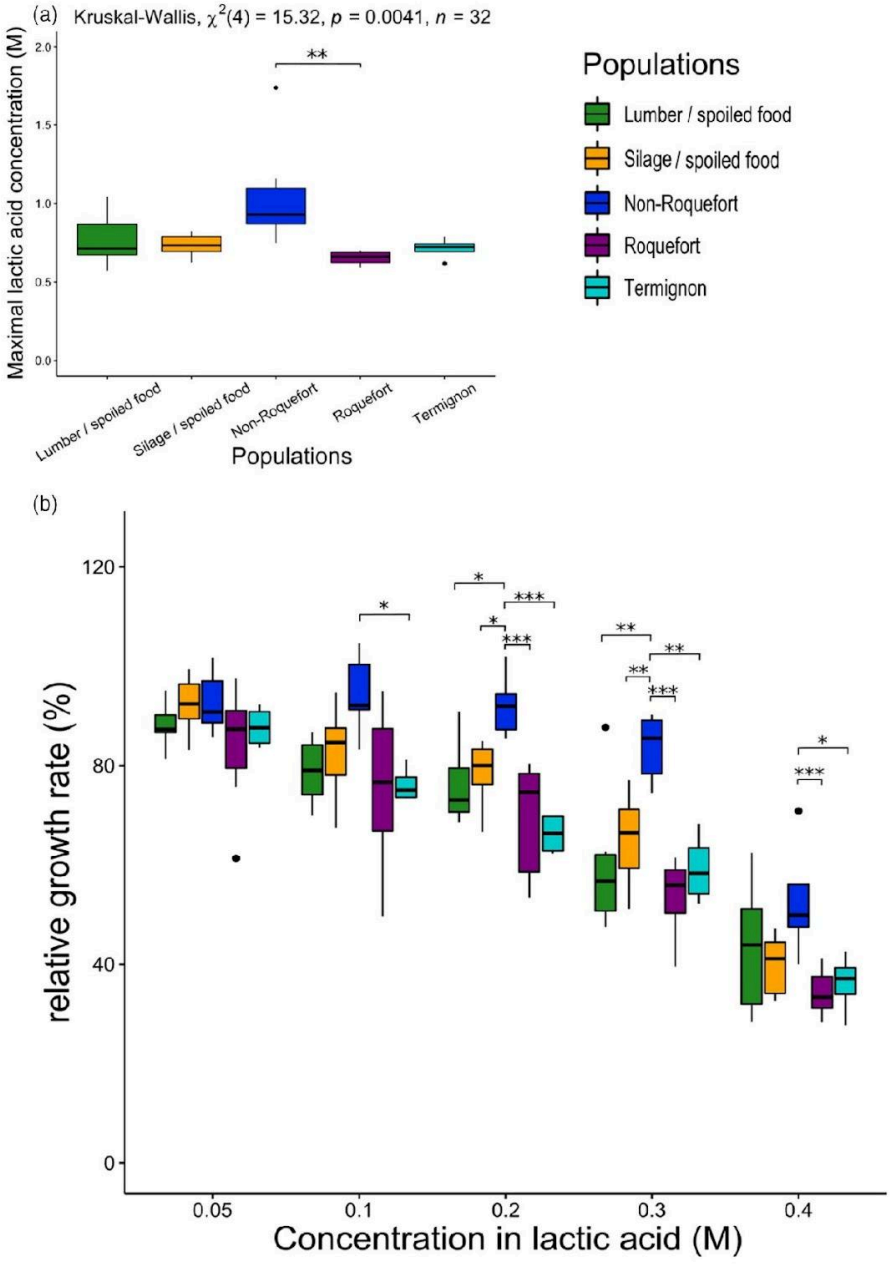



FIGURE 5 Impact of lactic acid on growth parameters between the *Penicillium roqueforti* populations. Pairwise significant differences are indicated by asterisks. The same color code is used as in the other figures: green for the lumber/spoiled food population, orange for the silage population, dark blue for the non-Roquefort cheese population, purple for the Roquefort cheese population and light blue for the Termignon cheese population. The boxplots represent the median (centre line), the first quartile and third quartile (box bounds), the maximum and minimum excluding outlier points (whiskers), points being the outliers, i.e., with values either below the first quartile minus 1.5 fold the interquartile range or above the third quartile plus 1.5 fold the interquartile range. (a) Maximal lactic acid concentrations allowing growth for each of the five *Penicillium roqueforti* populations. The results of the global test for an effect of population maximal lactic acid concentration is given at the top. (b) Relative growth rate with lactic acid concentration for each of the five *Penicillium roqueforti* populations. Relative growth rate corresponds to the observed growth rate normalized by the growth rate without lactic acid.

cheese populations are less salt tolerant than the non-Roquefort population, which is consistent with previous observations showing that the non-Roquefort population exhibits more beneficial traits for commercial cheese production due to stronger selection (Dumas et al., 2020).

We found no particular tolerance for biologically relevant low temperature in the cheese populations, as in previous studies on other *Penicillium* cheese-making fungi (Ropars et al., 2020) or in other fungi used for cheese making, such as *Bisifusarium domesticum* and *Geotrichum candidum* (Bennetot et al., 2023; Savary et al., 2022).



17524571, 2023, 8, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eva.13578 by Cochrane France, Wiley Online Library on [13/10/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

In the *Saccharomyces* yeast genus, different modes of fermentation, at high versus low temperature, have yielded distinct lineages with different optimal temperatures by hybridization between *S. cerevisiae* and *Saccharomyces* cryophilic species (Baker et al., 2019).

The non-cheese populations also exhibited traits that may be beneficial in their ecological niche. The lumber/spoiled food population grew faster in potato dextrose broth and in various plant-derived carbohydrates (e.g., dextrose, sucrose, pectin and xylose). The silage/spoiled food population grew faster in pectin. These sugars are absent in cheese, in which proteins and lipids are instead dominant during ripening (Prieto et al., 2000). The faster growth of the non-cheese populations in plant-derived sugars may correspond to ancestral traits in *P. roqueforti*. Indeed, while no genuinely wild *P. roqueforti* population is known so far, it has been suggested that the ancestral population of the identified cheese and non-cheese populations could be a plant saprophyte or endophyte (Dumas et al., 2020). The carbohydrates used in our assays (e.g., xylose, dextrose, pectin and sucrose) represent important carbon sources in plants (Fukasawa & Matsukura, 2021). Important traits for wild populations can be lost in domesticated fungi due to the degeneration of unused traits or to drastic bottlenecks (Ropars & Giraud, 2022). Domestication in *P. roqueforti* could therefore have resulted in a fitness decrease in carbohydrate-rich media in the cheese populations. This is supported by the finding that the differences in growth rates of the lumber/spoiled food population were significant when compared to the most strongly domesticated cheese population, i.e., the non-Roquefort population. Cheese populations would have lost the ability to optimally use plant-derived sugars for growth and gained the ability to metabolise other nutrients (e.g., proteins and lipids). Cheese populations indeed have faster proteolytic activity and the non-Roquefort population has faster lipolysis than non-cheese populations in synthetic media (Dumas et al., 2020) and in the cheese environment (Caron et al., 2021). Alternatively, the ability to optimally use sugars may have been gained in the silage and the lumber/spoiled food populations as an adaptation to a new, anthropized ecological niche. The lack of identification of any undeniably wild *P. roqueforti* population precludes disentangling the two hypotheses.

The silage/spoiled food and lumber/spoiled food populations grew surprisingly faster in lactose than the Roquefort population. An explanation may be that, while galactose is abundant in milk as a constitutive hexose of lactose, it is also an important sugar in plant cell walls (Gangl & Tenhaken, 2016), which could lead to a selection in non-cheese populations for an efficient degradation of polymers containing galactose. Indeed, the same enzyme (β-galactosidase) is involved in the lysis of lactose and of plant cell wall hemicellulose polymers (e.g., xyloglucan and arabinogalactan proteins), which liberates galactose (Fujita et al., 2019; Gangl & Tenhaken, 2016; Peña et al., 2004). Therefore, the faster growth of the non-cheese population in lactose may be a by-product of an adaptation to hemicellulose degradation. Alternatively, the non-cheese populations may have adapted to the use of lactose, as several strains isolated from spoiled food are also present in these populations (Dumas et al., 2020). In *S. cerevisiae*, the cheese population showed higher growth rate on galactose due to the acquisition, by horizontal gene transfer (HGT), of genes involved in the galactose import and degradation pathway (Legras et al., 2018). In our study, the non-Roquefort population did not exhibit higher efficiency for lactose use, despite the presence of genes involved in lactose import and degradation in the *Cheesyter* region acquired by HGT and only harboured by this population (Ropars et al., 2015).

Fungi can be exposed to various chemical biocides, in particular in crops and in food with preservatives. In laboratory experiments, recurrent exposure to biocides can lead to tolerance evolution (i.e., an increase in average minimum inhibitory concentrations), as shown for tebuconazole in *Aspergillus fumigatus* (Cui et al., 2019) and natamycin in *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium oxysporum*, *Trichosporon asahii* and *Colletotrichum musae* (Streekstra et al., 2016). In *P. roqueforti*, sorbate resistance has been reported in some strains isolated from spoiled food, which has been attributed to the presence of a horizontally transferred region named *SORBUS* (Punt et al., 2022). Here, we studied the impact, on the growth of the different *P. roqueforti* populations, of chemical preservatives used in the food industry (natamycin and sorbate), a fungicide used for crop treatment (tebuconazole) and of a weak organic acid present in cheese (lactic acid resulting from lactose degradation by lactic acid bacteria). We did not detect any significant differences between the populations in terms of tolerance to potassium sorbate, tebuconazole and natamycin. This is consistent with our finding that a single silage strain carried the *SORBUS* region that provides sorbate resistance. This suggests that the selection for such tolerance is not strong in any of the ecological niches of *P. roqueforti* or that evolutionary constraints prevent adaptation.

Cheese and silage are rich in lactic acid due to the metabolism of lactic acid bacteria. We showed that the non-Roquefort population was more tolerant to lactic acid than the other populations, which may be an adaptive trait under cheese ripening conditions. The other cheese populations were less tolerant to lactic acid, while lactic acid is present in all types of cheeses and silage can present higher concentrations in lactic acid than cheese (Bevilacqua & Califano, 1989; Borreani & Tabacco, 2010; Marsili et al., 1981). The higher lactic acid tolerance in the non-Roquefort population may be due to the stronger selection in this lineage, so this lineage has evolved a more extreme phenotype, as shown for other traits in the non-Roquefort population, e.g., salt tolerance, growth on cheese and competitive ability (this study, Dumas et al., 2020; Ropars et al., 2015). An alternative explanation is that lower lactic acid tolerance induces slower growth, which may have been beneficial for blue cheese production before fridges were used (Dumas et al., 2020), so that there may have been no selection for higher lactic acid tolerance in the Roquefort and Termignon populations. Organic acid tolerance has been reported in other domesticated fungi, for example tolerance to acetic acid, formic acid and levulinic acid in *S. cerevisiae* (Gallone et al. Tolerance to sulphite, a microbiocide classically used in wine-making, has also been reported in *S. cerevisiae* (Gallone et al., 2016; Legras et al., 2018) and



17524571, 2023, 8, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eva.13578 by Cochrane France, Wiley Online Library on [13/10/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

in some wine-associated populations of the *Brettanomyces bruxellensis* yeast (Avramova et al., 2018).

## 5 | CONCLUSION

In conclusion, we report here new evidence for contrasting phenotypes between *P. roqueforti* populations, with beneficial traits for cheese making in the cheese populations (in particular higher tolerance to salt, acidic pH and lactic acid in the non-Roquefort population), which supports the inference of domestication in cheese fungi. In addition, we identified a novel *P. roqueforti* population, from non-inoculated French Termignon cheeses, with intermediate traits, substantial genetic diversity and the two mating types. This provides highly promising genetic resources for strain improvement, in addition to being a good model case to study domestication. We also found a more efficient use of various plant-derived carbon sources (in particular pectin, dextrose, xylose and/or lactose) in the silage/spoiled food and lumber/spoiled food populations, suggesting adaptation to anthropized niches, such as stored food and silage, and/or adaptation as saprophytes or endophytes. Among the three cheese populations, we found evidence for different stages of domestication, the non-Roquefort population showing the most differentiated traits, with phenotypes beneficial for cheese making, while the Termignon population appeared phenotypically intermediate between cheese and non-cheese populations. The non-Roquefort population also had the lowest genetic diversity, likely due to strong bottlenecks, which was not the case of the Roquefort population, certainly due to PDO requirements. Such gradual domestication syndromes have previously been reported in the soft-cheese making fungi from the *P. camemberti* clade (Ropars et al., 2020) and in the cheese-making fungus *Geotrichum candidum* (Bennetot et al., 2023). This suggests a protracted domestication process, with ancient, mild domestication, followed by more intensive selection in industrial times, as reported for example in maize (Allaby et al., 2008; Janzen & Hufford, 2016). The modern improvement process leads to a more drastic domestication syndrome, but also to worrying losses of diversity, threatening biodiversity conservation, jeopardising future strain improvement and leading to product uniformity (Vavilov, 2009). Our discovery of a new *P. roqueforti* population with higher diversity and contrasting phenotypes in Termignon cheeses is thus highly valuable for the sustainability of blue-cheese making and for strain improvement.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

ECr performed experiments and analyses on phenotypes. JR, TG and AB collected the Termignon strains. AS performed DNA extraction and MinION sequencing. JR, TC and TG acquired the Termignon genomes. JR, JPV, AB and TC performed the genomic analyses. TG supervised the genomic analyses. JLJ, MC and ECo designed and supervised the experiments and analyses on phenotypes. AB contributed to statistical analyses. ECo, TG and JR obtained funding. ECr, TG and ECo wrote the first draft of the manuscript, with addition by JLJ, MC and JR. All authors revised the manuscript.

### ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by the ANR-19-CE20-0002-02 Fungadapt and ANR-19-CE20-0006-01 Artifice ANR (French National Research Agency) grants. We thank Alodie Snirc and Stephanie Le Prieur for DNA extractions. We thank the GenoToul INRAe platform and the CNRS I2BC platform for genome sequencing.

### CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflicts of interest.

### DATA AVAILABILITY STATEMENT

Genome accession numbers (Illumina reads and new assembly) have been deposited in NCBI under the project PRJNA933571.

### ORCID

*Antoine Branca* https://orcid.org/0000-0001-8475-1386
*Tatiana Giraud* https://orcid.org/0000-0002-2685-6478
*Emmanuel Coton* https://orcid.org/0000-0003-0912-8804

### REFERENCES

Allaby, R. G., Fuller, D. Q., & Brown, T. A. (2008). The genetic expectations of a protracted model for the origins of domesticated crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*, 13982–13986.

Avramova, M., Cibrario, A., Peltier, E., Coton, M., Coton, E., Schacherer, J., Spano, G., Capozzi, V., Blaiotta, G., Salin, F., Dols-Lafargue, M., Grbin, P., Curtin, C., Albertin, W., & Masneuf-Pomarede, I. (2018). *Brettanomyces bruxellensis* population survey reveals a diploid-triploid complex structured according to substrate of isolation and geographical distribution. *Scientific Reports*, *8*, 4136.

Baker, E. P., Peris, D., Moriarty, R. V., Li, X. C., Fay, J. C., & Hittinger, C. T. (2019). Mitochondrial DNA and temperature tolerance in lager yeasts. *Science Advances*, *5*, eaav1869.

Bennetot, B., Vernadet, J.-P., Perkins, V., Hautefeuille, S., Rodríguez de la Vega, R. C., O'Donnell, S., Snirc, A., Grondin, C., Lessard, M.-H., Peron, A.-C., Labrie, S., Landaud, S., Giraud, T., & Ropars, J. (2023). Domestication of different varieties in the cheese-making fungus *Geotrichum candidum*. *Peer Community Journal*, *3*, e45.

Bevilacqua, A. E., & Califano, A. N. (1989). Determination of organic acids in dairy products by high performance liquid chromatography. *Journal of Food Science*, *54*, 1076.

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, *30*, 2114–2120.

Borreani, G., & Tabacco, E. (2010). The relationship of silage temperature with the microbiological status of the face of corn silage bunkers. *Journal of Dairy Science*, *93*, 2620–2629.

Bougeard, S., & Dray, S. (2018). Supervised multiblock analysis in R with the ade4 package. *Journal of Statistical Software*, *86*, 1–17.

Cahier des charges de l'appellation d'origine « Bleu d'Auvergne » homologué par l'arrêté du. (2016). *relatif à l'appellation d'origine protégée «Bleu d'Auvergne», JORF du 22 décembre 2016 (Bulletin officiel No. 2016–53)*. Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt, France.

Cahier des charges de l'appellation d'origine «Bleu du Vercors-Sassenage» homologué par l'arrêté du. (2017). *JORF du 9 novembre 2017 (Bulletin officiel du Ministère de l'agriculture et de l'alimentation No. 2017–46)*. Ministère de l'agriculture et de l'alimentation, France.



17524571, 2023, 8, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eva.13578 by Cochrane France, Wiley Online Library on [13/10/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Cahier des charges de l'appellation d'origine «Roquefort» homologué par l'arrêté du 12 septembre 2017 *relatif à la modification du cahier des charges de l'appellation d'origine protégée « Roquefort », JORF du 20 septembre 2017 (Bulletin officiel du Ministère de l'Agriculture et de l'alimentation No. 2017–39)*. Ministère de l'Agriculture et de l'alimentation, France.

Caron, T., Piver, M. L., Péron, A.-C., Lieben, P., Lavigne, R., Brunel, S., Roueyre, D., Place, M., Bonnarme, P., Giraud, T., Branca, A., Landaud, S., & Chassard, C. (2021). Strong effect of *Penicillium roqueforti* populations on volatile and metabolic compounds responsible for aromas, flavor and texture in blue cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, *354*, 109174.

Chang, P.-K. (2004). Lack of interaction between AFLR and AFLJ contributes to nonaflatoxigenicity of *Aspergillus sojae*. *Journal of Biotechnology*, *107*, 245–253.

Cheeseman, K., Ropars, J., Renault, P., Dupont, J., Gouzy, J., Branca, A., Abraham, A.-L., Ceppi, M., Conseiller, E., Debuchy, R., Malagnac, F., Goarin, A., Silar, P., Lacoste, S., Sallet, E., Bensimon, A., Giraud, T., & Brygoo, Y. (2014). Multiple recent horizontal transfers of a large genomic region in cheese making fungi. *Nature Communications*, *5*, 2876.

Chessel, D., Dufour, A. B., & Thioulouse, J. (2004). The ade4 Package—I: One-table methods. *R News*, *4*, 5–10.

Coton, E., Coton, M., Hymery, N., Mounier, J., & Jany, J.-L. (2020). *Penicillium roqueforti*: An overview of its genetics, physiology, metabolism and biotechnological applications. *Fungal Biology Reviews*, *34*, 59–73.

Cui, N., He, Y., Yao, S., Zhang, H., Ren, J., Fang, H., & Yu, Y. (2019). Tebuconazole induces triazole-resistance in *Aspergillus fumigatus* in liquid medium and soil. *Science of The Total Environment*, *648*, 1237–1243.

Dagnas, S., & Membré, J.-M. (2013). Predicting and preventing mold spoilage of food products. *Journal of Food Protection*, *76*, 538–551.

Declerck, S., D'or, D., Cranenbrouck, S., & Boulengé, L. E. (2001). Modelling the sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi in monoxenic culture. *Mycorrhiza*, *11*, 225–230.

Dray, S., & Dufour, A.-B. (2007). The ade4 package: Implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software*, *22*, 1–20.

Dumas, E., Feurtey, A., Rodríguez de la Vega, R. C., Le Prieur, S., Snirc, A., Coton, M., Thierry, A., Coton, E., Le Piver, M., Roueyre, D., Ropars, J., Branca, A., & Giraud, T. (2020). Independent domestication events in the blue-cheese fungus *Penicillium roqueforti*. *Molecular Ecology*, *29*, 2639–2660.

El-Bakry, M. (2012). Salt in cheese: A review. *Current Research in Dairy Sciences*, *4*, 1–5.

Eschrich, D., Kötter, P., & Entian, K.-D. (2002). Gluconeogenesis in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*, *2*, 315–325.

Ferrero, F., Tabacco, E., Piano, S., Casale, M., & Borreani, G. (2021). Temperature during conservation in laboratory silos affects fermentation profile and aerobic stability of corn silage treated with *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus hilgardii*, and their combination. *Journal of Dairy Science*, *104*, 1696–1713.

Fujita, K., Sasaki, Y., & Kitahara, K. (2019). Degradation of plant arabinogalactan proteins by intestinal bacteria: Characteristics and functions of the enzymes involved. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*, 7451–7457.

Fukasawa, Y., & Matsukura, K. (2021). Decay stages of wood and associated fungal communities characterise diversity–decomposition relationships. *Scientific Reports*, *11*, 8972.

Gallone, B., Steensels, J., Prahl, T., Soriaga, L., Saels, V., Herrera-Malaver, B., Merlevede, A., Roncoroni, M., Voordeckers, K., Miraglia, L., Teiling, C., Steffy, B., Taylor, M., Schwartz, A., Richardson, T., White, C., Baele, G., Maere, S., & Verstrepen, K. J. (2016). Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts. *Cell*, *166*, 1397–1410.e16.

Gangl, R., & Tenhaken, R. (2016). Raffinose family oligosaccharides act as galactose stores in seeds and are required for rapid germination of *Arabidopsis* in the dark. *Frontiers in Plant Science*, *7*. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01115

García-Ríos, E., Morard, M., Parts, L., Liti, G., & Guillamón, J. M. (2017). The genetic architecture of low-temperature adaptation in the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*, *18*, 159.

Gibbons, J. G., Salichos, L., Slot, J. C., Rinker, D. C., McGary, K. L., King, J. G., Klich, M. A., Tabb, D. L., McDonald, W. H., & Rokas, A. (2012). The evolutionary imprint of domestication on genome variation and function of the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Current Biology*, *22*, 1403–1409.

Gillot, G., Jany, J.-L., Coton, M., Le Floch, G., Debaets, S., Ropars, J., López-Villavicencio, M., Dupont, J., Branca, A., Giraud, T., & Coton, E. (2015). Insights into *Penicillium roqueforti* morphological and genetic diversity. *PLoS One*, *10*, e0129849.

Gillot, G., Jany, J.-L., Poirier, E., Maillard, M.-B., Debaets, S., Thierry, A., Coton, E., & Coton, M. (2017). Functional diversity within the *Penicillium roqueforti* species. *International Journal of Food Microbiology*, *241*, 141–150.

Hashem, K. M., He, F. J., Jenner, K. H., & MacGregor, G. A. (2014). Cross-sectional survey of salt content in cheese: A major contributor to salt intake in the UK. *BMJ Open*, *4*, e005051.

Hayward, J. J., White, M. E., Boyle, M., Shannon, L. M., Casal, M. L., Castelhano, M. G., Center, S. A., Meyers-Wallen, V. N., Simpson, K. W., Sutter, N. B., Todhunter, R. J., & Boyko, A. R. (2019). Imputation of canine genotype array data using 365 whole-genome sequences improves power of genome-wide association studies. *PLoS Genetics*, *15*, e1008003.

Hudson, R. R., Slatkin, M., & Maddison, W. P. (1992). Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, *132*, 583–589.

Huson, D. H., & Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, *23*, 254–267.

Janzen, G. M., & Hufford, M. B. (2016). Crop domestication: A sneak-peek into the midpoint of maize evolution. *Current Biology*, *26*, R1240–R1242.

Jiang, T., Gao, C., Ma, C., & Xu, P. (2014). Microbial lactate utilization: Enzymes, pathogenesis, and regulation. *Trends in Microbiology*, *22*, 589–599.

Jørsboe, E., Hanghøj, K., & Albrechtsen, A. (2017). fastNGSadmix: Admixture proportions and principal component analysis of a single NGS sample. *Bioinformatics*, *33*, 3148–3150.

Joubert, A., Calmes*, B., Berruyer, R., Pihet, M., Bouchara, J.-P., Simoneau, P., & Guillemette, T. (2010). Laser nephelometry applied in an automated microplate system to study filamentous fungus growth. *BioTechniques*, *48*, 399–404.

Kiyota, T., Hamada, R., Sakamoto, K., Iwashita, K., Yamada, O., & Mikami, S. (2011). Aflatoxin non-productivity of *Aspergillus oryzae* caused by loss of function in the aflJ gene product. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *111*, 512–517.

Koren, S., Walenz, B. P., Berlin, K., Miller, J. R., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2017). Canu: Scalable and accurate long-read assembly via adaptive *k* -mer weighting and repeat separation. *Genome Research*, *27*, 722–736.

Korneliussen, T. S., Albrechtsen, A., & Nielsen, R. (2014). ANGSD: Analysis of next generation sequencing data. *BMC Bioinformatics*, *15*, 356.

Koster, J., & Rahmann, S. (2012). Snakemake–A scalable bioinformatics workflow engine. *Bioinformatics*, *28*, 2520–2522.

Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with bowtie 2. *Nature Methods*, *9*, 357–359.

Le Marc, Y., Huchet, V., Bourgeois, C. M., Guyonnet, J. P., Mafart, P., & Thuault, D. (2002). Modelling the growth kinetics of listeria as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *International Journal of Food Microbiology*, *73*, 219–237.



17524571, 2023, 8, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eva.13578 by Cochrane France, Wiley Online Library on [13/10/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Lê, S., Josse, J., & Husson, F. (2008). FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software*, *25*, 1–18.

Lee, H., Rankin, S. A., Fonseca, L. M., & Milani, F. X. (2014). Lactose and galactose content in cheese results in overestimation of moisture by vacuum oven and microwave methods. *Journal of Dairy Science*, *97*, 2567–2577.

Legras, J.-L., Galeote, V., Bigey, F., Camarasa, C., Marsit, S., Nidelet, T., Sanchez, I., Couloux, A., Guy, J., Franco-Duarte, R., Marcet-Houben, M., Gabaldon, T., Schuller, D., Sampaio, J. P., & Dequin, S. (2018). Adaptation of *S. cerevisiae* to fermented food environments reveals remarkable genome plasticity and the footprints of domestication. *Molecular Biology and Evolution*, *35*, 1712–1727.

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., & 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, *25*, 2078–2079.

Lorentzen, M. P., Campbell-Sills, H., Jorgensen, T. S., Nielsen, T. K., Coton, M., Coton, E., Hansen, L., & Lucas, P. M. (2019). Expanding the biodiversity of *Oenococcus oeni* through comparative genomics of apple cider and kombucha strains. *BMC Genomics*, *20*, 330.

Marsili, R. T., Ostapenko, H., Simmons, R. E., & Green, D. E. (1981). High performance liquid chromatographic determination of organic acids in dairy products. *Journal of Food Science*, *46*, 52–57.

McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., & DePristo, M. A. (2010). The genome analysis toolkit: A mapreduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, *20*, 1297–1303.

Meyer, R. S., & Purugganan, M. D. (2013). Evolution of crop species: Genetics of domestication and diversification. *Nature Reviews Genetics*, *14*, 840–852.

Morin-Sardin, S., Rigalma, K., Coroller, L., Jany, J.-L., & Coton, E. (2016). Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor* spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese. *Food Microbiology*, *56*, 69–79.

Nei, M., & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *76*, 5269–5273.

Peña, M. J., Ryden, P., Madson, M., Smith, A. C., & Carpita, N. C. (2004). The galactose residues of xyloglucan are essential to maintain mechanical strength of the primary cell walls in *Arabidopsis* during growth. *Plant Physiology*, *134*, 443–451.

Nout, M. J. R. (1995). Useful role of fungi in food processing. In R. A. Samson, E. S. Hoekstra, J. C. Frisvad, & O. Filtenborg (Eds.), *Introduction to food-borne fungi* (pp. 295–303). Centraal Bureau voor Schimmelcultures.

Peter, J., De Chiara, M., Friedrich, A., Yue, J.-X., Pflieger, D., Bergström, A., Sigwalt, A., Barre, B., Freel, K., Llored, A., Cruaud, C., Labadie, K., Aury, J.-M., Istace, B., Lebrigand, K., Barbry, P., Engelen, S., Lemainque, A., Wincker, P., … Schacherer, J. (2018). Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Nature*, *556*, 339–344.

Pfeifer, B., Wittelsbürger, U., Ramos-Onsins, S. E., & Lercher, M. J. (2014). PopGenome: An efficient swiss army knife for population genomic analyses in R. *Molecular Biology and Evolution*, *31*, 1929–1936.

Pinon, A., Zwietering, M., Perrier, L., Membré, J.-M., Leporq, B., Mettler, E., Thuault, D., Coroller, L., Stahl, V., & Vialette, M. (2004). Development and validation of experimental protocols for use of cardinal models for prediction of microorganism growth in food products. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*, 1081–1087.

Pontes, A., Hutzler, M., Brito, P. H., & Sampaio, J. P. (2020). Revisiting the taxonomic synonyms and populations of *Saccharomyces cerevisiae*-phylogeny, phenotypes, ecology and domestication. *Microorganisms*, *8*, 903.

Presser, K. A., Ross, T., & Ratkowsky, D. A. (1998). Modelling the growth limits (growth/No growth Interface) of Escherichia coli as a function of temperature, pH, lactic acid concentration, and water activity. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*, 1773–1779.

Prieto, B., Franco, I., Fresno, M., Bernardo, A., & Carballo, J. (2000). Picon Bejes-Tresviso blue cheese: An overall biochemical survey throughout the ripening process. *International Dairy Journal*, *9*, 159–167.

Punt, M., Seekles, S. J., van Dam, J. L., Adelhart Toorop, C. d., Martina, R. R., Houbraken, J., Ram, A. F. J., Wösten, H. A. B., & Ohm, R. A. (2022). High sorbic acid resistance of *Penicillium roqueforti* is mediated by the SORBUS gene cluster. *PLoS Genetics*, *18*, e1010086.

Ropars, J., Didiot, E., Rodríguez de la Vega, R. C., Bennetot, B., Coton, M., Poirier, E., Coton, E., Snirc, A., Le Prieur, S., & Giraud, T. (2020). Domestication of the emblematic white cheese-making fungus *Penicillium camemberti* and its diversification into two varieties. *Current Biology*, *30*, 4441–4453.e4.

Ropars, J., Dupont, J., Fontanillas, E., Vega, R. C. R. d. l., Malagnac, F., Coton, M., Giraud, T., & López-Villavicencio, M. (2012). Sex in cheese: Evidence for sexuality in the fungus *Penicillium roqueforti*. *PLoS One*, *7*, e49665.

Ropars, J., & Giraud, T. (2022). Convergence in domesticated fungi used for cheese and dry-cured meat maturation: Beneficial traits, genomic mechanisms, and degeneration. *Current Opinion in Microbiology*, *70*, 102236.

Ropars, J., Lo, Y.-C., Dumas, E., Snirc, A., Begerow, D., Rollnik, T., Lacoste, S., Dupont, J., Giraud, T., & López-Villavicencio, M. (2016). Fertility depression among cheese-making *Penicillium roqueforti* strains suggests degeneration during domestication. *Evolution*, *70*, 2099–2109.

Ropars, J., López-Villavicencio, M., Dupont, J., Snirc, A., Gillot, G., Coton, M., Jany, J.-L., Coton, E., & Giraud, T. (2014). Induction of sexual reproduction and genetic diversity in the cheese fungus *Penicillium roqueforti*. *Evolutionary Applications*, *7*, 433–441.

Ropars, J., Rodríguez de la Vega, R. C., López-Villavicencio, M., Gouzy, J., Sallet, E., Dumas, É., Lacoste, S., Debuchy, R., Dupont, J., Branca, A., & Giraud, T. (2015). Adaptive horizontal gene transfers between multiple cheese-associated fungi. *Current Biology*, *25*, 2562–2569.

Rosso, L., Lobry, J. R., Bajard, S., & Flandrois, J. P. (1995). Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*, 610–616.

Rosso, L., Lobry, J. R., & Flandrois, J. P. (1993). An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. *Journal of Theoretical Biology*, *162*, 447–463.

Savary, O., Coton, M., Jany, J.-L., Coroller, L., & Coton, E. (2022). Effect of abiotic factors and culture media on the growth of cheese-associated *Nectriaceae* species. *International Journal of Food Microbiology*, *364*, 109509.

Schink, S. J., Christodoulou, D., Mukherjee, A., Athaide, E., Brunner, V., Fuhrer, T., Bradshaw, G. A., Sauer, U., & Basan, M. (2022). Glycolysis/gluconeogenesis specialization in microbes is driven by biochemical constraints of flux sensing. *Molecular Systems Biology*, *18*, e10704.

Steensels, J., Gallone, B., Voordeckers, K., & Verstrepen, K. J. (2019). Domestication of industrial microbes. *Current Biology*, *29*, R381–R393.

Streekstra, H., Verkennis, A. E. E., Jacobs, R., Dekker, A., Stark, J., & Dijksterhuis, J. (2016). Fungal strains and the development of tolerance against natamycin. *International Journal of Food Microbiology*, *238*, 15–22.

Thioulouse, J., Dray, S., Dufour, A.-B., Siberchicot, A., Jombart, T., & Pavoine, S. (2018). *Multivariate analysis of ecological data with ade4*. Springer.

Vavilov, N. (2009). *Origin and geography of cultivated plants. 1er édition*. Cambridge University Press.

Venâncio, C., Pereira, R., Freitas, A. C., Rocha-Santos, T. A. P., Costa, J. P. d., Duarte, A. C., & Lopes, I. (2017). Salinity induced effects on the

17524571, 2023, 8, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eva.13578 by Cochrane France, Wiley Online Library on [13/10/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

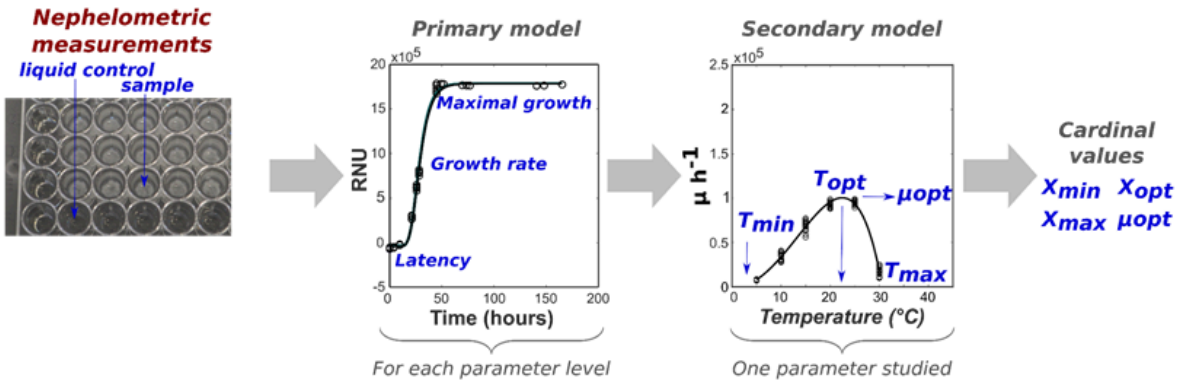
growth rates and mycelia composition of basidiomycete and zygomycete fungi. *Environmental Pollution*, *231*, 1633–1641.
Venturini Copetti, M. (2019). Yeasts and molds in fermented food production: An ancient bioprocess. *Current Opinion in Food Science*, *25*, 57–61.
Walker, B. J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S., Cuomo, C. A., Zeng, Q., Wortman, J., Young, S. K., & Earl, A. M. (2014). Pilon: An integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One*, *9*, e112963.
Watarai, N., Yamamoto, N., Sawada, K., & Yamada, T. (2019). Evolution of *Aspergillus oryzae* before and after domestication inferred by large-scale comparative genomic analysis. *DNA Research*, *26*, 465–472.
Watterson, G. A. (1975). On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology*, *7*, 256–276.
Wayne, R. K. (1986). Limb morphology of domestic and wild canids: The influence of development on morphologic change. *Journal of Morphology*, *187*, 301–319.
Weinberg, Z. G., Szakacs, G., Ashbell, G., & Hen, Y. (2001). The effect of temperature on the ensiling process of corn and wheat. *Journal of Applied Microbiology*, *90*, 561–566.
Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017). Completing bacterial genome assemblies with multiplex MinION sequencing. *Microbial Genomics*, *3*, e000132.
Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & van't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, *56*, 1875–1881.

## SUPPORTING INFORMATION

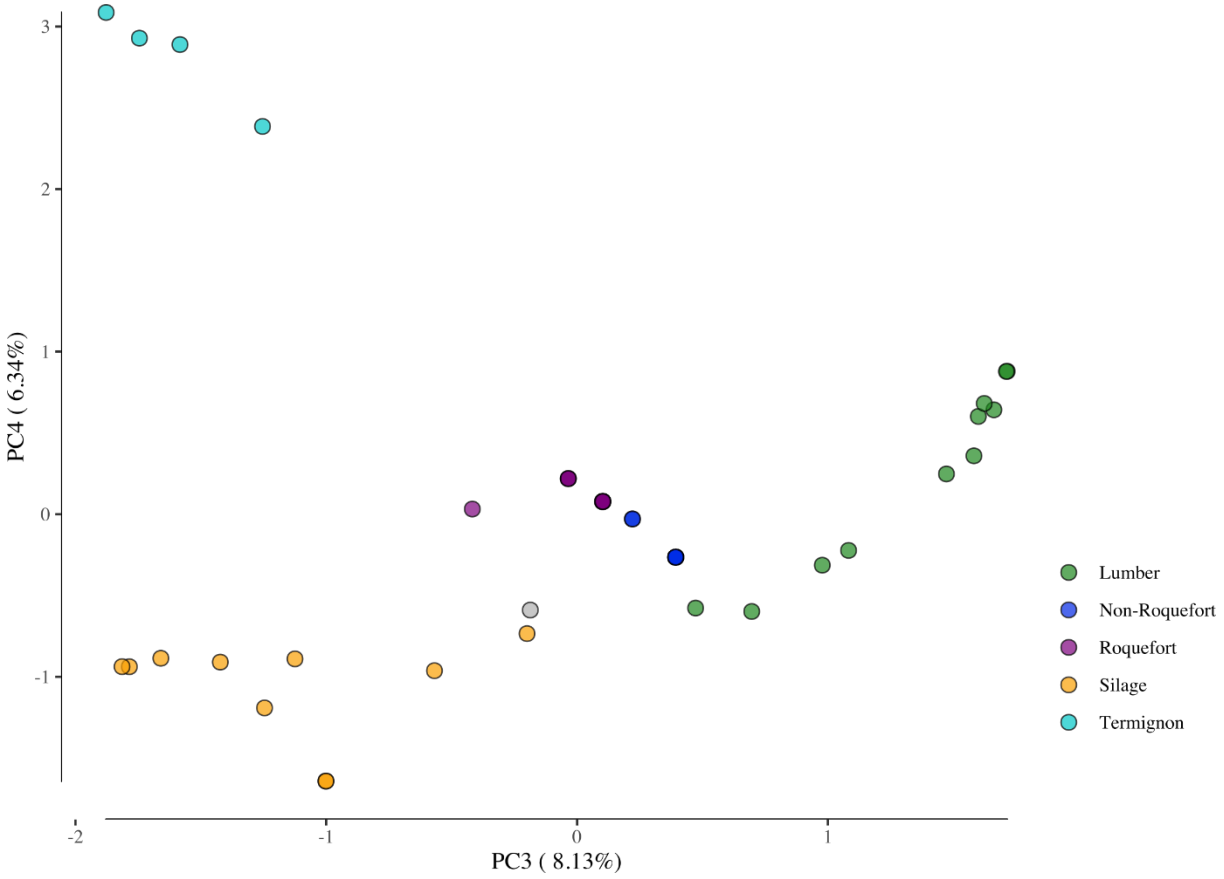
Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** Crequer, E., Ropars, J., Jany, J.-L., Caron, T., Coton, M., Snirc, A., Vernadet, J.-P., Branca, A., Giraud, T., & Coton, E. (2023). A new cheese population in *Penicillium roqueforti* and adaptation of the five populations to their ecological niche. *Evolutionary Applications*, *16*, 1438–1457. https://doi.org/10.1111/eva.13578

17524571, 2023, 8, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eva.13578 by Cochrane France, Wiley Online Library on [13/10/2023]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

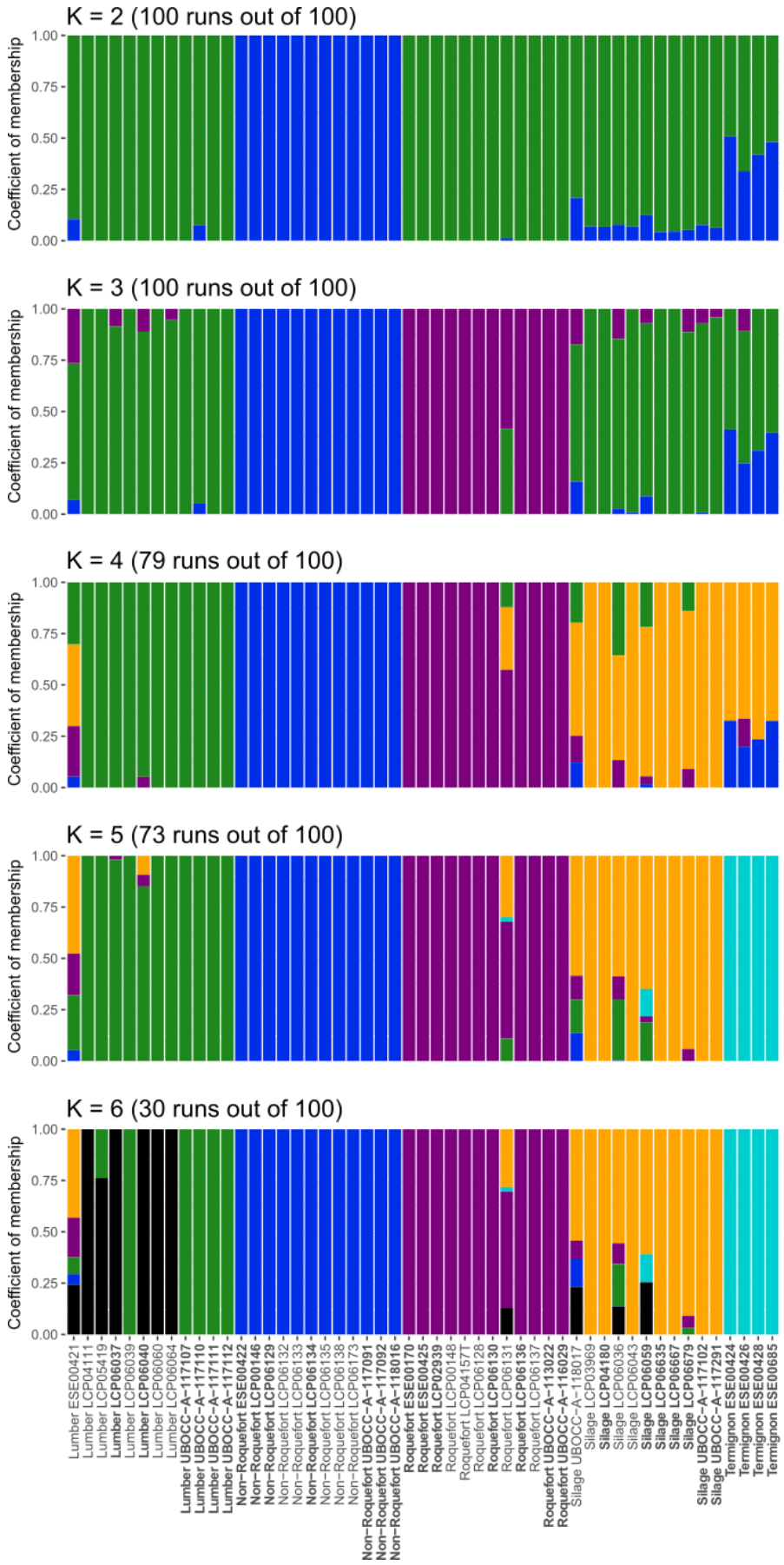



**Supplementary Figure S1: Schematic representation of the experiments performed for testing the impact of different parameters on the growth of the five populations of the blue cheese fungus *Penicillium roqueforti*.** Growth dynamics was measured by laser nephelometry (cell density in liquid), then a primary modeling was applied to fit growth curves and estimate growth parameters (latency, growth rate and maximal growth); then, a secondary modeling was performed to estimate cardinal values (*i.e.* minimal, maximal and optimal values of the considered parameter for growth and the optimal growth, *i.e.*, the growth rate at the optimal value, corresponding to the maximal growth rate.

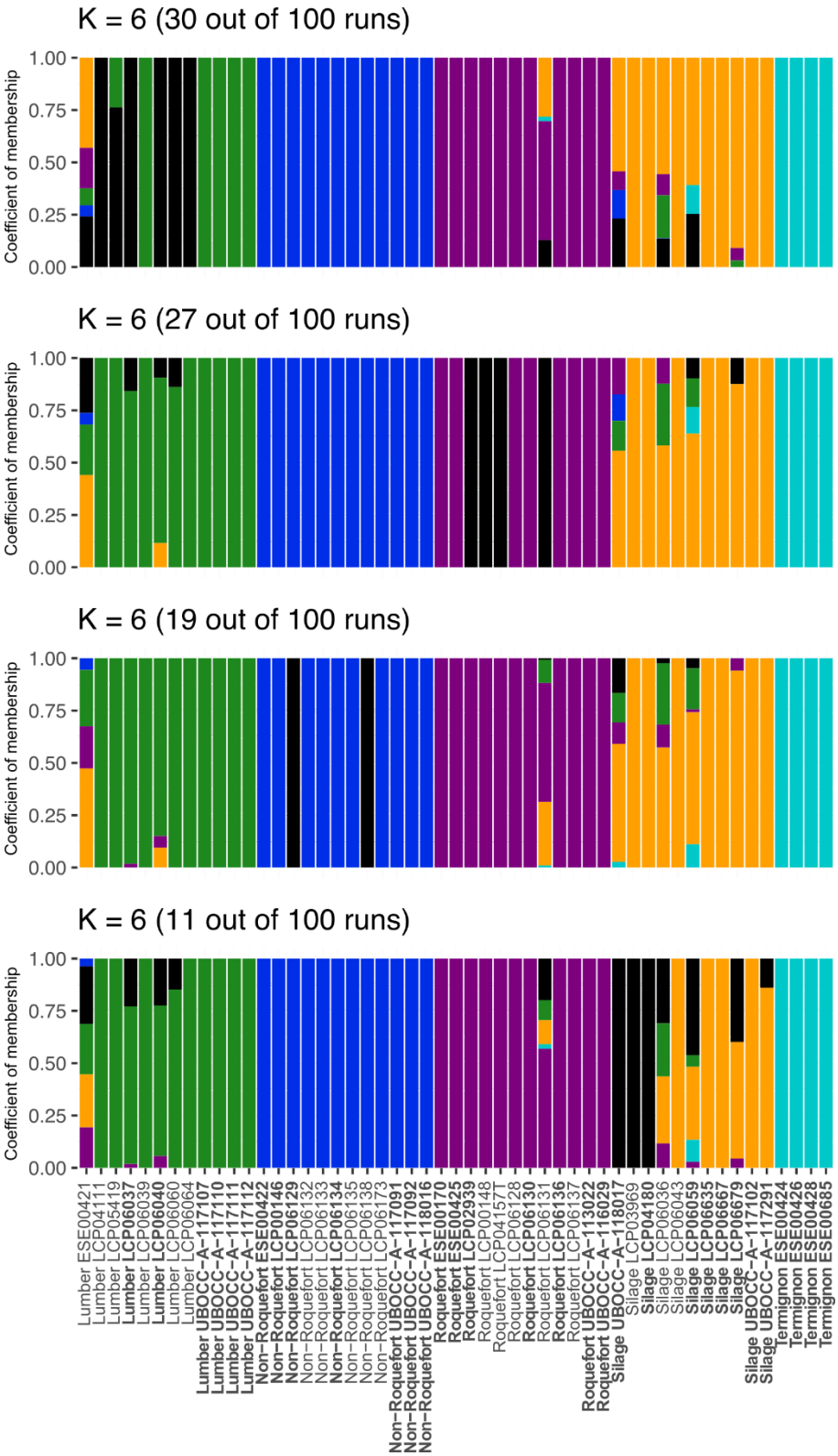



**Supplementary Figure S2: Principal component analysis (PCA) based on 190,387 single nucleotide polymorphisms in the present in the five *Penicillium roqueforti* populations*:* the three cheese populations (Roquefort, non-Roquefort and Termignon) and the two non-cheese populations (silage/food spoiler and lumber/spoiled food).** Dimensions 3 and 4 are shown, with their percentage of explained variation. Point in grew represent the strain unassigned to any population, ESE00421

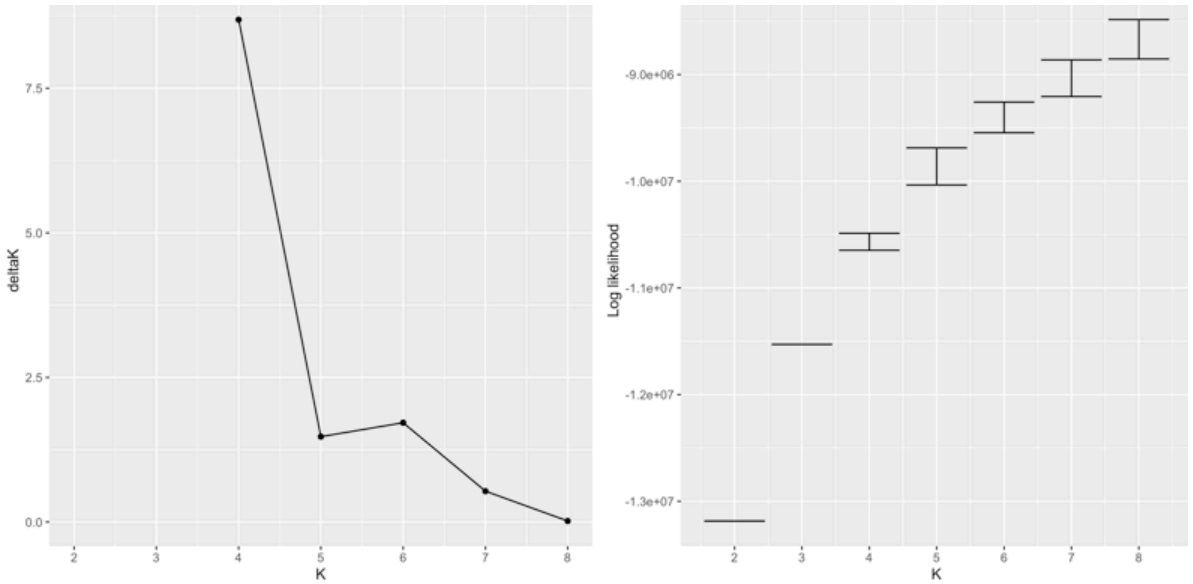
**A**


K = 2 (100 runs out of 100)
K = 3 (100 runs out of 100)
K = 4 (79 runs out of 100)
K = 5 (73 runs out of 100)
K = 6 (30 runs out of 100)
Coefficient of membership
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
Lumber ESE00421
Lumber LCP04111
Lumber LCP05419
Lumber LCP06037
Lumber LCP06039
Lumber LCP06040
Lumber LCP06060
Lumber LCP06064
Lumber UBOCC−A−117107
Lumber UBOCC−A−117110
Lumber UBOCC−A−117111
Lumber UBOCC−A−117112
Non−Roquefort ESE00422
Non−Roquefort LCP00146
Non−Roquefort LCP06129
Non−Roquefort LCP06132
Non−Roquefort LCP06133
Non−Roquefort LCP06134
Non−Roquefort LCP06135
Non−Roquefort LCP06138
Non−Roquefort LCP06173
Non−Roquefort UBOCC−A−117091
Non−Roquefort UBOCC−A−117092
Non−Roquefort UBOCC−A−118016
Roquefort ESE00170
Roquefort ESE00425
Roquefort LCP02939
Roquefort LCP00148
Roquefort LCP04157T
Roquefort LCP06128
Roquefort LCP06130
Roquefort LCP06131
Roquefort LCP06136
Roquefort LCP06137
Roquefort UBOCC−A−113022
Roquefort UBOCC−A−116029
Silage UBOCC−A−118017
Silage LCP03969
Silage LCP04180
Silage LCP06036
Silage LCP06043
Silage LCP06059
Silage LCP06635
Silage LCP06667
Silage LCP06679
Silage UBOCC−A−117102
Silage UBOCC−A−117291
Termignon ESE00424
Termignon ESE00426
Termignon ESE00428
Termignon ESE00685

**B**

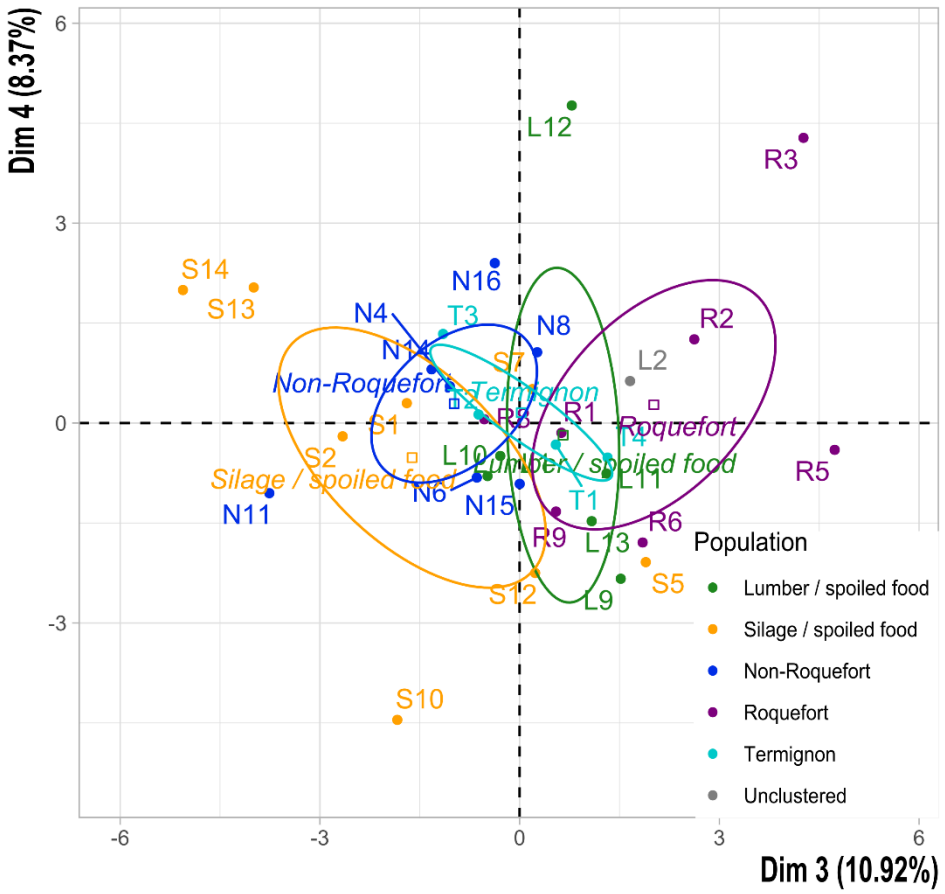

K = 6 (30 out of 100 runs)
K = 6 (27 out of 100 runs)
K = 6 (19 out of 100 runs)
K = 6 (11 out of 100 runs)
Coefficient of membership
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
Lumber ESE00421
Lumber LCP04111
Lumber LCP05419
Lumber LCP06037
Lumber LCP06039
Lumber LCP06040
Lumber LCP06060
Lumber LCP06064
Lumber UBOCC-A-117107
Lumber UBOCC-A-117110
Lumber UBOCC-A-117111
Lumber UBOCC-A-117112
Non-Roquefort ESE00422
Non-Roquefort LCP00146
Non-Roquefort LCP06129
Non-Roquefort LCP06132
Non-Roquefort LCP06133
Non-Roquefort LCP06134
Non-Roquefort LCP06135
Non-Roquefort LCP06138
Non-Roquefort LCP06173
Non-Roquefort UBOCC-A-117091
Non-Roquefort UBOCC-A-117092
Non-Roquefort UBOCC-A-118016
Roquefort ESE00170
Roquefort ESE00425
Roquefort LCP02939
Roquefort LCP00148
Roquefort LCP04157T
Roquefort LCP06128
Roquefort LCP06130
Roquefort LCP06131
Roquefort LCP06136
Roquefort LCP06137
Roquefort UBOCC-A-113022
Roquefort UBOCC-A-116029
Roquefort UBOCC-A-118017
Silage LCP03969
Silage LCP04180
Silage LCP06036
Silage LCP06043
Silage LCP06059
Silage LCP06635
Silage LCP06667
Silage LCP06679
Silage UBOCC-A-117102
Silage UBOCC-A-117291
Termignon ESE00424
Termignon ESE00426
Termignon ESE00428
Termignon ESE00685

**C**

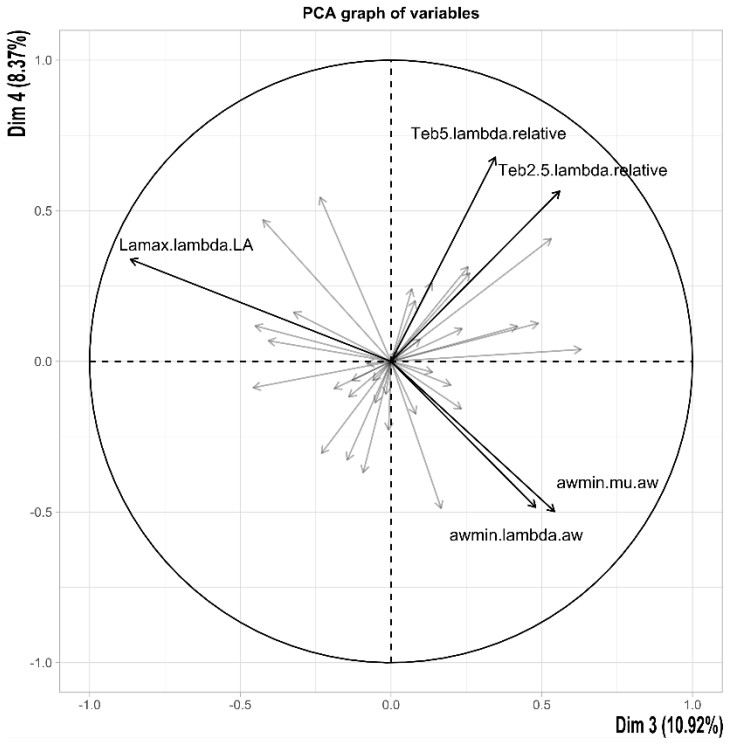



**Supplementary Figure S3: Population subdivision inferred with NGSadmix. A.** Population subdivision inferred for K=2 to 6. Colored bars represent the coefficients of membership in the K gene pools based on genomic data. Each bar represents a strain, its name being indicated at the bottom of the figure. The ID of the strains used for phenotyping are in bold. The barplots represent, for each K value, the solution inferred in the highest percentage of the 100 runs and this percentage is indicated at the top. **B.** Different solutions inferred at K=6, with their percentage among the 100 runs given at the top. **C.** Second order rate of change in the likelihood (ΔK, at left) and log of the likelihood across K values.

**A.**


Dim 4 (8.37%)
Dim 3 (10.92%)
L12
R3
S14
S13
N16
N4
T3
N8
R2
N14
S7
L2
Non-Roquefort
Termignon
R8
R1
Roquefort
S1
T4
S2
L10
Lumber / spoiled food
R5
Silage / spoiled food
N6
L11
N11
N15
T1
R6
R9
L13
S5
S12
L9
S10
Population
Lumber / spoiled food
Silage / spoiled food
Non-Roquefort
Roquefort
Termignon
Unclustered

**B.**


PCA graph of variables
Dim 4 (8.37%)
Dim 3 (10.92%)
Teb5.lambda.relative
Teb2.5.lambda.relative
Lamax.lambda.LA
awmin.mu.aw
awmin.lambda.aw

**Supplementary Figure S4: Principal component analysis (PCA) illustrating the phenotypic differences between *Penicillium roqueforti* populations based on growth response to temperature, water activity (salt), pH, various carbon sources (sucrose, glucose, lactose, galactose, maltose, cellobiose, xylose, starch, pectin and lactic acid) and to exposure to fungal inhibitors (lactic acid, potassium sorbate, tebuconazole and natamycin), with dimensions 3 and 4 shown. A.** A confidence ellipse is drawn for each of the five populations. The percentage of variance explained by the axes are indicated. The same colour code is used as in the other figures: green for the lumber/spoiled food population, orange for the silage population, dark blue for the non-Roquefort cheese population, purple for the Roquefort cheese population and light blue for the Termignon cheese population. The strain IDs are provided in Suppl. Table 1. **B**. Association between the two PCA axes and the variables. Lamax.lambda.LA corresponds to maximal concentration in lactic acid compatible with growth. awmin.lambda.aw and awmin.lambda.aw correspond to minimal water activity (maximal concentration of salt compatible with growth). Teb2.5.lambda.relative and Teb5.lambda.relative correspond to latency with concentration in tebuconazole of 2.5 and 5 mg relative to latency without tebuconazole. See Suppl. Fig. S1 for an illustration of parameter determination.

**Table S1: *Penicillium roqueforti* strains used for population genetic analyses and phenotypic characterisation, with their IDs, assigned genetic cluster, sampling origin and date, genome accession number when available and the article in which they were published.** Lines in bold correspond to the strains used for phenotypic assays.

| Strain code | Short ID | Population | Sampling substrate | Sampling country | Sampling date | Genome accession number | Article source |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **LCP06040** | **L1** | **Lumber / spoiled food** | **Drying Wood** | **France** | **1992** | **ERS1628921** | **Dumas et al, 2020** |
| LCP05419 | L3 | Lumber / spoiled food | Inner fridge wall | France | Unknown | ERS1628917 | Dumas et al, 2020 |
| LCP06039 | L4 | Lumber / spoiled food | Fruit Compote | URSS | 1973 | ERS1628920 | Dumas et al, 2020 |
| LCP04111 | L5 | Lumber / spoiled food | Wood | France | Unknown | ERS1628914 | Dumas et al, 2020 |
| LCP06060 | L6 | Lumber / spoiled food | Sulphite Liquor | Canada | Before 2014 | ERS1628924 | Dumas et al, 2020 |
| LCP06064 | L8 | Lumber / spoiled food | Mouldy baker's yeast | Denmark | Unknown | ERS1628925 | Dumas et al, 2020 |
| **LCP06037** | **L9** | **Lumber / spoiled food** | **Drying Wood** | **France** | **Unknown** | **ERS1628919** | **Dumas et al, 2020** |
| **UBOCC-A-117107** | **L10** | **Lumber / spoiled food** | **Apple** | **Kazakhstan** | **1974** | **SRX19330432** | **This article** |
| **UBOCC-A-117110** | **L11** | **Lumber / spoiled food** | **Soil** | **Russia** | **1982** | **SRX19330433** | **This article** |
| **UBOCC-A-117111** | **L12** | **Lumber / spoiled food** | **Apple** | **Kazakhstan** | **2007** | **SRX19330444** | **This article** |
| **UBOCC-A-117112** | **L13** | **Lumber / spoiled food** | **Wood** | **United Kingdom** | **2007** | **SRX19330448** | **This article** |
| LCP06138 | N2 | Non-Roquefort | Blue Cheese; Cambozola black label | Germany | Unknown | ERS1628936 | Dumas et al, 2020 |
| LCP06173 | N3 | Non-Roquefort | Blue Cheese; Roquefort Vernieres | France | Unknown | SRX19330449 | Dumas et al, 2020 |
| **ESE00422** | **N4** | **Non-Roquefort** | **Feta cheese** | **Australia** | **2014** | **ERS1628932** | **This article** |
| **LCP06134** | **N6** | **Non-Roquefort** | **Blue Cheese; Blue Sunshine** | **USA** | **Unknown** | **ERS1628930** | **Dumas et al, 2020** |
| LCP06132 | N7 | Non-Roquefort | Blue Cheese; Stilton | United-Kingdom | Unknown | ERS1628909 | Dumas et al, 2020 |
| **LCP00146** | **N8** | **Non-Roquefort** | **Blue Cheese; Roquefort** | **France** | **Unknown** | **ERS1628927** | **Dumas et al, 2020** |
| LCP06133 | N9 | Non-Roquefort | Blue Cheese; Roche Montagne | France | 2013 | HG792015-HG792062 | Dumas et al, 2020 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| LCP06135 | N10 | Non-Roquefort | Blue Cheese; Bath Blue Organic | England | Unknown | SRR23393574 | Dumas et al, 2020 |
| **LCP06129** | **N11** | **Non-Roquefort** | **Blue Cheese; Crémeux du Puy** | **France** | **Unknown** | **SRR23393573** | **Dumas et al, 2020** |
| **UBOCC-A-117091** | **N14** | **Non-Roquefort** | **Subglacial water** | **Norway** | **2006** | **SRX19330452** | **This article** |
| **UBOCC-A-117092** | **N15** | **Non-Roquefort** | **Blue Cheese; Bleu du Vercors Sassenage** | **France** | **2016** | **SRX19330453** | **This article** |
| **UBOCC-A-118016** | **N16** | **Non-Roquefort** | **Irrigation water** | **France** | **2016** | **SRX19330454** | **This article** |
| **ESE00424** | **T1** | **Termignon** | **Blue Cheese; Bleu de Termignon** | **France** | **2018** | **PRJNA933571** | **This article** |
| **ESE00426** | **T2** | **Termignon** | **Blue Cheese; Bleu de Termignon** | **France** | **2018** | **SRX19330435** | **This article** |
| **ESE00428** | **T3** | **Termignon** | **Blue Cheese; Bleu de Termignon** | **France** | **2018** | **SRX19330436** | **This article** |
| **ESE00685** | **T4** | **Termignon** | **Blue Cheese; Bleu de Termignon** | **France** | **2015** | **ERS1628934** | **This article** |
| **ESE00170** | **R1** | **Roquefort** | **Peach** | **Unknown** | **2018** | **SAMN33241359** | **This article** |
| **LCP06136** | **R2** | **Roquefort** | **Blue Cheese; Great Hill Blue** | **USA** | **Unknown** | **ERS1628911** | **Dumas et al, 2020** |
| **ESE00425** | **R3** | **Roquefort** | **Blue Cheese; Bleu de Termignon** | **France** | **2018** | **ERS1628928** | **This article** |
| LCP00148 | R4 | Roquefort | Brewery environment | Unknown | Unknown | ERS1628915 | Dumas et al, 2020 |
| **LCP02939** | **R5** | **Roquefort** | **Brioche under plastic wrap** | **Unknown** | **Unknown** | **SRR23393586** | **Dumas et al, 2020** |
| **LCP06130** | **R6** | **Roquefort** | **Blue Cheese; Gorgonzola** | **Italy** | **2013** | **SRX19330439** | **Dumas et al, 2020** |
| LCP04157T | R7 | Roquefort | Blue Cheese; Roquefort | USA | 1987 | ERS1628923 | Dumas et al, 2020 |
| **UBOCC-A-113022** | **R8** | **Roquefort** | **Blue Cheese; Roquefort** | **France** | **2013** | **ERS1628916** | **This article** |
| **UBOCC-A-116029** | **R9** | **Roquefort** | **Atmosphere cave** | **France** | **2016** | **ERS1628913** | **This article** |
| LCP06128 | R12 | Roquefort | Blue Cheese; Roquefort | France | Unknown | SRX19330440 | Dumas et al, 2020 |
| LCP06131 | R13 | Roquefort | Blue Cheese; Roquefort | France | Unknown | SRX19330441 | Dumas et al, 2020 |
| LCP06137 | R14 | Roquefort | Blue Cheese; Roquefort Vernieres | France | Unknown | SRX19330442 | Dumas et al, 2020 |
| **LCP06059** | **S1** | **Silage / spoiled food** | **Silage** | **Netherlands** | **Unknown** | **SRX19330443** | **Dumas et al, 2020** |
| **LCP04180** | **S2** | **Silage / spoiled food** | **Strawberry sorbet** | **France** | **1997** | **SRX19330445** | **Dumas et al, 2020** |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| LCP03969 | S3 | Silage / spoiled food | Fruit Compote | France | 1996 | SRX19330446 | Dumas et al, 2020 |
| **LCP06635** | **S5** | **Silage / spoiled food** | **Silage** | **Belgium** | **2006** | **SRR23393574** | **This article** |
| **LCP06667** | **S7** | **Silage / spoiled food** | **Silage** | **Belgium** | **2007** | **SRR23393573** | **This article** |
| LCP06043 | S8 | Silage / spoiled food | Silage | Belgium | Unknown | SRX19330452 | Dumas et al, 2020 |
| **LCP06679** | **S10** | **Silage / spoiled food** | **Silage** | **Belgium** | **2007** | **SRX19330453** | **This article** |
| LCP06036 | S11 | Silage / spoiled food | Cork Wine Bottle | Belgium | Unknown | SRX19330454 | Dumas et al, 2020 |
| **UBOCC-A-117102** | **S12** | **Silage / spoiled food** | **Silage** | **Belgium** | **2011** | **PRJNA933571** | **This article** |
| **UBOCC-A-117291** | **S13** | **Silage / spoiled food** | **Silage** | **France** | **2017** | **SRX19330435** | **This article** |
| **UBOCC-A-118017** | **S14** | **Silage / spoiled food** | **Flour** | **France** | **2016** | **SRX19330436** | **This article** |
| **ESE00421** | **L2** | **Unassigned** | **Bread** | **France** | **2019** | **SRX19330447** | **This article** |

All strains are in compliance with the Nagoya protocol.

**Supplementary Table S2: Statistics of diversity and of differentiation between the five *Penicillium roqueforti* populations: non-Roquefort cheese (nonRoq), Roquefort cheese (Roq), Termignon cheese (Termignon), lumber/spoiled food (Lumber) and silage/spoiled food (Silage).** The strain ESE00421 was not included for these computations. **A**. Number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) between pairs of populations, that are either fixed (fixed in each population and different between the two populations), identical (fixed and identical between the two populations), private (fixed in one population, polymorphic in the other population) and shared (polymorphic with shared alleles in the two populations). The highest number per column is in bold. **B.** Indices of diversity within populations (Pi and Whatterson's theta) and of differentiation between populations ($F_{ST}$ and $d_{XY}$).

**A**

| **Pair of populations** | **fixed** | **Identical** | **private** | **shared** | **Total** |
|---|---|---|---|---|---|
| nonRoq vs Lumber | 19006 | 918485 | 79755 | 3279 | 102040 |
| Roq vs Lumber | 6595 | 924267 | 68484 | 21179 | 96258 |
| Roq vs nonRoq | 28756 | 949448 | 40619 | 1702 | 71077 |
| Silage vs Lumber | 949 | 878760 | 87491 | 53325 | 141765 |
| Silage vs nonRoq | 8806 | 890465 | 115186 | 6068 | 130060 |
| Silage vs Roq | 3860 | 890296 | 100887 | 25482 | 130229 |
| Termignon vs Lumber | 10499 | 910304 | 81740 | 17982 | 110221 |
| Termignon vs nonRoq | 20645 | 952358 | 44159 | 3363 | 68167 |
| Termignon vs Roq | 19442 | 936511 | 53730 | 10842 | 84014 |
| Termignon vs Silage | 4447 | 885072 | 103299 | 27707 | 135453 |

**B**

| | pi | Watterson's theta |
|---|---|---|
| **non Roquefort** | 1,15E-04 | 1,21E-04 |
| **Roquefort** | 4,03E-04 | 4,07E-04 |
| **Termignon** | 8,69E-04 | 8,46E-04 |
| **Lumber-Spoiled food** | 1,06E-03 | 9,70E-04 |
| **Silage-Spoiled food** | 1,60E-03 | 1,58E-03 |

| Fst | Termignon | Roquefort | Lumber-Spoiled food | Silage-Spoiled food |
|---|---|---|---|---|
| **non Roquefort** | 0,69 | 0,85 | 0,71 | 0,57 |
| **Termignon** | | 0,64 | 0,51 | 0,36 |
| **Roquefort** | | | 0,52 | 0,4 |
| **Lumber-Spoiled food** | | | | 0,25 |

| dxy | Termignon | Roquefort | Lumber-Spoiled food | Silage-Spoiled food |
|---|---|---|---|---|
| **non Roquefort** | 0,00162 | 0,00171 | 0,00197 | 0,00202 |
| **Termignon** | | 0,00181 | 0,00195 | 0,00198 |
| **Roquefort** | | | 0,00151 | 0,00168 |
| **Lumber-Spoiled food** | | | | 0,00177 |

Les tables suivantes, Table S3, S4, et S5 étant trop large, elles n'ont pas été ajoutées dans ce manuscrit, seules leurs légendes sont indiquées. Elles sont disponibles sur la page de l'éditeur de l'article par le lien suivant :

https://onlinelibrary-wiley-com.inee.bib.cnrs.fr/doi/full/10.1111/eva.13578

**Supplementary Table S3: Phenotypic values obtains A**. for each Pencillium roqueforti strains used to compute the principal component analysis and their population assignment, and **B**. population means value with standard deviation (SD) for each phenotypic values. Values are obtained from modeling of growth curve or secondary modeling of the impact of temperature, water activity (salt concentration), pH and lactic acid concentration. For the obtained values from secondary modeling, in bold is indicated if the value was obtained for modeling impact on inverse latency or growth rate. Growth rate values were determined from growth in a minimal medium with glucose, cellobiose, galactose, lactic acid, lactose, maltose, pectin, sucrose, starch or xylose as the sole source of carbon. Impact of potassium natamycin, sorbate and tebuconazole on strain growth is estimated by relative growth rate and relative latency, being growth rate or latency at the inhibitor concentration normalized by growth rate or latency without inhibitor. * - : missing value, (-) : values without unit

**Supplementary Table S5: Anova or Kruskal-Wallis tables of group effect and *post-hoc* test table on growth rate in minimal medium with glucose, cellobiose, galactose, lactic acid, lactose, maltose, pectin, sucrose, starch and xylose.**

**Supplementary Table S6: Anova or Kruskal-Wallis tables of group effect and *post-hoc* test table on relative growth rate and relative latency of P. roqueforti phenotyped strains with natamycin at 1 mg.L-1, potassium sorbate at 0.5 and 1 g.L-1 and tebuconazole at 2.5 and 5 mg.L-1.**

## Principaux résultats

Pour cette première partie, les résultats principaux sont les suivants :

- Description d'une cinquième population chez *P. roqueforti* inféodée à une appellation fromagère, le bleu de Termignon, pour laquelle la moisissure n'est pas inoculée dans les fromages. La population « Termignon » possède une plus forte diversité génétique que les deux autres populations fromagères, les deux types sexuels, ainsi que des régions issues de transferts horizontaux jusqu'à présent uniquement associés à la population fromagère « non-Roquefort », à savoir *CheesyTer* et *Wallaby*.

- Différenciation phénotypique potentiellement en lien avec une adaptation de la population « non-Roquefort » à des conditions associées à la production fromagère, telles que la résistance au NaCl et à l'acide lactique.

- Différenciation phénotypique potentiellement en lien avec une adaptation des populations ensilage et bois de coupe / contamination alimentaire à un spectre large de carbohydrates. Cette adaptation se traduit entre autres par une plus forte croissance de ces populations, en comparaison à celle des populations « non-Roquefort » ou « Roquefort », en présence du glucose, du saccharose, du xylose ou encore du lactose comme seule source de carbone.

# III. Chapitre 2 : Production de métabolites secondaires

## A. Introduction et contribution

Les métabolites secondaires, également appelés métabolites spécialisés, sont des molécules d'importance chez nombre de moisissures pouvant avoir un rôle dans le développement, la survie, la compétition ou les interactions d'un organisme avec sa niche écologique. Des différences de production, qualitatives et/ou quantitatives, entre des populations peuvent donc suggérer des différences de spécialisation des populations en lien avec leurs niches écologiques. Une étape pour savoir si l'adaptation locale des populations se caractérise aussi en termes de production de métabolites secondaires consiste à identifier les métabolites produits par chacune des populations et à les quantifier. Pour cette étude, nous avons utilisé différentes souches issues des cinq populations déterminées afin de répondre au questionnement scientifique suivant :

*Les populations de* P. roqueforti *ont elles des profils de production de métabolites secondaires non-volatiles différents pouvant également être liés à une adaptation locale ?*

Si nous avions envisagé dans un premier temps une approche ciblant des métabolites secondaires sélectionnés a priori (approche ciblée), nous avons élargi notre analyse dans un second temps à un panel plus large de métabolites (approche non-ciblée) afin d'avoir un "corpus" plus large de molécules à comparer. Pour ce faire, des extraits de culture de 44 souches de *P. roqueforti,* choisies de manière aléatoire dans chacune des cinq populations, ont été analysés par HPLC-QTOF MS. Dans un second temps, les extraits de trois souches, permettant de couvrir un large spectre de métabolites (non-ciblés et visualisés sous la forme de pics dans les chromatogrammes) ont également été analysés par UPLC-QTOF MS/MS et HPLC-QTOF MS/MS pour permettre une caractérisation des molécules présentes dans les extraits, notamment, par comparaison avec une banque de données interne enrichie en métabolites fongiques calibrés sur l'UPLC-QTOF MS/MS. Les ions ainsi identifiés chez les trois souches ont été extraits des spectres obtenus pour les 44 souches afin de comparer les niveaux de production entre populations. Pour sept métabolites couramment étudiés chez *P. roqueforti,* à savoir la roquefortine C, l'isofumigaclavine A, l'acide mycophénolique, l'andrastine A, la PR toxine ainsi que deux de ses intermédiaires de production, les érémofortines A et B, nous avons réalisé une quantification à l'aide de gammes d'étalonnage. La voie de production des cinq métabolites finaux ayant été décrite et les génomes des souches étant disponibles, nous avons ensuite comparé les séquences des clusters de gènes de production chez les 44 souches.

Ma contribution dans cette étude a consisté particulièrement dans la réalisation des cultures, l'obtention des extraits, la réalisation des analyses par HPLC-QTOF, la sélection et l'analyse des métabolites non-ciblés, l'analyse statistique, la comparaison des séquences des clusters de production et dans la rédaction de la première version de l'article.

## B. Article

Ces travaux prennent la forme d'un article soumis intitulé : "*Different metabolite profiles across* Penicillium roqueforti *populations associated with ecological niche specialisation and domestication*".

# Different metabolite profiles across *Penicillium roqueforti* populations associated with ecological niche specialisation and domestication

Ewen Crequer[1,3], Emmanuel Coton[1], Gwennina Cueff[1], Johan V. Cristiansen[2], Jens C. Frisvad[2], Ricardo Rodriguez de la Vega[3], Tatiana Giraud[3], Jean-Luc Jany[1], Monika Coton[1*]

[1]Univ. Brest, INRAE, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, F-29280 Plouzané, France

[2]Department of Biotechnology and Biomedicine, Technical University of Denmark, DK-2800 Kgs. Lyngby, Denmark

[3]Université Paris-Saclay, CNRS, AgroParisTech, Laboratoire Ecologie Systématique et Evolution, UMR 8079, Bâtiment 680, 12 route RD 128, 91190 Gif-sur-Yvette, France

*corresponding author: monika.coton@univ-brest.fr

**Abstract**

Fungi are known to produce many chemically diversified metabolites, yet their ecological roles are not always fully understood. The blue cheese making fungus *Penicillium roqueforti* thrives in different ecological niches and is known to produce a wide range of metabolites, including mycotoxins. Three *P. roqueforti* populations have been domesticated for cheese production and two populations thrive in other anthropized environments, i.e., spoiled food, lumber and silage. Here, we looked for differences in targeted and untargeted metabolite production profiles between populations using HPLC-HR-Q-TOF and UHPLC-Q-TOF-HR-MS/MS. The non-cheese populations produced several fatty acids and different terpenoids, lacking in cheese strains. The Termignon cheese population displayed intermediate metabolite profiles between cheese and non-cheese populations, as previously shown for other traits. The non-Roquefort population, the cheese population with the strongest domestication syndrome, produced the lowest quantities of measured metabolites, including known mycotoxins such as mycophenolic acid (MPA), andrastin A and PR toxin. Its inability to produce MPA was due to a deletion in the *mpaC* gene, while a premature stop codon in ORF 11 of the PR toxin gene cluster explained its absence and the accumulation of its eremofortins A & B intermediates. In the Roquefort population, we detected no PR toxin nor eremofortins A or B, but found no indel or frameshift mutation, suggesting downregulation. Our results suggest that domesticated cheese populations were selected for lower toxin production while populations from other anthropized environments maintained high metabolite diversity, the bioactivities of these compounds being likely important in these ecological niches.

**Keywords:** fungal metabolites, metabolomics, secondary metabolites, mycotoxins, domestication, adaptation, food safety

## Introduction

Fungi are known to produce a wide range of chemically diversified metabolites in nature, that are key for fungal development, interactions, survival and/or warfare with other microorganisms in complex ecosystems. These metabolites include toxins, antimicrobial compounds, bioactive compounds, e.g antibiotics, anti-cancer and immunosuppressants, as well as molecules involved in communication or protection from UV damage (Keller 2019; Stroe et al. 2023). The role of metabolites is however still not fully understood and identifying different metabolite profiles in populations thriving in distinct niches may contribute to our understanding of their ecological role.

*Penicillium roqueforti* is a highly interesting filamentous fungus from an ecological point of view, as it colonises a multitude of niches thus highlighting its ability to adapt to different environments. This species is especially well known worldwide for its beneficial role in blue cheese production (Gillot et al. 2015, 2017b; Dumas et al. 2020), but has also been isolated from lumber and found as a common contaminant in silage or food products like dairy, fruits and bakery (Pitt and Hocking 2009; Crequer et al. 2023). *P. roqueforti* produces many chemically diverse metabolites, including many so called secondary metabolites, now rather referred to as specialised metabolites, with known bioactive properties. Some of these metabolites correspond to mycotoxins, the most toxic being the aristolochene-derived sesquiterpene PR toxin (*P. roqueforti* toxin), which can be a threat to feed and food safety. For example, PR toxin in silage causes liver toxicity or subacute symptoms in livestock (Gallo et al. 2015; Hymery et al. 2017; Dubey et al. 2018). In cheese, PR toxin is considered unstable (Scott and Kennedy 1976) and apparently degraded to PR imine (Siemens and Zawistowski 1993), a molecule with lower toxicity (Hymery et al. 2014). *P. roqueforti* also produces the alkaloid mycotoxin roquefortine C (ROQ C) and meroterpenoid compound mycophenolic acid (MPA), which can be found in various cheeses in a wide range of concentrations (Scott and Kennedy 1976; Lafont et al. 1979; Engel et al. 1982; Finoli et al. 2001; Kokkonen et al. 2005; Usleber et al. 2008; Fontaine et al. 2015). These compounds have relatively low cytotoxic effects compared to other mycotoxins with regulatory limits in foods in the EU (European Union), such as aflatoxins, ochratoxin A or patulin (Commission Regulation EU N° 2023/905) (Fontaine et al. 2016). Mycophenolic acid is even widely used in the medical field as a treatment to prevent organ transplant rejection. Andrastin A (AND A) is another *P. roqueforti* meroterpenoid of interest, with promising anticancer activity (Nielsen et al. 2005). Additional metabolites may also have contributed to *P. roqueforti* adaptation to its environment, *e.g.* clavines, terpenoids, alkaloids or peptides. For example, two tetrapeptides, Phe-Val-Val-Phe and Phe-Val-Val-Tyr, likely have potential antimicrobial properties (Hammerl et al. 2019). Studying the differences in metabolite production between *P. roqueforti* populations may help gain a more general understanding of their ecological role in diverse niches.

Five populations have indeed been identified in *P. roqueforti*, corresponding to three cheese populations and two non-cheese populations (Dumas et al. 2020; Crequer et al. 2023). A first cheese population, called non-Roquefort, corresponds to a clonal lineage (Dumas et al. 2020), and is used worldwide for the production of most kinds of blue cheeses (*e.g.* Gorgonzola, Cabrales, Stilton and Danablue). This population presents numerous beneficial traits for large-scale cheese making, such as higher salt and lactic acid tolerance, faster growth on cheese and faster lipolysis (Dumas et al. 2020; Caron et al. 2021; Crequer et al. 2023). A second cheese population is mainly associated with the Roquefort protected designation of origin (PDO) (Gillot et al. 2015; Dumas et al. 2020). This Roquefort population harbours a bit more genetic diversity and displays traits beneficial for cheese making following more traditional processes, such as longer conservation and culture on bread (Dumas et al. 2020). More recently, a third cheese population was identified, in Termignon blue cheeses that are not inoculated with *P. roqueforti* spores, that instead spontaneously colonise these specific cheeses in the French Alps from the environment. These Termignon strains exhibit intermediary phenotypic traits between the cheese and non-cheese populations and likely correspond to descendants of an ancient domesticated population with mild domestication syndrome (Crequer et al. 2023). Two genetically different non-cheese populations have been identified, one mostly associated with silage, as well as to a lesser extent spoiled food, and the other with spoiled food and lumber (Dumas et al. 2020). These populations have much higher genetic diversity than the cheese populations and have differentiated from each other more recently than from the cheese populations (Dumas et al. 2020).

These genetically differentiated populations of *P. roqueforti* thriving in different environments constitute a great model for studying adaptation to different substrates and in particular the potential ecological roles of the metabolites they produce, in cheese versus other anthropized environments. The non-Roquefort and Roquefort cheese populations result from two different domestication events (Dumas et al. 2020), in the context of more industrial and more traditional production processes, respectively, so that selection on metabolite production or the underlying genetic mechanisms may have been different. Here, we therefore compared the metabolite production profiles between the five *P. roqueforti* populations using targeted (for seven known metabolites, including mycotoxins) and untargeted metabolomics. We also explored the genetic mechanisms underlying the differences using available genomes.

## 2. Material and methods

### Strain collection and conidium suspension preparation

For metabolite profiling, we randomly chose 44 strains from the five known *P. roqueforti* populations (Dumas et al. 2020; Crequer et al. 2023): twelve strains from the non-Roquefort population, eight from the Roquefort population and ten from each of the lumber/spoiled food and the silage/spoiled food populations. We also used the four available strains sampled from Termignon blue cheeses. All strains

are available in the ESE (Ecology Systematics and Evolution, Paris Saclay university) or UBOCC (https://nouveau.univ-brest.fr/ubocc/fr) culture collections (Suppl. Table S1).

Conidium suspensions were prepared for the various experiments by cultivating the fungal strains for six days at 25°C on potato dextrose agar (PDA, Difco, Fisher Scientific). Two mL of Tween 80 (0.045 %, v/v) were then added on each plate and conidia were scraped off the surface. Conidium concentrations in the suspensions were estimated using Malassez cells and adjusted to $5.10^5$ conidia.mL$^{-1}$ with Tween 80, in 20% glycerol. Suspensions were then stored at -80°C for cultures for metabolite extraction.

**Metabolite extraction**

For metabolite production measurements, we grew fungal cultures in 24-well sterile microplates containing two mL of yeast extract sucrose (YES) agar medium buffered at pH 4.5 with phosphate-citrate buffer and characterised by a high C/N ratio that increases metabolite production in *Penicillium* fungi (Frisvad and Filtenborg 1983). For each strain, 2 µL of the previously prepared spore suspension was inoculated in the centre of the well. Six replicates per strain were performed, three for secondary metabolite analyses and three for fungal dry-weight measurements. In the latter case, growth was performed on cellophane disks to collect fungal mycelium. The plates were incubated at 25°C in the dark for ten days and then stored at -20°C until metabolite profiling. For metabolite extractions, we used an optimised high-throughput extraction method (Gillot et al. 2017b; Lo et al. 2023). After thawing, we homogenised 2 g aliquots (the entire YES culture with mould obtained from a well) with a sterile flat spatula, to which we added 12.5 mL of acetonitrile (ACN) supplemented with 0.1% formic acid (v/v); samples were then vortexed for 30 sec followed by 15 min sonication. Extracts were again vortexed before centrifugation for 10 min at 5000 g at 4°C. The supernatants were directly collected and filtered through 0.45 µm polytetrafluoroethylene membrane filters into amber vials and stored at -20°C until analysis.

*Targeted secondary metabolite detection and quantification*

Targeted secondary metabolite characteristics used for quantifications are given in Table S3 and included commercially available extrolites produced by *Penicillium* species: andrastin A (AND A), eremofortins A & B (ERE A & B), (iso)-fumigaclavine A (FUM A), mycophenolic acid (MPA) and roquefortin C (ROQ C). AND A, ERE A & B and FUM A standards were obtained from Bioviotica (Goettingen, Germany), and others from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). All stock solutions were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) at 1 mg.mL$^{-1}$ in amber vials. For these analyses, metabolite identification was performed using both the mean retention time ± 1 min and the corresponding ions listed in (Supp. Table S2). We used a matrix-matched calibration curve for reliable

secondary metabolite quantification with final concentrations ranging from 1 to 10000 $ng.mL^{-1}$ according to the target metabolite and method performance was carried out as previously described (Gillot et al. 2017b). All metabolite concentrations were determined using the Agilent MassHunter Workstation Software (Agilent Technologies, Sanat Clara, CA, USA) with a linear regression model. Specific mycotoxin production was expressed as ng per g of extracted matrix and mg of fungal dry weight ($ng.g^{-1}.mg^{-1}$). For PR toxin, a purified solution with unknown concentration was previously obtained (Gillot et al. 2017b) and diluted 1X, 2X, and 5X (taking into account matrix effect) to ensure peak separation and determine the detection limit. According to International Council for Harmonisation guidelines (ICH Harmonized Tripartite Guideline, 2005), detection limit and quantification limit of each metabolite was obtained by multiplying the standard deviation of y intercepts of regression lines divided by the slope, by 3.3 and 10, respectively. Means per strain across replicates (supp. Tables S3 and S4) were used to compare populations. Electrospray ionization (+/-) modes were both systematically performed on all samples. Method performance characteristics were obtained for the seven targeted metabolites prepared in blank extraction of YES medium and all seven metabolites were eluted at different retention times including MPA and PR toxin known to have a quantifying ion with the same mass (m/z 321.13; Supp. Table S2). Linearity ($R^2$) for each standard curve was determined to be above 0.982 (Supp. Table S2) for all metabolites in electrospray ionisation positive mode, ESI +, with better performance for detection in ESI + than ESI -.

Targeted analyses were performed on an Agilent 6530 Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight mass spectrometry system equipped with a binary pump 1260 and degasser (Q-TOF LC/MS), well plate autosampler set to 10°C and a thermostatted column compartment. Filtered 2 µL aliquots were injected into a ZORBAX Extend C-18 column (2.1x50 mm and 1.8 µm, 600 bar) maintained at 35°C with a flow rate set to 0.3 $mL.min^{-1}$. The mobile phase A contained milli-Q water + 0.1% formic acid (v/v) and 0.1% ammonium formate (v/v) while mobile phase B was ACN + 0.1% formic acid. Mobile phase B was maintained at 10% for 4 min followed by a gradient from 10 to 100% for 36 min. Then, mobile phase B was maintained at 100% for 5 min before a 5 min post-time. Samples were ionised in both positive (ESI+) and negative (ESI-) electrospray ionisation modes in the mass spectrometer with the following parameters: capillary voltage 4 kV, source temperature 325°C, nebulizer pressure 50 psig, drying gas 12 $L.min^{-1}$, ion range 100-1000 m/z.

*Untargeted metabolite analysis, data processing and metabolite identifications*

*UHPLC-Q-TOF-HRMS/MS analysis*

We also used an untargeted metabolomics approach with an ultra-high-performance liquid chromatography - diode array detection - quadrupole time of flight mass spectrometry (UHPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS) during metabolite profiling on three *P. roqueforti* extracts, the lumber

L6, Roquefort R3 and Termignon T4 strains (biological triplicates). These extracts were selected based on the above mentioned targeted LC-QTOF analyses as they also displayed multiple unknown compounds and the three extracts covered the full spectrum of these observed unknown metabolites.

We detected metabolites using an Agilent 6545 Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) MS equipped with an UHPLC Agilent Infinity 1290 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA,502 USA) including a diode array detector. Separation was done on a Poroshell 120 Phenyl Hexyl column (150 × 2.1 mm i.d., 1.9 µm; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) maintained at 40°C. Samples injected (1 µL) were eluted with a flow rate set to 0.35 mL min−1 using a linear gradient increasing from 10% acetonitrile (LC-MS grade) in Milli-Q water supplemented with 20 mM formic acid to 100% over the first 10 min, maintaining 100% for 2 min before decreasing back to 10% in 0.1 min and holding initial conditions for 3 min before the next run. The Agilent accurate-mass 6530 Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) liquid chromatography/mass spectrometer (LC/MS) system was equipped with an Agilent Dual Jet Stream electrospray ion source (ESI) with a drying gas temperature set to 250°C and flow of 12 $L.min^{-1}$. Samples were ionised in positive (ESI+) electrospray ionisation modes in the mass spectrometer with the following parameters: capillary voltage 4 kV, nozzle voltage 500 V, ion range 100-1000 m/z and auto MS/MS fragmentation at three collision energies (10, 20 and 40 eV). The acquisition rate was set to 10 spectra per second and MS spectra were recorded as centroid data. Reference masses (two [M+H]+ ions were: 186.2216 and 922.0098) were injected in the second sprayer using a supplementary LC pump at 15µl.min-1 flow rate using a 1:100 splitter.

*LC-MS/MS data processing*

The generated mass spectrometry (MS) data, recorded as centroid data, were analysed using both an in-house library search with the Agilent MassHunter PCDL manager and MZmine3, GNPS (global natural product social molecular networking*)* and SIRIUS tools available on GitHub (https://github.com). For MZmine3 analyses, centroid data were converted into the community standard for mass spectrometry data, mzML, using the ProteoWizard software (version 3.0.22112, MSConvert tool) (Martens et al. 2011; Chambers et al. 2012). MZmine3 software (Schmid et al. 2023) was then used to process mzML files and the batch file that was created included the different processing steps as feature detection, deconvolution and filtering. The final feature quantification table, exported in the MGF (mascot generic format) standard format, was used in the GNPS Networking web-based mass spectrometry ecosystem (https://gnps.ucsd.edu/) to generate a molecular network for feature determinations using Cytoscape v3.9.1 (https://cytoscape.org/) and SIRIUS 5.6.3 (https://bio.informatik.uni-jena.de/software/sirius/; (Dührkop et al. 2019)) softwares for further downstream analyses and chemical family predictions and/or identifications.

After data processing of UHPLC-Q-TOF-MS/MS spectra, the LC-Q-TOF/MS spectra for the same three strains were also analysed using SIRIUS 5.6.3 (Dührkop et al. 2019) and the two data sets were compared to match both data sets together (*i.e.* identify common ions), determine putative formulas

and compare MS-MS spectra against databases available in SIRIUS to predict the metabolite family and, when possible, identify metabolites. This comparison allowed us to then transpose this data to all the generated metabolite data and extract identified ion peak areas from all LC-Q-TOF spectra. We were therefore able to obtain the metabolite production profile per strain, which was used to compare metabolite production profiles between populations. Control samples were also included, corresponding to the blank YES medium (no mould); it was used to extract and distinguish compounds produced by strains from compounds originally present in the medium.

**Statistical analyses**

Statistical analyses for testing differences in metabolite production between populations were performed using the R software (version 4.2.1, https://www.r-project.org/). Shapiro-Wilk and Bartlett tests (package *rstatix*, R) were performed to assess normality and homoscedasticity of residuals in each population. If the data, the racine-transformed data or the log-transformed data did not deviate from normality, populations were compared using ANOVA type I and Tukey tests were used as *post-hoc* tests. If the data, the log-transformed data and square-root transformed data significantly deviated from normality, a Kruskall-Wallis test was performed on raw data to compare populations, followed by Dunn tests as *post-hoc* tests (Suppl. Table S5).

**Comparative analysis of secondary metabolite biosynthetic gene clusters**

In order to study the targeted metabolite biosynthetic gene clusters, we used the annotations of the LCP06136 (Caron, *et al.*, 2024) and FM164 reference genomes (genbank accession numbers GCA_000513255.1), and we used the genomes of all other strains analysed here that were previous assembled from Illumina data (Dumas et al. 2020; Crequer et al. 2023). We lifted the annotations of the known gene clusters controlling the production of the studied metabolites, MPA, PR toxin, FUM A, AND A and ROQ C, from the two reference genomes to the Illumina genomes (accession numbers in Table S1), for all the phenotyped strains, using *liftoff* v1.6.3 (Shumate and Salzberg 2021). Protein sequences and coding DNA sequences (CDS) of each gene were extracted from each genome using *gffread* v0.12.1 (Pertea and Pertea 2020). Reference gene annotation used corresponded to the annotation with the longest CDS, to be conservative regarding the likelihood to detect complete genes. Protein and CDS sequences were aligned using *mafft* v7.475 (Katoh and Standley 2013) and analysed using *Jalview* 2.11.2.0 (Waterhouse et al. 2009; Troshin et al. 2018).

## 3. Results

**Metabolite profiles are different between *P. roqueforti* populations**

We performed targeted and untargeted LC-Q-TOF metabolite profiling on 44 *P. roqueforti* strains from the five identified *P. roqueforti* populations (Suppl. Table 1), and identified metabolites of interest using in-house local databases or *in silico* Global Natural Products Social Molecular Networking

(GNPS) molecular networks and SIRIUS classification. Based on local databases, we identified 16 metabolites (Table 1): agroclavine, AND A, FUM A, MPA-associated molecules (MPA, MPA isomer, homo MPA, MPA prenyl and MPA IV), roquefortines C and D, PR toxin, eremofortins A and B, and tetrapetides, i.e., cyclo(Phe-Val-Val-Phe), Phe-Val-Val-Phe and Phe-Val-Val-Tyr. We also predicted the chemical classes for 20 other metabolites, including eight fatty acids, among which some fatty acid amides (*e.g.* putative lauryldiethanolamine), 11 terpenoids, among which a putative eremofortin C, and one alkaloid (putative festuclavine), while 11 others remained as unknown metabolites (Table 1).

While some metabolites were produced by all strains in all five *P. roqueforti* populations, others varied either qualitatively or quantitatively. Principal component analysis (PCA) performed on all 47 metabolites separated the different *P. roqueforti* populations (Figure 1). The two first dimensions explained 45.94% of the variation, while dimensions 3 and 4 explained 17.5% of the variance. The first dimension separated the cheese populations from the non-cheese populations. Dimension 1 was positively associated in particular with PR toxin, AND A, fatty acids and terpenes, and negatively associated with ROQ C and D, and Phe-Val-Val-Phe. The second PCA dimension mainly separated the non-Roquefort population from the two other cheese populations based on positive associations with ERE A & B, fatty amide 2 and terpene 3 and negative ones with MPA and MPA-associated metabolites (MPA isomer, homo MPA, MPA prenyl and MPA IV), as well as the unknown molecules 4, 8, 11, 16, 17 and 19. The third PCA axis separated the Roquefort populations from all other populations (Figure 1) and was positively associated with ROQ C, ROQ D and the unknown metabolites 19, 20 and 21. The fourth dimension separated the silage/spoiled food population from the other ones and was positively associated with several fatty acids (*e.g.* 1, 5, 7 and 9 and putative lauryldiethanolamine).

**Distinct differences in metabolite profiles between cheese and non-cheese populations**

The metabolite profiles were indeed strikingly different between the cheese and non-cheese populations. The most toxic mycotoxin produced by *P. roqueforti,* PR toxin, was produced only by non-cheese strains (except a slight production in the Termignon population) and in highest quantities by the lumber/spoiled food population (Figure 2A). The non-cheese populations also displayed higher production of the meroterpenoid AND A (Figure 4B), diverse fatty acids, the isofumigaclavine A intermediate, festuclavine (Suppl. Figure 1 B), the unknown compounds 2 and 3 (Suppl. Figure 4 A & B), the terpenes 5 (Suppl. Figure 3 E) and 11 (Figure 2B), as well as other terpenes. In contrast, cheese populations produced very low or even no detectable amounts of these metabolites (Fig 3, Supp Figure 3). In particular, the fatty acids 1, 5, 7, 9 and the putative lauryldiethanolamine (Figures 3A to E) were not detected in cheese strains. The roquefortine C and D alkaloids were in contrast produced in higher quantities in cheese populations than non-cheese populations (Suppl. Figures 1 H & I).

**Specific metabolite profiles in each population**

The silage/spoiled food population produced the highest levels of two potentially toxic clavines, agroclavine and FUM A (Suppl. Figures 1 A & C), fatty acids 1, 5, 7, 9 and the putative lauryldiethanolamine (Figure 3A). The Roquefort population produced the highest levels of ROQ C & D compared to the other cheese populations (Suppl. Figures 1 H & I). The non-Roquefort population produced the lowest levels of the main mycotoxins across all populations; strains from this population nevertheless produced significantly higher quantities of the PR toxin intermediates, ERE A & B, than the other populations (Figures 2 B & C), suggesting that the PR toxin pathway was partially functional. Only low levels of each targeted metabolite of the PR toxin pathway could be detected in the Roquefort population, a single strain producing quantifiable amounts of a single eremofortin (ERE B for LCP02939; Suppl. Table S3). This suggests that the PR toxin production pathway may be non-functional or down-regulated.

We detected very low quantities of mycophenolic acid across all populations compared to other quantified metabolites, maximal concentrations only reaching 118 $ng.g^{-1}.mg^{-1}$. Moreover, 43% of tested strains did not produce any detectable amount of mycophenolic acid, in particular all non-Roquefort strains (Figure 4A). In contrast, all Roquefort and Termignon strains produced detectable MPA levels (Figure 4A). Only Termignon strains produced significant levels of MPA-related metabolites, including identified compounds (MPA isomer, homo MPA, MPA prenyl and MPA IV; Suppl. Figures 1 D, E, F and G) as well as unknown compounds (unknown 4 and 8; Suppl. Figures 4 C & D). The non-Roquefort and Termignon populations produced low levels of AND A, while the Roquefort population produced higher amounts, although in variable quantities (Figure 4B).

Each cheese population also exhibited metabolite specificities in terms of fatty acids and terpenes. The non-Roquefort population produced high levels of fatty acid 2 and terpene 3, and also the highest amounts of the unknown metabolite 24 which harbours a sulfur (Suppl. Figures 2D, 3C and 4K, respectively); sulfur-containing specialised metabolites are often associated with bioactive properties. The Roquefort population produced high levels of unknown metabolites 19, 20 and 21 (Suppl. Figure 4H, I and J), while the Termignon strains produced at higher levels the unknown metabolites 4, 8, 11 and 16 (Suppl. Figure 4 C, D, H, I and J).

**Genetic specificities explain MPA and PR-toxin production differences**

The genomes of the 44 studied strains were analysed to compare their biosynthetic gene clusters in order to understand the observed differences in terms of PR toxin and MPA production. For the MPA biosynthetic gene cluster, genomic comparisons showed that all strains from the non-Roquefort population, producing no MPA, exhibited a 174 bp deletion in the *mpaC* gene (Figure 5A). The deletion is situated in the lipase/esterase domain of the MpaC enzyme, which is the key polyketide synthase enzyme of this cluster (Gillot et al. 2017a). Indeed, this nonreducing polyketide synthase catalyses the synthesis of the first reaction intermediate, 5-methylorsellinic acid (5-MOA) from acetyl-CoA, 3 malonyl-CoA and S-adenosylmethionine (Regueira et al. 2011). This deletion in the 3’

region of the gene introduces a frameshift in the translated protein, leading to a truncated protein (2477 aa) compared to the normal-sized protein (2491 aa) of the MpaC sequence found in the other populations (Figure 5A). Beyond the non-Roquefort strains, seven others did not produce quantifiable levels of MPA (three out of ten strains from the lumber/spoiled food population and four out of ten strains from the silage/spoiled food populations, respectively) but no *mpaC* gene deletion or other modifications affecting the gene cluster were detected in their genomes.

The genomic comparison of the PR toxin biosynthetic gene clusters revealed that all studied non-Roquefort strains presented a G-to-A substitution in position 1440 of ORF 11, which codes for a cytochrome P450 monooxygenase (Figure 5B). This substitution introduces a premature stop codon instead of a tryptophan codon, resulting in a truncated version of the enzyme, with 27 aa missing in the 3' region, leading to a protein of 480 aa instead of 507 aa. The truncation in non-Roquefort strains, together with their lack of PR toxin production and the accumulation of the ERE A & B intermediates, suggests that the truncated enzyme is not fully functional. In the Roquefort population, no PR toxin was produced and ERE A & B did not accumulate, but the PR toxin biosynthetic gene cluster displayed no differences with the functional gene clusters in the other *P. roqueforti* populations (Figure 5B). The lack of PR toxin production and of its intermediates may thus be due to *trans*-down-regulation.

A premature stop codon was also observed in the *ifgB* gene of 10 strains from silage, lumber/spoiled food and Termignon population, resulting in a truncated protein of 338 instead of 340 amino acids. However, no lower production of FUM A was observed for the concerned strains compared to others. Also, a frameshift was observed in the *ifgI* gene of the LCP06040 from lumber/spoiled food population, resulting in a truncated protein of 304 instead of 384 amino acids. Interestingly, LCP06040 was the only *P. roqueforti* strain that did not produce FUM A. Concerning the roquefortine C biosynthesis gene cluster, the 5' region of the *rds* gene has a deletion leading to the absence of a start codon in UBOCC-A-118017 and UBOCC-A-118018 from the silage population as well as a frameshift due to a deletion in the strain LCP02939 from the Roquefort population. The three strains are the only strains which did not produce any roquefortine C. However, none of these four mutations were linked to a given population. For AND A, while allelic variations were observed in some strains, these modifications did not impact the gene cluster and were not associated with a given population.

## 4. Discussion

In this study, we compared metabolite production patterns between strains belonging to the five known *P. roqueforti* populations. We found that the domesticated Roquefort and non-Roquefort cheese populations produced fewer metabolites and were less mycotoxinogenic than their non-cheese counterparts. These findings provide a more thorough understanding on the population divergence and domestication history of *P. roqueforti.* The lower toxin production levels in domesticated populations may be due to selection for healthier cheeses, or to relaxed selection if toxins are not useful any more

in the cheese environment compared to wild or other anthropized environments (Lu et al. 2006; Rokas 2009).

To understand adaptation and specialisation in distinct ecological niches, comparing phenotypes of strains associated with different environments is essential to identify adaptive traits. In fungi, these approaches include estimating the growth cardinal values (*e.g.* temperature, pH or $a_w$), ability to use different substrates and resistance to toxic compounds as recently done for example in *P. roqueforti* (Dumas et al. 2020; Crequer et al. 2023) and in the rice blast fungus *Pyricularia oryzae* (Thierry et al. 2022). Comparisons of metabolite production profiles, especially specialised metabolites, are of major interest in this context as metabolites can be involved in a wide range of biotic interactions and abiotic responses, which can significantly impact fitness and confer competitive advantages.

In this study, we analysed 44 strains from the five known *P. roqueforti* populations (Dumas et al. 2020; Crequer et al. 2023), using a metabolomics approach to compare their metabolite profiles after growth on YES medium and genomic comparison of their metabolite biosynthetic gene clusters. Beyond the seven targeted specialised metabolites, which included the main known *P. roqueforti* mycotoxins, 40 other fungal metabolites were identified (Table 1). The metabolite production profiles were different between the five *P. roqueforti* populations, and in particular between the cheese and non-cheese populations, which we could explain for some extrolites by deletions in genes involved in their biosynthesis in the non-Roquefort population.

A major finding relates to the PR toxin, the most toxic known *P. roqueforti* metabolite, with significant differences of production levels between the non-cheese and cheese populations. The non-cheese populations produced, on average, higher concentrations of PR toxin, especially the Lumber/spoiled food population, while the non-Roquefort and Roquefort domesticated populations did not produce any detectable quantities. The Termignon population had an intermediate profile, as previously reported for various growth parameters and carbon source usage (Crequer et al. 2023). Such intermediate metabolite production levels are consistent with the hypothesis that the Termignon population represents descendants of an ancestral domesticated population, displaying traits resulting from domestication before the strong selection imposed in recent years by process industrialisation, thus corresponding to a protracted domestication process (i.e. a slow process occurring across hundreds or thousands of years), as reported in several crops (Allaby et al. 2008; Fuller et al. 2012). Regarding the two populations used for cheese inoculation, non-Roquefort and Roquefort, our results are of particular interest for food safety and human health, as these populations did not produced PR toxin which is the most toxic *P. roqueforti* mycotoxin (Pedrosa and Griessler 2010; Hymery et al. 2017).

On the other hand, *P. roqueforti* is one of the most common post-harvest fungal contaminants in silages (Gallo et al. 2015). Its ability to colonise this substrate, and produce there PR toxin, has been associated with cattle intoxication, with symptoms such as loss of appetite, cessation of rumen activity, gastroenteritis, haemorrhage and even death (Veselý et al. 1981; Nielsen et al. 2006). It was considered

so far that the *P. roqueforti* strains used as ripening cheese cultures had the intrinsic ability to produce PR toxin (Dubey et al. 2018) and that the absence of this mycotoxin in cheeses was due to its instability and presumed degradation into various less toxic molecules, i.e. PR imine and PR amide and PR acid (Chang et al. 1993, 1996). While the latter hypothesis may still be valid, our results provide a new and robust explanation, as none of the studied non-Roquefort and Roquefort strains, used for blue cheese production, produced quantifiable levels of PR toxin, even in YES medium known to be favourable for secondary metabolite production. Cheeses made with potential PR-toxin producer strains, such as the Termignon population, may nevertheless contain little of this toxin in cheeses as it is unstable in this matrix. Indeed, PR toxin was shown to be degraded in PR amine in cheese (Siemens and Zawistowski 1993). The instability of PR toxin in cheese may imply that the loss of its production ability in cheese strains may be more due to relaxed selection than to selection against its production in cheeses.

Diversity in metabolite synthesis, both qualitatively and quantitatively, may arise from divergent selection across ecological niches. Different metabolite profiles across differentiated fungal populations or lineages of a given species have been reported in other fungi. For example, among the four lineages identified in *Fusarium graminearum* isolated from maize (Lee et al. 2012), most isolates from lineages 2 and 6 produced the trichothecene group B mycotoxin nivalenol (NIV), while all isolates from lineages 3 and 7 produced deoxynivalenol (DON), another major trichothecene B *Fusarium* mycotoxin, that is a virulence factor in wheat and toxic for human and animal health. In *Fusarium asiaticum* isolated from Chinese rice and wheat, producer strains of 3-acetyldeoxynivalenol (an acetylated form of DON) were ubiquitous in wheat while NIV-producers were more prevalent in rice, the trichothecene chemotypes also varying across regions (Yang et al. 2018). In *Aspergillus flavus,* the production of aflatoxin B1 (AFB1), a potent cancerogenic mycotoxin regulated in the food chain, was significantly higher for soil isolates than for corn kernel ones (Sweany et al. 2011).

To further understand the differences in metabolite production between *P. roqueforti* populations, we focused on determining the genetic basis for two main differences between cheese and non-cheese populations, i.e. the production of PR toxin and MPA. The inability to produce PR toxin by non-Roquefort strains could be attributed to a substitution in ORF 11 of the corresponding biosynthetic gene cluster resulting in a premature stop codon. This finding, combined with the accumulation of both ERE A & B, suggests that ORF 11 likely intervenes in the formation of eremofortin C (ERE C), the final precursor for PR toxin, instead of ORF 5 as previously described (Hidalgo et al. 2017). Our results also pinpointed an unknown metabolite that may correspond to ERE C (terpene 11); this metabolite was not found in the non-Roquefort population extracts either, which reinforces the hypothesis that ORF 11 intervenes in its formation. However, as no commercial ERE C standard was available, we could not fully confirm the identity of terpene 11 nor test the possibility that these isolates can produce PR toxin from ERE C.

The Roquefort population produced no detectable amount of PR toxin, ERE A, ERE B or putative ERE C (*i.e.* terpene 11), and we were unable to determine the genetic basis of this lack of production based on biosynthetic gene cluster comparisons. It seems most likely that the expression of the entire gene cluster might be affected by a regulatory element in *cis* or *trans*. In the DS17690 *P. chrysogenum* strain, downregulation of the PR toxin biosynthetic cluster was due to mutations in the *laeA* and *velA* regulatory genes (Martín 2017). Here, we did not identify any mutations in either of these two genes in the Roquefort strains (data not shown); therefore, the inability to produce PR toxin may be due to identified global regulators (*e.g. pga1, sfk1, pcz1*) involved in the modulation of metabolite production in *P. roqueforti* (Chávez et al. 2023) or to other, unidentified regulators.

None of the non-Roquefort strains produced mycophenolic acid and we could attribute this inability to a deletion in the *mpaC* gene within the corresponding biosynthetic gene cluster. This deletion had been previously reported in *P. roqueforti* strains (Gillot et al. 2017a), and found associated with the presence of the horizontally transferred *CheesyTer* and *Wallaby* regions (Gillot et al. 2017b), that were later found mostly present in the non-Roquefort population (Dumas et al. 2020). The Termignon strains were the highest producers of MPA and MPA-related derivatives, which is of interest for large-scale production of this important pharmaceutical immunosuppressive with antifungal, antibacterial, antiviral, anti-psoriasis and antitumor and anti-graft reject activities (Ammar et al. 2023).

In *P. roqueforti,* other extrolites were produced by all populations, but with still marked differences in production levels for several compounds. For the ROQ C & D alkaloids, the highest producers were found in the cheese populations, especially the Roquefort population. The fact that ROQ C & D production was maintained in domesticated populations raises questions about their ecological role in cheese, given that roquefortines have various bioactive properties. It may also be that there was no selection during domestication against the production of this extrolite with low cytotoxic effects (Fontaine et al. 2016).

We also identified differences between *P. roqueforti* populations for the production of clavines, *e.g.* FUM A, festuclavine (a FUM A intermediate) and agroclavine. The production of festuclavine and agroclavine by *P. roqueforti* had previously been reported but not compared between populations (Ohmomo et al. 1975; Nielsen et al. 2006). We found the highest quantities of these compounds in the non-cheese populations, and also in the Roquefort population. Similar results were also observed for andrastin A, a potential natural anti-cancer compound, thus raising the question of the ecological role of this molecule, especially in cheese populations.

Numerous other untargeted molecules were observed and corresponded to terpenoids, fatty acids (including fatty acid amides) or unknown molecules. These molecules might correspond to metabolites recently described in *P. roqueforti,* such as annullatins (Xiang et al. 2022), eremophilane and guaiane sesquiterpenes (Mo et al. 2023) or sesterterpenoids (Wang et al. 2018, 2020, 2021), their role and biological activity being still unknown. Further efforts are required to refine their identification and understand their function. Several molecules were specific to some populations, *e.g.* unknown

compounds 2 and 3, and terpene 11 specific to the lumber population, fatty acid 5 and putative lauryldiethanolamine specific to the silage/spoiled food population, terpene 3 specific to the non-Roquefort population, unknown compounds 20 and 21 specific to Roquefort population, and unknown compounds 8 and 11 specific to the Termignon population; they could thus be of clear interest as potential population biomarkers and for being involved in niche specialisation.

The non-Roquefort population, which displays the strongest domestication syndrome and the most severe genetic bottleneck (Dumas et al. 2020; Crequer et al. 2023), exhibited also the most distinctive metabolite profile. The non-Roquefort strains produced the lowest amounts of metabolites for both identified compounds (including mycotoxins) or unidentified compounds. Such toxin loss represents a convergence in domesticated fungal populations, and may result from a neutral degeneration of unused traits or a selection against toxin production by humans. Fungal metabolites are known to be used for microbial "chemical warfare", *e.g.* for fungal invasion in plants and/or microbial competition, so they might not be required to the same extent in a rich medium with readily available nutrients and with an inoculation advantage for matrix colonisation. Other unused traits have been reported to degenerate in domesticated fungi by relaxed selection, such as the ability of carbohydrate use and of sexual reproduction (Ropars et al. 2016; Ropars and Giraud 2022). In the present study, genomic comparisons allowed identifying the mutations likely causing loss of production of the PR toxin and MPA in the non-Roquefort population. *P. roqueforti* was also shown to harbour a non-functional gene cluster for the toxic mycotoxin patulin ((Nielsen et al. 2017).

If there was selection of strains unable to produce harmful compounds in the Non-Roquefort and Roquefort populations, this raises fascinating questions concerning the empiric selection process used as, at the time, neither genetic nor metabolomic data were available. Cheese producers inoculated spores into breads to cultivate *P. roqueforti* strains (bread crusts being burnt to avoid external contaminants), and they likely have inoculated bread using spores from the best cheeses, in particular those causing no health issue.

The loss of mycotoxinogenesis can indeed be the result of domestication events, as humans have often selected fungal strains unable to produce harmful toxins for use in food. The best known example is *Aspergillus oryzae,* a domesticated species used to ferment Asian food products derived from its mycotoxin-producing wild relative, *Aspergillus flavus* (Barbesgaard et al. 1992). In *A. oryzae*, several mutations were reported in the aflatoxin biosynthetic gene cluster, in particular an approximately 40 kb deletion in the genomic region between the *norB* and *norA* genes (Chang et al. 2005), mutations in the *aflR* promoter, a nearly 250 bp deletion in the *aflT* coding region, a frameshift mutation in the *norA* coding region and multiple nonsynonymous mutations in the *verA* coding region (Tominaga et al. 2006). Down-regulation of another mycotoxin, cyclopiazonic acid (CPA), also occurs in *A. oryzae* (Gibbons et al. 2012). Another example is the domesticated fungus *Aspergillus sojae,* a species considered to be derived from *Aspergillus parasiticus* (Chang and Hua 2023). In *A. sojae,* the inability to produce aflatoxin is the result of a termination point mutation in the *aflR* regulatory gene as well as

a premature stop codon in the *pksA* gene leading to a truncated version of the polyketide synthase enzyme (Chang et al. 2007). Another example, among *Penicillium* species, is *P. camemberti*, domesticated for cheese making. In this species, two different lineages display very contrasted extrolite production profiles: *P. camemberti* var. *camemberti* strains produce high levels of cyclopiazonic acid (CPA) on YES medium while *P. camemberti* var. *caseifulvum* does not. This was shown to be due to a 2 bp deletion in the *cpaA* gene, inducing a frameshift, thus modifying the polyketide synthase/non-ribosomal peptide synthase enzyme responsible for the first step of the CPA biosynthetic pathway (Ropars et al. 2020).

## 5. Conclusion

To conclude, a dual targeted and untargeted metabolomics approach was used to compare *P. roqueforti* metabolite profiles. Distinct profiles were identified across the five *P. roqueforti* populations which is likely due to ecological specialisation and human selection. Indeed, the two domesticated populations used to inoculate blue cheeses no longer produce PR toxin, the most toxic *P. roqueforti* mycotoxin, while the Termignon population strains produce low levels. In contrast, the non-cheese populations (Lumber/spoiled food and Silage) maintained their PR toxin production which indicates that this mycotoxin likely plays an important ecological role in these more complex and harsh environments where microbial competition and natural colonisation occurs, although its precise role remains unknown. The metabolite diversity and quantity profile is unique to each *P. roqueforti* population and likely provides specific advantages to thrive in their respective complex domesticated or wild environments. Overall, this study provides new findings supporting that fungal metabolite profiles are a result of adaptation to environmental conditions (*i.e.* niche specialisation) and that domestication leads to hypotoxigenic populations.

**Acknowledgments**

This study was funded by the ANR-19-CE20-0002-02 Fungadapt (Agence Nationale de la Recherche) grant. The authors are thankful to Thibault Caron and Jean-Philippe Vernadet for useful advice on bioinformatic analyses.

**Author contributions**

Obtained funding: ECo, TG ; Designed the work: MC, ECo, JLJ. Performed targeted analyses: GC, ECr, MC; Performed and analysed untargeted analyses: MC, ECr, YC, JF; Metabolomics data analyses MC, ECr, YC, JF; Global data set comparisons ECr; Genomes: TG, ECr, RRdlV; biosynthetic gene cluster analyses: ECr, ECo, JLJ, MC, RRdlV; Statistical analyses: ECr; Writing original draft preparation: ECr, ECo, MC; Editing and proofreading: JLJ and TG with contributions by all authors; Supervision: MC, ECo, JLJ, TG.

## References


Allaby RG, Fuller DQ, Brown TA (2008) The genetic expectations of a protracted model for the origins of domesticated crops. Proceedings of the National Academy of Sciences 105:13982–13986. https://doi.org/10.1073/pnas.0803780105

Ammar HA, Ezzat SM, Elshourbagi E, Elshahat H (2023) Titer improvement of mycophenolic acid in the novel producer strain *Penicillium arizonense* and expression analysis of its biosynthetic genes. BMC Microbiol 23:135. https://doi.org/10.1186/s12866-023-02884-z

Barbesgaard P, Heldt-Hansen HP, Diderichsen B (1992) On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. Appl Microbiol Biotechnol 36:569–572. https://doi.org/10.1007/BF00183230

Caron T, Piver ML, Péron A-C, et al (2021) Strong effect of *Penicillium roqueforti* populations on volatile and metabolic compounds responsible for aromas, flavor and texture in blue cheeses. International Journal of Food Microbiology 354:109174. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109174

Chambers MC, Maclean B, Burke R, et al (2012) A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. Nat Biotechnol 30:918–920. https://doi.org/10.1038/nbt.2377

Chang P-K, Horn BW, Dorner JW (2005) Sequence breakpoints in the aflatoxin biosynthesis gene cluster and flanking regions in nonaflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. Fungal Genetics and Biology 42:914–923. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.07.004

Chang P-K, Hua SST (2023) Are current *Aspergillus sojae* strains originated from a native aflatoxigenic *Aspergillus* species population also present in California? Mycobiology 51:139–147. https://doi.org/10.1080/12298093.2023.2217495

Chang P-K, Matsushima K, Takahashi T, et al (2007) Understanding nonaflatoxigenicity of *Aspergillus sojae*: a windfall of aflatoxin biosynthesis research. Appl Microbiol Biotechnol 76:977–984. https://doi.org/10.1007/s00253-007-1116-4

Chang SC, Lu KL, Yeh SF (1993) Secondary metabolites resulting from degradation of PR toxin by *Penicillium roqueforti*. Appl Environ Microbiol 59:981–986. https://doi.org/10.1128/aem.59.4.981-986.1993

Chang SC, Yeh SF, Li SY, et al (1996) A novel secondary metabolite relative to the degradation of PR toxin by *Penicillium roqueforti*. Curr Microbiol 32:141–146. https://doi.org/10.1007/s002849900025

Chávez R, Vaca I, García-Estrada C (2023) Secondary metabolites produced by the blue-cheese ripening mold *Penicillium roqueforti*; Biosynthesis and regulation mechanisms. J Fungi (Basel) 9:459. https://doi.org/10.3390/jof9040459

Crequer E, Ropars J, Jany J-L, et al (2023) A new cheese population in *Penicillium roqueforti* and adaptation of the five populations to their ecological niche. Evolutionary Applications 16:1438–1457. https://doi.org/10.1111/eva.13578

Dubey MK, Aamir M, Kaushik MS, et al (2018) PR toxin – biosynthesis, genetic regulation, toxicological potential, prevention and control measures: overview and challenges. Front Pharmacol 9:. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00288

Dührkop K, Fleischauer M, Ludwig M, et al (2019) SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. Nat Methods 16:299–302. https://doi.org/10.1038/s41592-019-0344-8

Dumas E, Feurtey A, Rodríguez de la Vega RC, et al (2020) Independent domestication events in the blue‐cheese fungus *Penicillium roqueforti*. Mol Ecol 29:2639–2660. https://doi.org/10.1111/mec.15359

Engel G, von Milczewski KE, Prokopek D, Teuber M (1982) Strain-specific synthesis of mycophenolic acid by *Penicillium roqueforti* in blue-veined cheese. Appl Environ Microbiol 43:1034–1040. https://doi.org/10.1128/aem.43.5.1034-1040.1982

Finoli C, Vecchio A, Galli A, Dragoni I (2001) Roquefortine C occurrence in blue cheese. J Food Prot 64:246–251. https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.2.246

Fontaine K, Mounier J, Coton E, Hymery N (2016) Individual and combined effects of roquefortine C and mycophenolic acid on human monocytic and intestinal cells. World Mycotoxin Journal 9:51–62. https://doi.org/10.3920/WMJ2014.1861

Fontaine K, Passeró E, Vallone L, et al (2015) Occurrence of roquefortine C, mycophenolic acid and aflatoxin M1 mycotoxins in blue-veined cheeses. Food Control 47:634–640. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.046

Frisvad JC, Filtenborg O (1983) Classification of terverticillate penicillia based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. Appl Environ Microbiol 46:1301–1310. https://doi.org/10.1128/aem.46.6.1301-1310.1983

Fuller DQ, Willcox G, Allaby RG (2012) Early agricultural pathways: moving outside the "core area" hypothesis in Southwest Asia. J Exp Bot 63:617–633. https://doi.org/10.1093/jxb/err307

Gallo A, Giuberti G, Frisvad J, et al (2015) Review on mycotoxin issues in ruminants: occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal performance and practical strategies to counteract their negative effects. Toxins 7:3057–3111. https://doi.org/10.3390/toxins7083057

Gillot G, Jany J-L, Coton M, et al (2015) Insights into *Penicillium roqueforti* morphological and genetic diversity. PLoS ONE 10:e0129849

Gillot G, Jany J-L, Dominguez-Santos R, et al (2017a) Genetic basis for mycophenolic acid production and strain-dependent production variability in *Penicillium roqueforti*. Food Microbiology 62:239–250. https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.013

Gillot G, Jany J-L, Poirier E, et al (2017b) Functional diversity within the *Penicillium roqueforti* species. International Journal of Food Microbiology 241:141–150. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.001

Hammerl R, Frank O, Schmittna T (2019) Functional metabolome analysis of *Penicillium roqueforti* by means of differential off-line LC–NMR. J Agric Food Chem 12

Hidalgo PI, Poirier E, Ullán RV, et al (2017) *Penicillium roqueforti* PR toxin gene cluster characterization. Appl Microbiol Biotechnol 101:2043–2056. https://doi.org/10.1007/s00253-016-7995-5

Hymery N, Puel O, Tadrist S, et al (2017) Effect of PR toxin on THP1 and Caco-2 cells: an *in vitro* study. World Mycotoxin Journal 10:375–386. https://doi.org/10.3920/WMJ2017.2196

Hymery N, Vasseur V, Coton M, et al (2014) Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: a review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 13:437–456. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12069

Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in performance and usability. Molecular Biology and Evolution 30:772–780. https://doi.org/10.1093/molbev/mst010

Keller NP (2019) Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. Nat Rev Microbiol 17:167–180. https://doi.org/10.1038/s41579-018-0121-1

Kokkonen M, Jestoi M, Rizzo A (2005) Determination of selected mycotoxins in mould cheeses with liquid chromatography coupled to tandem with mass spectrometry. Food Addit Contam 22:449–456. https://doi.org/10.1080/02652030500089861

Lafont P, Siriwardana MG, Combemale I, Lafont J (1979) Mycophenolic acid in marketed cheeses. Food Cosmet Toxicol 17:147–149. https://doi.org/10.1016/0015-6264(79)90214-1

Lee J, Kim H, Jeon J-J, et al (2012) Population structure of and mycotoxin production by *Fusarium graminearum* from maize in south Korea. Appl Environ Microbiol 78:2161–2167. https://doi.org/10.1128/AEM.07043-11

Lo Y-C, Bruxaux J, Rodríguez de la Vega RC, et al (2023) Domestication in dry-cured meat *Penicillium* fungi: Convergent specific phenotypes and horizontal gene transfers without strong genetic subdivision. Evolutionary Applications 00:1–24. https://doi.org/10.1111/eva.13591

Lu J, Tang T, Tang H, et al (2006) The accumulation of deleterious mutations in rice genomes: a hypothesis on the cost of domestication. Trends in Genetics 22:126–131. https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.01.004

Martens L, Chambers M, Sturm M, et al (2011) mzML--a community standard for mass spectrometry data. Mol Cell Proteomics 10:R110.000133. https://doi.org/10.1074/mcp.R110.000133

Martín JF (2017) Key role of LaeA and velvet complex proteins on expression of β-lactam and PR-toxin genes in *Penicillium chrysogenum* : cross-talk regulation of secondary metabolite pathways. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 44:525–535.

https://doi.org/10.1007/s10295-016-1830-y

Mo S, Huang Z, Ye Z, et al (2023) Ten undescribed eremophilane and guaiane sesquiterpenes from *Penicillium roqueforti*. Phytochemistry 212:113722. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2023.113722

Nielsen JC, Grijseels S, Prigent S, et al (2017) Global analysis of biosynthetic gene clusters reveals vast potential of secondary metabolite production in *Penicillium* species. Nat Microbiol 2:1–9. https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.44

Nielsen KF, Dalsgaard PW, Smedsgaard J, Larsen TO (2005) Andrastins A-D, *Penicillium roqueforti* metabolites consistently produced in blue-mold-ripened cheese. J Agric Food Chem 53:2908–2913. https://doi.org/10.1021/jf047983u

Nielsen KF, Sumarah MW, Frisvad JC, Miller JD (2006) Production of metabolites from the *Penicillium roqueforti* complex. J Agric Food Chem 54:3756–3763. https://doi.org/10.1021/jf060114f

Ohmomo S, Sato T, Utagawa T, Abe M (1975) Isolation of festuclavine and three new indole alkaloids, roquefortine A, B and C from the cultures of *Penicillium roqueforti*. Agricultural and Biological Chemistry 39:1333–1334. https://doi.org/10.1080/00021369.1975.10861780

Pedrosa K, Griessler K (2010) Toxicity, occurrence and negative effects of PR toxin – the hidden enemy. International Dairy Topics 9:7–9

Pertea G, Pertea M (2020) GFF Utilities: GffRead and GffCompare

Pitt JI, Hocking AD (2009) Fungi and food spoilage. Springer US, Boston, MA

Regueira TB, Kildegaard KR, Hansen BG, et al (2011) Molecular basis for mycophenolic acid biosynthesis in *Penicillium brevicompactum*. Applied and Environmental Microbiology 77:3035. https://doi.org/10.1128/AEM.03015-10

Rokas A (2009) The effect of domestication on the fungal proteome. Trends Genet 25:60–63. https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.11.003

Ropars J, Didiot E, Rodríguez de la Vega RC, et al (2020) Domestication of the emblematic white cheese-making fungus *Penicillium camemberti* and its diversification into two varieties. Current Biology S0960982220312720. https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.08.082

Ropars J, Giraud T (2022) Convergence in domesticated fungi used for cheese and dry-cured meat maturation: beneficial traits, genomic mechanisms, and degeneration. Current Opinion in Microbiology 70:102236. https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102236

Ropars J, Lo Y-C, Dumas E, et al (2016) Fertility depression among cheese-making *Penicillium roqueforti* strains suggests degeneration during domestication. Evolution 70:2099–2109. https://doi.org/10.1111/evo.13015

Schmid R, Heuckeroth S, Korf A, et al (2023) Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. Nat Biotechnol 41:447–449. https://doi.org/10.1038/s41587-023-01690-2

Scott PM, Kennedy BPC (1976) Analysis of blue cheese for roquefortine and other alkaloids from *Penicillium roqueforti*. J Agric Food Chem 24:865–868. https://doi.org/10.1021/jf60206a028

Shumate A, Salzberg SL (2021) Liftoff: accurate mapping of gene annotations. Bioinformatics 37:1639–1643. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa1016

Siemens K, Zawistowski J (1993) Occurrence of PR Imine, a metabolite of *Penicillium roqueforti*, in blue cheese. J Food Prot 56:317–319. https://doi.org/10.4315/0362-028X-56.4.317

Stroe MC, Gao J, Pitz M, Fischer R (2023) Complexity of fungal polyketide biosynthesis and function. Mol Microbiol. https://doi.org/10.1111/mmi.15192

Sweany RR, Damann KE, Kaller MD (2011) Comparison of soil and corn kernel *Aspergillus flavus* populations: evidence for niche specialization. Phytopathology 101:952–959. https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-10-0243

Thierry M, Charriat F, Milazzo J, et al (2022) Maintenance of divergent lineages of the rice blast fungus *Pyricularia oryzae* through niche separation, loss of sex and post-mating genetic incompatibilities. PLoS Pathog 18:e1010687. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010687

Tominaga M, Lee Y-H, Hayashi R, et al (2006) Molecular analysis of an inactive aflatoxin biosynthesis gene cluster in *Aspergillus oryzae* RIB strains. Appl Environ Microbiol 72:484–490. https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.484-490.2006

Troshin PV, Procter JB, Sherstnev A, et al (2018) JABAWS 2.2 distributed web services for Bioinformatics: protein disorder, conservation and RNA secondary structure. Bioinformatics

34:1939–1940. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty045

Usleber E, Dade M, Schneider E, et al (2008) Enzyme immunoassay for mycophenolic acid in milk and cheese. J Agric Food Chem 56:6857–6862. https://doi.org/10.1021/jf801063w

Veselý D, Veselá D, Adámková null (1981) [Occurrence of PR-toxin-producing *Penicillium roqueforti* in corn silage]. Vet Med (Praha) 26:109–115

Wang J-P, Shu Y, Hu J-T, et al (2020) Roquefornine A, a sesterterpenoid with a 5/6/5/5/6-fused ring system from the fungus *Penicillium roqueforti* YJ-14. Org Chem Front 7:1463–1468. https://doi.org/10.1039/D0QO00301H

Wang J-P, Shu Y, Liu R, et al (2021) Bioactive sesterterpenoids from the fungus *Penicillium roqueforti* YJ-14. Phytochemistry 187:112762. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112762

Wang J-P, Yu J, Shu Y, et al (2018) Peniroquesines A-C: Sesterterpenoids possessing a 5-6-5-6-5-Fused pentacyclic ring system from *Penicillium roqueforti* YJ-14. Org Lett 20:5853–5856. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b02534

Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, et al (2009) Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. Bioinformatics 25:1189–1191. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033

Xiang P, Kemmerich B, Yang L, Li S-M (2022) Biosynthesis of annullatin D in *Penicillium roqueforti* implies oxidative lactonization between two hydroxyl groups catalyzed by a BBE-like enzyme. Org Lett 24:6072–6077. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.2c02438

Yang M, Zhang H, Kong X, et al (2018) Host and cropping system shape the *Fusarium* population: 3ADON-producers are ubiquitous in wheat whereas NIV-producers are more prevalent in rice. Toxins (Basel) 10:115. https://doi.org/10.3390/toxins10030115

**Table 1. Untargeted metabolite characteristics : Retention times and masses in quantification runs in HPLC-QTOF and identification runs with UHPLC-QTOF, Sirius prediction (*in silico* MS/MS match) and identification against local databases specific to fungus metabolites (MS/MS match).**

| | LC-Q-TOF | | UHPLC-Q-TOF | | | | Sirius prediction | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Name** | **Retention time** | **Mass** | **Retention time** | **Mass** | **Molecular formula** | **adduct** | **NPC#pathway** | **NPC#pathway Probability** | **Name** | **ID method** |
| Putative agroclavine | 3.172 | 239.152 | 3.585 | 239.154 | C16H18N2 | [M + H]+ | Alkaloids | 0.998 | Agroclavine | MS/MS match |
| Putative festuclavine | 4.325 | 241.172 | 3.778 | 241.171 | C16H20N2 | [M + H]+ | Alkaloids | 0.998 | | |
| cyclo(PheValVal Phe) | 23.124 | 493.276 | 6.922 | 493.280 | C28H36N4O4 | [M + H]+ | Amino acids and Peptides | 0.986 | cyclo-(Phe-Val-Val-Phe) | MS/MS match |
| D-Phe-L-Val-D-Val-L-Phe | 16.652 | 511.287 | 5.028 | 511.291 | C28H38N4O5 | [M + H]+ | Amino acids and Peptides | 0.999 | tetrapeptide-(Phe-Val-Val-Phe) | MS/MS match |
| D-Phe-L-Val-D-Val-L-Tyr | 13.707 | 527.281 | 4.211 | 527.286 | C28H38N4O6 | [M + H]+ | Amino acids and Peptides | 0.999 | tetrapeptide-(Phe-Val-Val-Tyr) | MS/MS match |
| MPA isomer | 24.548 | 375.213 | 7.184 | 375.216 | C22H30O5 | [M + H]+ | Polyketides | 0.748 | Mycophenolic acid isomer | MS/MS match |
| homoMPA | 22.050 | 385.159 | 6.597 | 385.162 | C20H26O6 | [M + Na]+ | Polyketides | 0.769 | Homomycophenolic acid | MS/MS match |
| MPA prenyl | 32.294 | 385.234 | 8.671 | 385.238 | C24H32O4 | [M + H]+ | Polyketides | 0.745 | 6-Farnesyl-5,7-dihydroxy-4-methylphthalide; MPA prenyl | MS/MS match |
| MPA IV | 23.980 | 389.192 | 7.034 | 389.196 | C22H28O6 | [M + H]+ | Terpenoids | 0.736 | Mycophenolic acid IV (version II) | MS/MS match |
| Roquefortin D | 11.017 | 392.204 | 4.072 | 392.207 | C22H25N5O2 | [M + H]+ | Alkaloids | 0.999 | Roquefortine D | MS/MS match |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Putative lauryldiethanolamine | 19.403 | 274.271 | 5.952 | 274.274 | C16H35NO2 | [M + H]+ | Fatty acids | 0.958 | *in silico* MS/MS match |
| Fatty acid 1 | 19.526 | 230.246 | 5.950 | 230.248 | C14H31NO | [M + H]+ | Fatty acids | 0.978 | *in silico* MS/MS match |
| Fatty acid 2 | 0.538 | 232.152 | 1.802 | 232.154 | C11H21NO4 | [M + H]+ | Fatty acids | 0.999 | *in silico* MS/MS match |
| Fatty acid 3 | 25.063 | 279.229 | 7.034 | 279.232 | C18H30O2 | [M + H]+ | Fatty acids | 0.971 | *in silico* MS/MS match |
| Fatty acid 5 | 19.800 | 290.267 | 6.026 | 290.269 | C16H35NO3 | [M + H]+ | Fatty acids | 0.978 | *in silico* MS/MS match |
| Fatty acid 6 | 18.773 | 295.224 | 6.484 | 295.226 | C18H30O3 | [M + H]+ | Fatty acids | 0.988 | *in silico* MS/MS match |
| Fatty acid 7 | 19.610 | 318.297 | 6.026 | 318.300 | C18H39NO3 | [M + H]+ | Fatty acids | 0.965 | *in silico* MS/MS match |
| Fatty acid 9 | 19.281 | 288.251 | 5.738 | 288.253 | C16H33NO3 | [M + H]+ | Fatty acids | 0.997 | *in silico* MS/MS match |
| Terpene 1 | 20.033 | 471.267 | 5.913 | 471.271 | C26H40O6 | [M + Na]+ | Terpenoids | 0.665 | *in silico* MS/MS match |
| Terpene 2 | 19.200 | 289.141 | 3.089 | 289.144 | C17H20O4 | [M + H]+ | Terpenoids | 0.977 | *in silico* MS/MS match |
| Terpene 3 | 20.189 | 291.156 | 6.247 | 291.159 | C17H22O4 | [M + H]+ | Terpenoids | 0.983 | *in silico* MS/MS match |
| Terpene 4 | 16.2667 | 293.172 | 5.060 | 293.174 | C17H24O4 | [M + H]+ | Terpenoids | 0.995 | *in silico* MS/MS match |
| Terpene 5 | 9.9155 | 305.135 | 5.101 | 305.138 | C17H20O5 | [M + H]+ | Terpenoids | 0.994 | *in silico* MS/MS match |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Terpene 6 | 15.608 | 351.178 | 4.897 | 351.180 | C19H26O6 | [M + H]+ | Terpenoids | 0.995 | *in silico* MS/MS match |
| Terpene 7 | 19.195 | 371.143 | 6.027 | 371.146 | C19H24O6 | [M + Na]+ | Terpenoids | 0.996 | *in silico* MS/MS match |
| Terpene 8 | 15.621 | 373.157 | 4.888 | 373.162 | C19H26O6 | [M + Na]+ | Terpenoids | 0.997 | *in silico* MS/MS match |
| Terpene 9 | 17.805 | 751.288 | 5.719 | 751.294 | C38H48O14 | [M + Na]+ | Terpenoids | 0.966 | *in silico* MS/MS match |
| Terpene 10 | 18.731 | 235.167 | 4.880 | 235.169 | C15H22O2 | [M + H]+ | Terpenoids | 0.986 | *in silico* MS/MS match |
| Terpene 11 | 10.000 | 345.128 | 4.199 | 345.131 | C17H22O6 | [M + Na]+ | Terpenoids | 0.991 | *in silico* MS/MS match |
| Unknown 2 | 0.581 | 151.074 | 2.258 | 151.075 | C9H10O2 | [M + H]+ | Polyketides | 0.630 | *in silico* MS/MS match |
| Unknown 3 | 0.584 | 191.066 | 2.258 | 191.068 | C9H12O3 | [M + Na]+ | Shikimates and Phenylpropanoids | 0.454 | *in silico* MS/MS match |
| Unknown 4 | 29.645 | 417.231 | 8.270 | 417.227 | C24H32O6 | [M + H]+ | Polyketides | 0.884 | *in silico* MS/MS match |
| Unknown 8 | 22.101 | 345.172 | 6.597 | 345.170 | C20H24O5 | [M + H]+ | Polyketides | 0.829 | *in silico* MS/MS match |
| Unknown 11 | 25.124 | 383.179 | 7.384 | 383.183 | C21H28O5 | [M + Na]+ | Terpenoids | 0.741 | *in silico* MS/MS match |
| Unknown 16 | 24.549 | 397.195 | 7.178 | 397.199 | C22H30O5 | [M + Na]+ | Polyketides | 0.805 | *in silico* MS/MS match |
| Unknown 17 | 29.629 | 439.205 | 8.271 | 439.209 | C24H32O6 | [M + Na]+ | Polyketides | 0.783 | *in silico* MS/MS match |
| Unknown 19 | 14.313 | 507.180 | 3.559 | 507.183 | C23H32O11 | [M + Na]+ | Terpenoids | 0.742 | *in silico* MS/MS match |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Unknown 20 | 23.123 | 515.258 | 6.918 | 515.263 | C27H40O8 | [M + Na]+ | Terpenoids | 0.834 | *in silico* MS/MS match |
| Unknown 21 | 19.405 | 531.252 | 5.905 | 531.257 | C28H36N4O5 | [M + Na]+ | Amino acids and Peptides | 0.944 | *in silico* MS/MS match |
| Unknown 24 | 0.458 | 206.044 | 1.096 | 206.046 | C5H13NO4S | [M + Na]+ | Fatty acids | 0.465 | *in silico* MS/MS match |

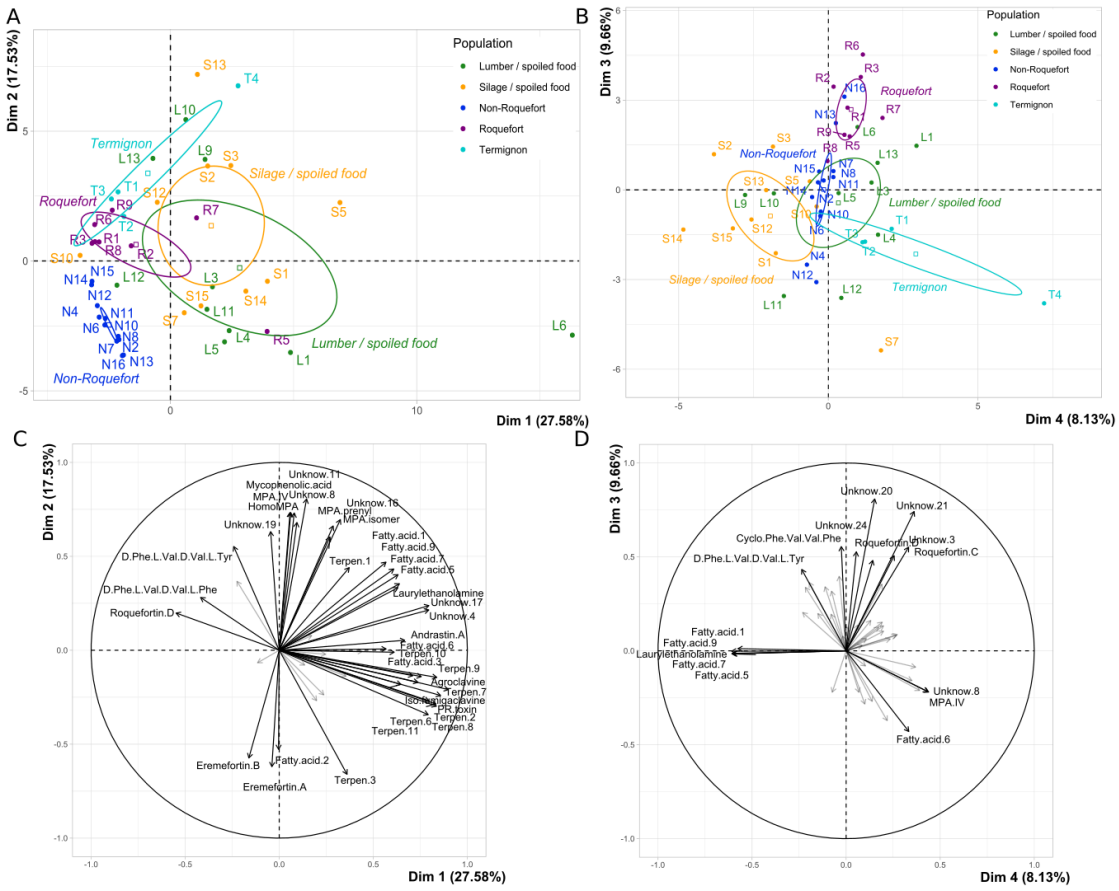



**Figure 1: Principal component analysis (PCA) illustrating the metabolite profile differences between *Penicillium roqueforti* populations. A**. Strains on the first two axes of the PCA. **B**. strains on the third and fourth axes of the PCA. In **A**. and **B**. a confidence ellipse at 95% is drawn for each of the five populations. The percentage of variance explained by the axes are indicated. The same colour code is used as in the other figures: green for the lumber/spoiled food population, orange for the silage/spoiled food population, dark blue for the non-Roquefort cheese population, purple for the Roquefort cheese population and light blue for the Termignon cheese population. The strain IDs are provided in Suppl. Table 1. **C**. Association between the two first and **D.** the third and fourth PCA axes and the variables which corresponded to the selected metabolites from metabolite profiling of 44 *P. roqueforti* strains.

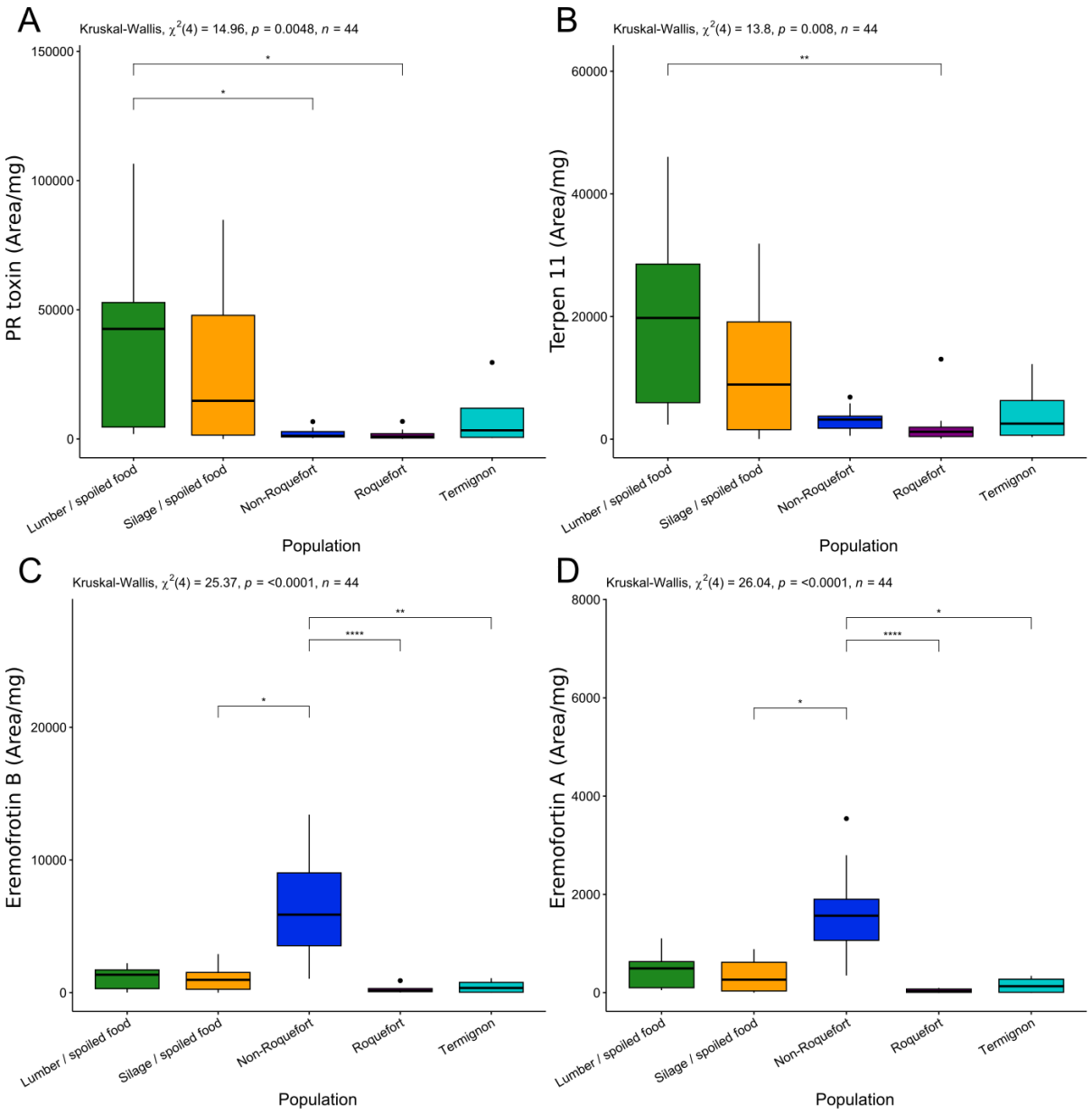



**Figure 2: Production level of PR-toxin (A), terpene 11 (putative eremofortin C) (B), eremofortins A (C) and B (D) PR toxin intermediates, across the five *Penicillium roqueforti* populations.** Production level is expressed as the surface of the peak area of the targeted metabolite per mycelium mass. The same colour code is used as in the other figures: green for the lumber/spoiled food population, orange for the silage/spoiled food population, dark blue for the non-Roquefort cheese population, purple for the Roquefort cheese population and light blue for the Termignon cheese population. The results of the stat test for a population effect is given at the top of each panel. Pairwise significant differences are indicated by asterisks. The boxplots represent the median (centre line), the first quartile and third quartile (box bounds), the maximum and minimum excluding outlier points (whiskers), points being the outliers, *i.e.* with values either below the first quartile minus 1.5 fold the interquartile range or above the third quartile plus 1.5 fold the interquartile range.

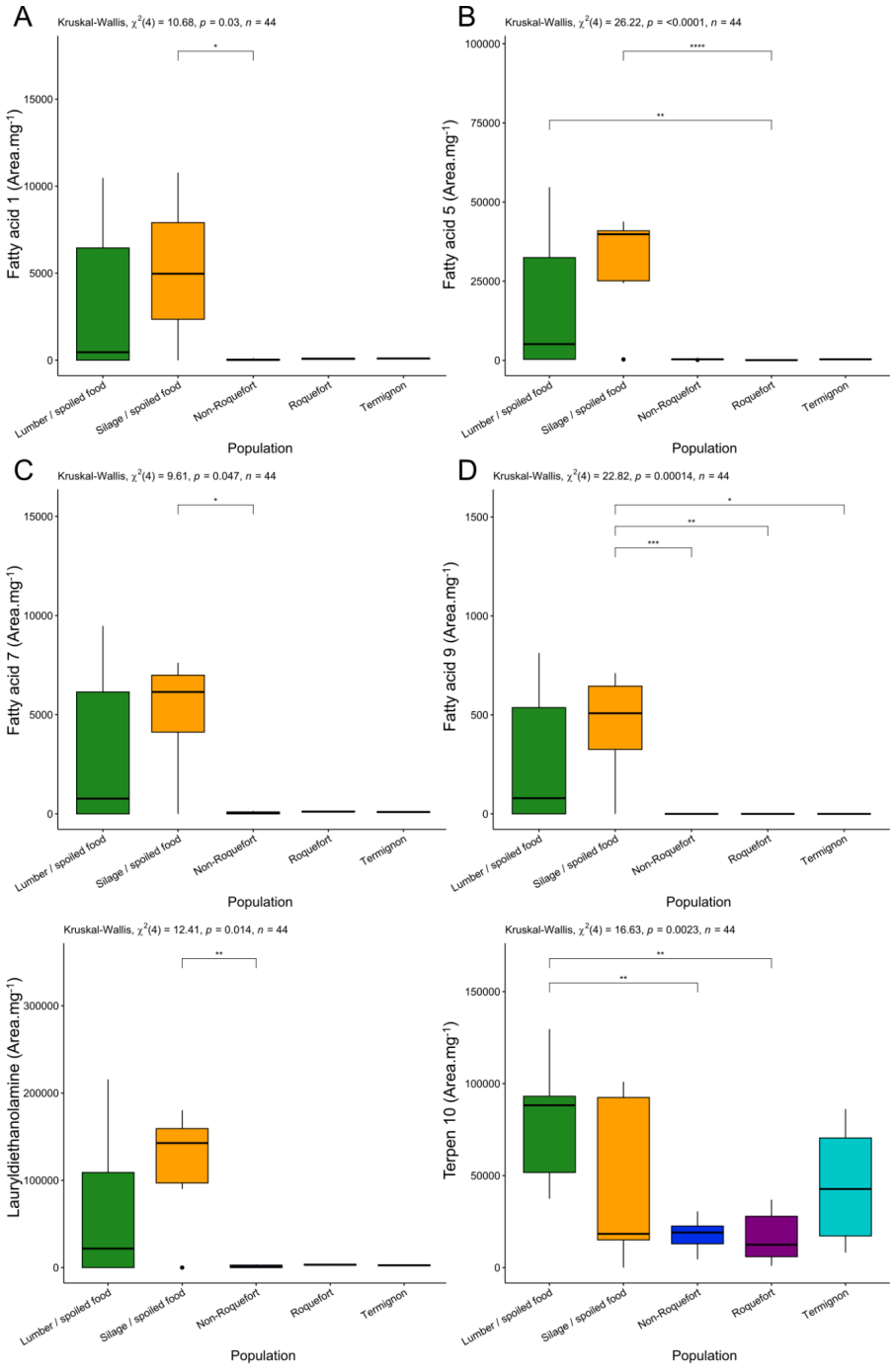



**Figure 3: Production levels of the fatty acids 1 (A), 5 (B), 7 (C), 9 (D), laurylethanolamine (E), and terpene 10 (F) across the five *Penicillium roqueforti* populations.** Production level is expressed as the surface of the peak area of the metabolite per mycelium mass. The different populations were colour-coded as follows: green for the lumber/spoiled food population, orange for the silage/spoiled food population, dark blue for the non-Roquefort cheese population, purple for the Roquefort cheese population and light blue for the Termignon cheese population. The results of the stat test for a population effect is given at the top of each panel. Pairwise significant differences are indicated by asterisks. The boxplots represent the median (centre line), the first quartile and third quartile (box bounds), the maximum and minimum excluding outlier points (whiskers), points being the outliers, *i.e.* with values either below the first quartile minus 1.5 fold the interquartile range or above the third quartile plus 1.5 fold the interquartile range.

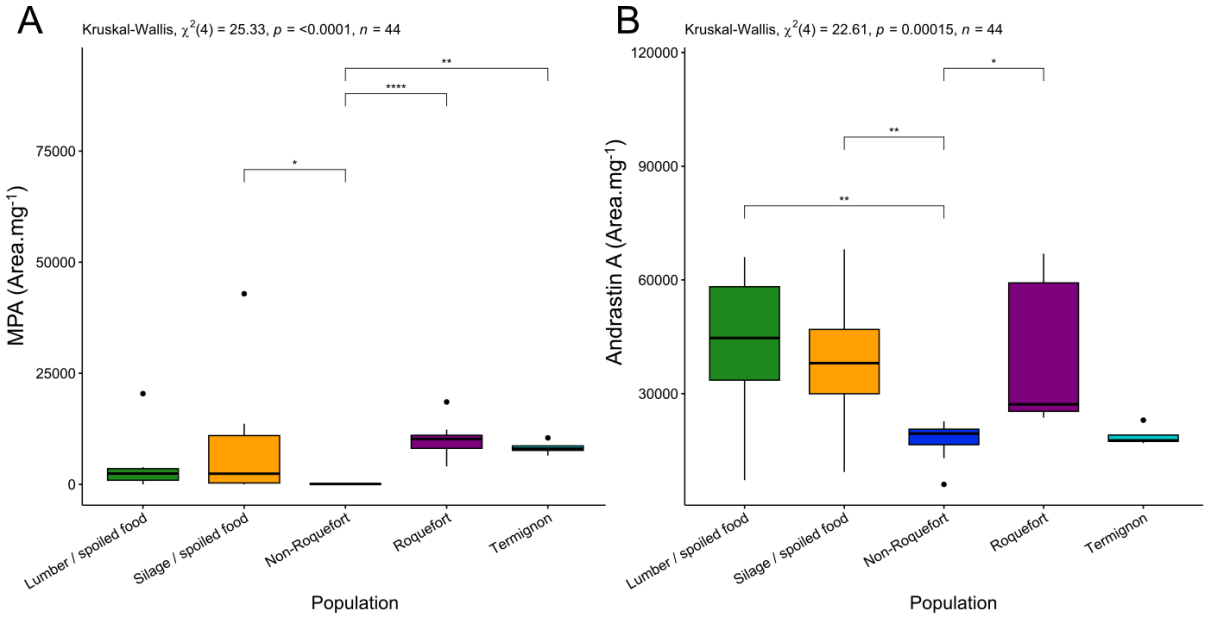



**Figure 4: Production level of mycophenolic acid (A) and andrastin A (B) among the five *Penicillium roqueforti* populations.** Production level is expressed as the surface of the peak area of the targeted metabolite per mycelium mass. The different populations were colour-coded as follows: green for the lumber/spoiled food population, orange for the silage/spoiled food population, dark blue for the non-Roquefort cheese population, purple for the Roquefort cheese population and light blue for the Termignon cheese population. The results of the global test for a population effect is given at the top of each panel. Pairwise significant differences are indicated by asterisks. The boxplots represent the median (center line), the first quartile and third quartile (box bounds), the maximum and minimum excluding outlier points (whiskers), points being the outliers, *i.e.* with values either below the first quartile minus 1.5 fold the interquartile range or above the third quartile plus 1.5 fold the interquartile range.

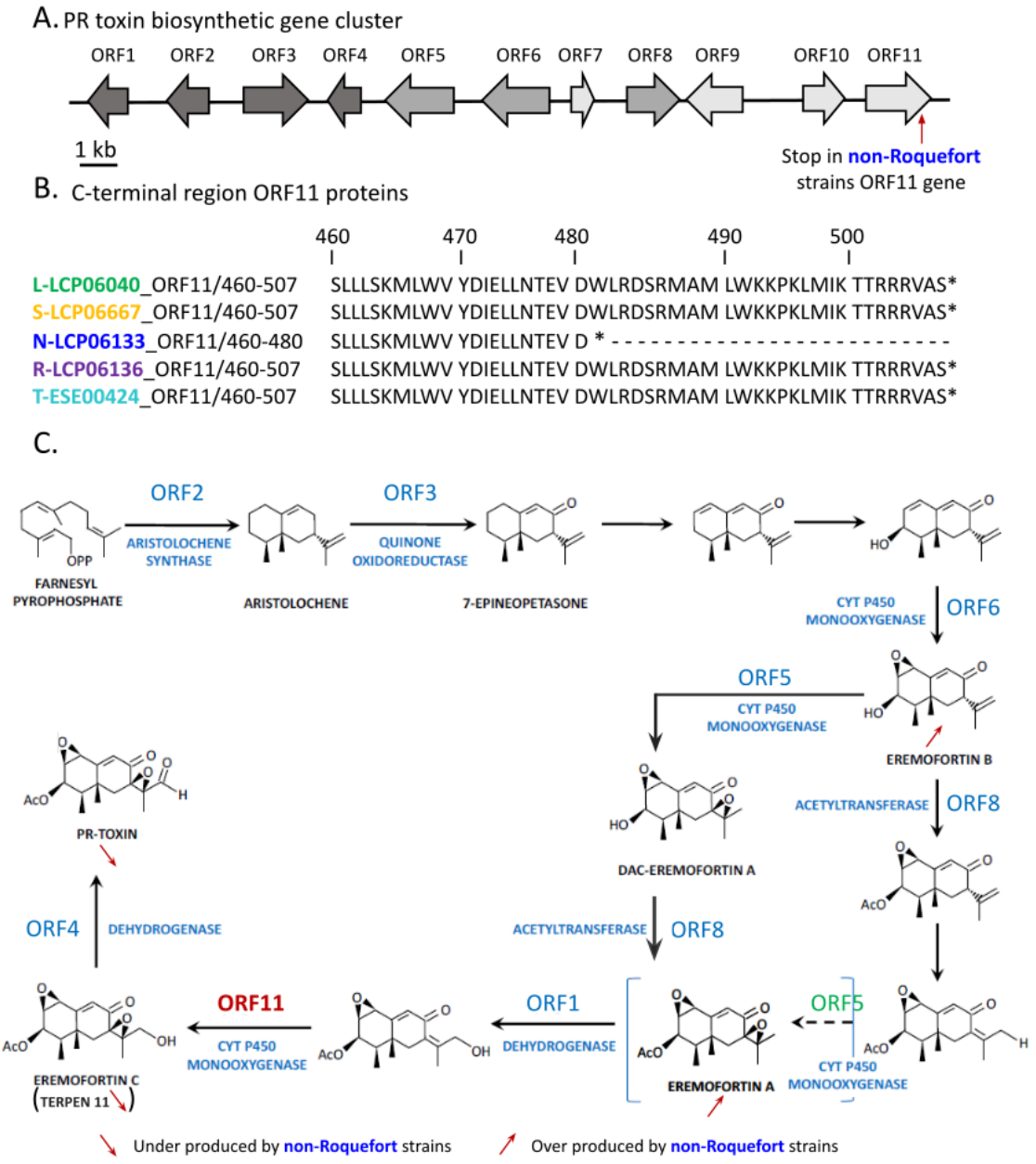


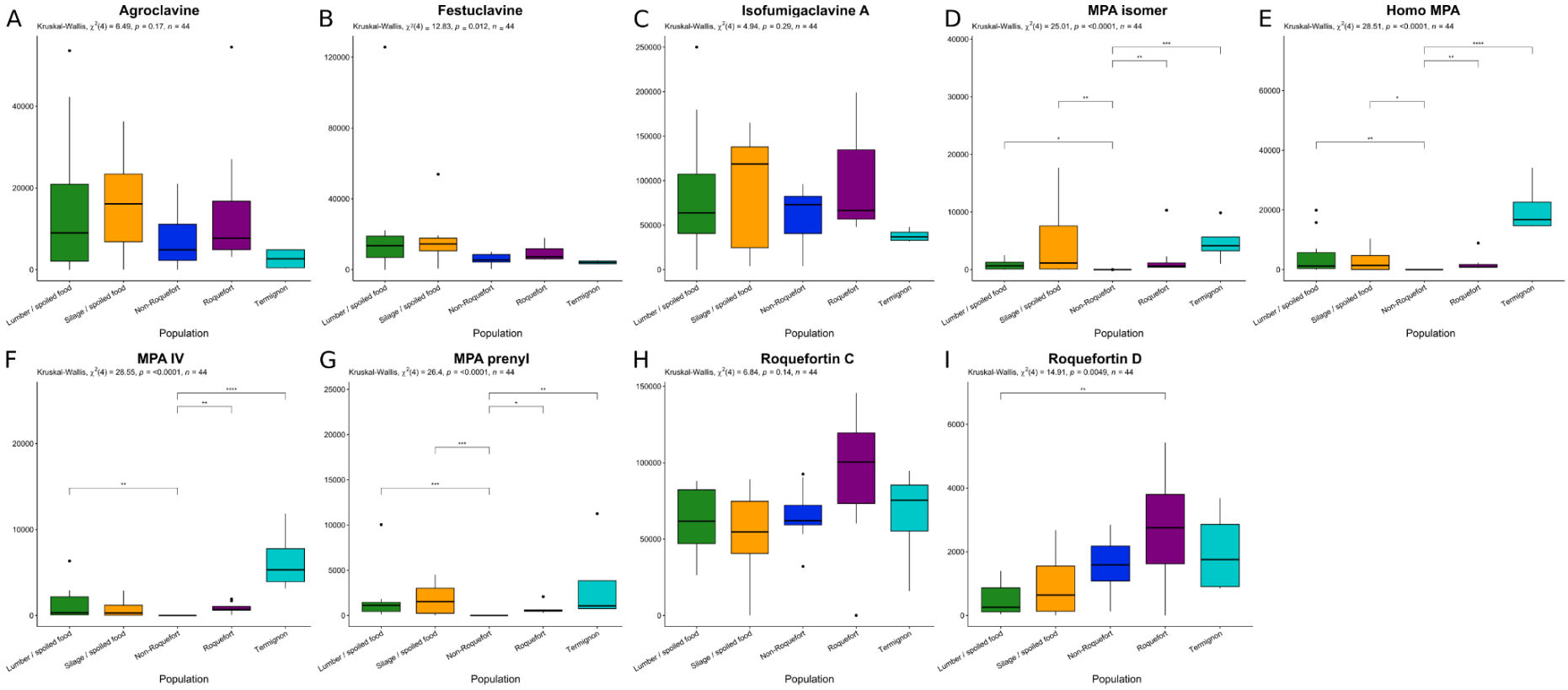

**Figure 5: (A) PR toxin biosynthetic gene cluster in *Penicillium roqueforti* as described in Hidalgo et al (2017).** Gene silenced in Hidalgo et al (2014) are in dark grey, gene silenced in Hidalgo et al (2017) and untargeted genes are in light grey. **(B) C-terminal region of ORF11 protein in strain representing sequenced in their population, "lumber/ spoiled food" in green, "silage/spoiled food" in orange, "non-Roquefort" in blue, "Roquefort" in purple, and "Termignon" in light blue. (C) Proposed position the intervention of ORF11 (red) protein in the PR-toxin production pathway.** Pathway figure adapted from Chàvez et al (2023). Position of ORF 5 is not the one proposed in Hidalgo et al (2017) but coherent with an under production of eremofortin A and PR toxin, and an overproduction of eremofortin B observed when the gene is silenced.

**Table S1: *Penicillium roqueforti* strains used for metabolite profiling, with their IDs, assigned genetic population, sampling origin and date, genome accession number when available and associated reference.**

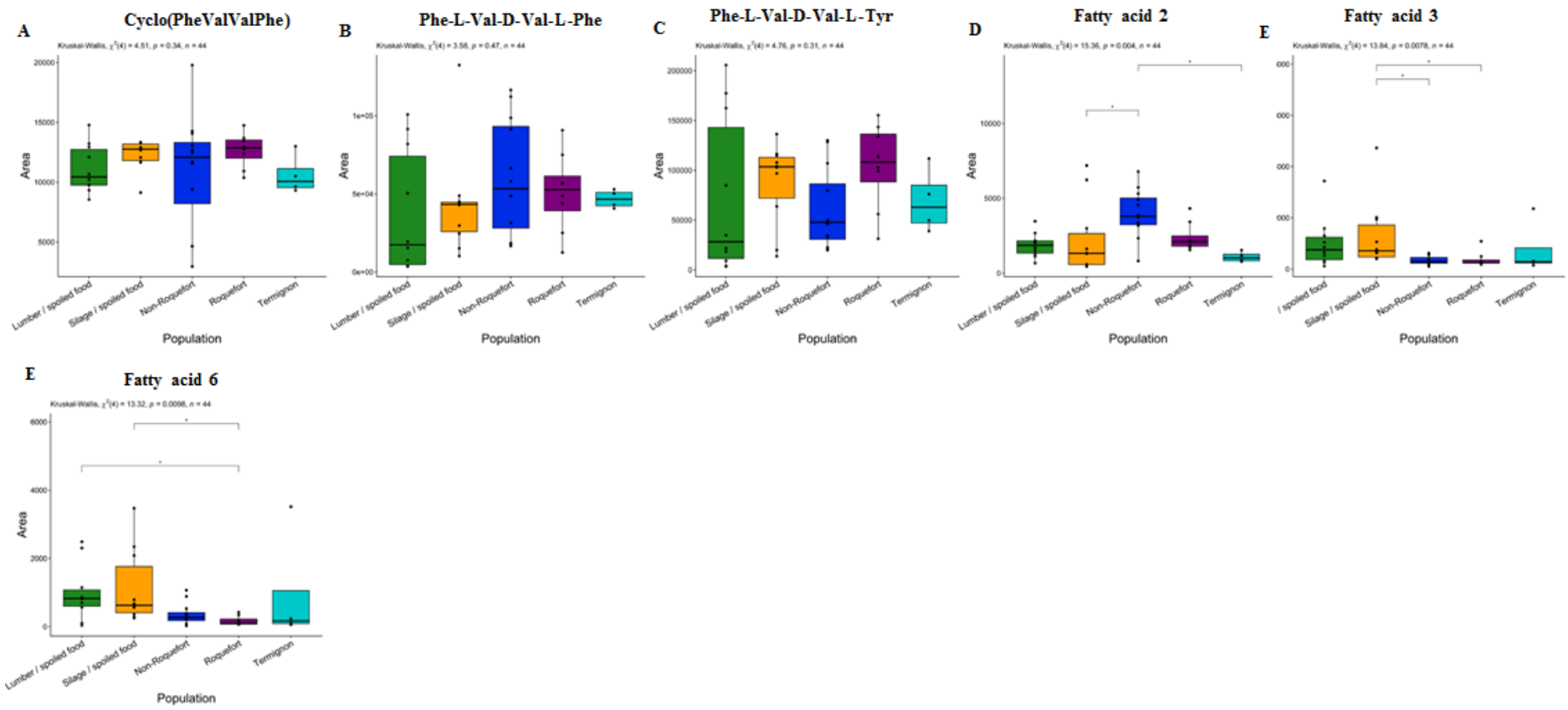
| Strain code | Short ID | Population | Sampling matrix | Sampling country | Sampling date | Genome accession number | Reference |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| LCP06040 | L1 | Lumber / spoiled food | Drying Wood | France | 1992 | ERS1628921 | Dumas et al. 2020 |
| LCP05419 | L3 | Lumber / spoiled food | Inner fridge wall | France | Unknown | ERS1628917 | Dumas et al. 2020 |
| LCP06039 | L4 | Lumber / spoiled food | Fruit Compote | URSS | 1973 | ERS1628920 | Dumas et al. 2020 |
| LCP04111 | L5 | Lumber / spoiled food | Wood | France | Unknown | ERS1628914 | Dumas et al. 2020 |
| LCP06060 | L6 | Lumber / spoiled food | Sulphite Liquor | Canada | Before 2014 | ERS1628924 | Dumas et al. 2020 |
| LCP06064 | L8 | Lumber / spoiled food | Mouldy baker's yeast | Denmark | Unknown | ERS1628925 | Dumas et al. 2020 |
| LCP06037 | L9 | Lumber / spoiled food | Drying Wood | France | Unknown | ERS1628919 | Dumas et al. 2020 |
| UBOCC-A-117107 | L10 | Lumber / spoiled food | Apple | Kazakhstan | 1974 | PRJNA933571 | Crequer et al. 2023 |
| UBOCC-A-117110 | L11 | Lumber / spoiled food | Soil | Russia | 1982 | PRJNA933571 | Crequer et al. 2023 |
| UBOCC-A-117111 | L12 | Lumber / spoiled food | Apple | Kazakhstan | 2007 | PRJNA933571 | Crequer et al. 2023 |
| UBOCC-A-117112 | L13 | Lumber / spoiled food | Wood | United Kingdom | 2007 | PRJNA933571 | Crequer et al. 2023 |
| LCP06138 | N2 | Non-Roquefort | Blue Cheese; Cambozola black label | Germany | Unknown | ERS1628936 | Dumas et al. 2020 |
| ESE00422 | N4 | Non-Roquefort | Feta cheese | Australia | Before 2014 | PRJNA933571 | Crequer et al. 2023 |
| LCP06134 | N6 | Non-Roquefort | Blue Cheese; Blue Sunshine | USA | Unknown | ERS1628932 | Dumas et al. 2020 |
| LCP06132 | N7 | Non-Roquefort | Blue Cheese; Stilton | England | Unknown | ERS1628930 | Dumas et al. 2020 |
| LCP00146 | N8 | Non-Roquefort | Blue Cheese; Roquefort | France | Unknown | ERS1628909 | Dumas et al. 2020 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| LCP06129 | N11 | Non-Roquefort | Blue Cheese; Crémeux du Puy | France | Unknown | ERS1628927 | Dumas et al. 2020 |
| FM164 | N12 | Non-Roquefort | Blue Cheese; Gorgonzola | Unknown | Unknown | HG792015-HG792062 | Cheeseman K, et al. 2014 |
| UBOCC-A-117088 | N13 | Non-Roquefort | Cacao nuts | Unknown (Africa) | Before 2012 | To be added upon acceptance | This article |
| UBOCC-A-117091 | N14 | Non-Roquefort | Subglacial water | Norway | 2006 | PRJNA933571 | Crequer et al. 2023 |
| UBOCC-A-117092 | N15 | Non-Roquefort | Blue Cheese; Bleu du Vercors Sassenage | France | 2016 | PRJNA933571 | Crequer et al. 2023 |
| UBOCC-A-118016 | N16 | Non-Roquefort | Irrigation water | France | 2016 | PRJNA933571 | Crequer et al. 2023 |
| ESE00424 | T1 | Termignon | Blue Cheese; Bleu de Termignon | France | 2018 | PRJNA933571 | Crequer et al. 2023 |
| ESE00426 | T2 | Termignon | Blue Cheese; Bleu de Termignon | France | 2018 | PRJNA933571 | Crequer et al. 2023 |
| ESE00428 | T3 | Termignon | Blue Cheese; Bleu de Termignon | France | 2018 | PRJNA933571 | Crequer et al. 2023 |
| ESE00685 | T4 | Termignon | Blue Cheese; Bleu de Termignon | France | 2015 | PRJNA933571 | Crequer et al. 2023 |
| ESE00170 | R1 | Roquefort | Peach | Unknown | 2018 | PRJNA933571 | Crequer et al. 2023 |
| LCP06136 | R2 | Roquefort | Blue Cheese; Great Hill Blue | USA | Unknown | ERS1628934 | Dumas et al. 2020 |
| ESE00425 | R3 | Roquefort | Blue Cheese; Bleu de Termignon | France | 2018 | PRJNA933571 | Crequer et al. 2023 |
| LCP02939 | R5 | Roquefort | Brioche under plastic wrap | Unknown | Unknown | ERS1628911 | Dumas et al. 2020 |
| LCP06130 | R6 | Roquefort | Blue Cheese; Gorgonzola | Italy | 2013 | ERS1628928 | Dumas et al. 2020 |
| LCP04157T | R7 | Roquefort | Blue Cheese; Roquefort | USA | 1987 | ERS1628915 | Dumas et al. 2020 |
| UBOCC-A-113022 | R8 | Roquefort | Blue Cheese; Roquefort | France | 2013 | PRJNA933571 | Crequer et al. 2023 |

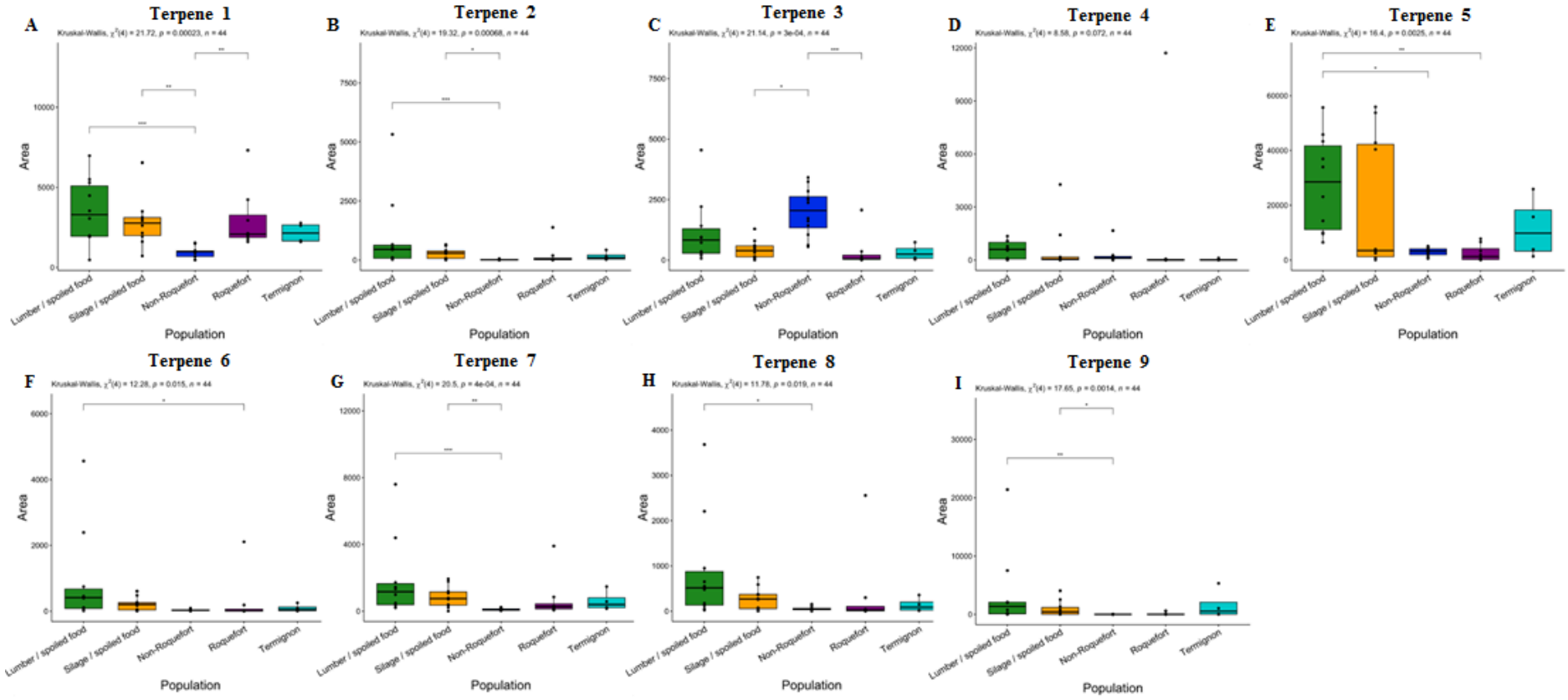
| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| UBOCC-A-1 16029 | R9 | Roquefort | Atmosphere cave | France | 2016 | PRJNA933571 | Crequer et al. 2023 |
| LCP06059 | S1 | Silage / spoiled food | Silage | Netherlands | Unknown | ERS1628923 | Dumas et al. 2020 |
| LCP04180 | S2 | Silage / spoiled food | Strawberry sorbet | France | 1997 | ERS1628916 | Dumas et al. 2020 |
| LCP03969 | S3 | Silage / spoiled food | Fruit Compote | France | 1996 | ERS1628913 | Dumas et al. 2020 |
| LCP06635 | S5 | Silage / spoiled food | Silage | Belgium | 2006 | PRJNA933571 | Crequer et al. 2023 |
| LCP06667 | S7 | Silage / spoiled food | Silage | Belgium | 2007 | PRJNA933571 | Crequer et al. 2023 |
| LCP06679 | S10 | Silage / spoiled food | Silage | Belgium | 2007 | PRJNA933571 | Crequer et al. 2023 |
| UBOCC-A-1 17102 | S12 | Silage / spoiled food | Silage | Belgium | 2011 | PRJNA933571 | Crequer et al. 2023 |
| UBOCC-A-1 17291 | S13 | Silage / spoiled food | Silage | France | 2017 | PRJNA933571 | Crequer et al. 2023 |
| UBOCC-A-1 18017 | S14 | Silage / spoiled food | Flour | France | 2016 | PRJNA933571 | Crequer et al. 2023 |
| UBOCC-A-1 18018 | S15 | Silage / spoiled food | Soft bread | France | 2015 | To be added upon acceptance | This article |
| ESE00421 | L2 | Unassigned | Bread | France | 2019 | PRJNA933571 | Crequer et al. 2023 |



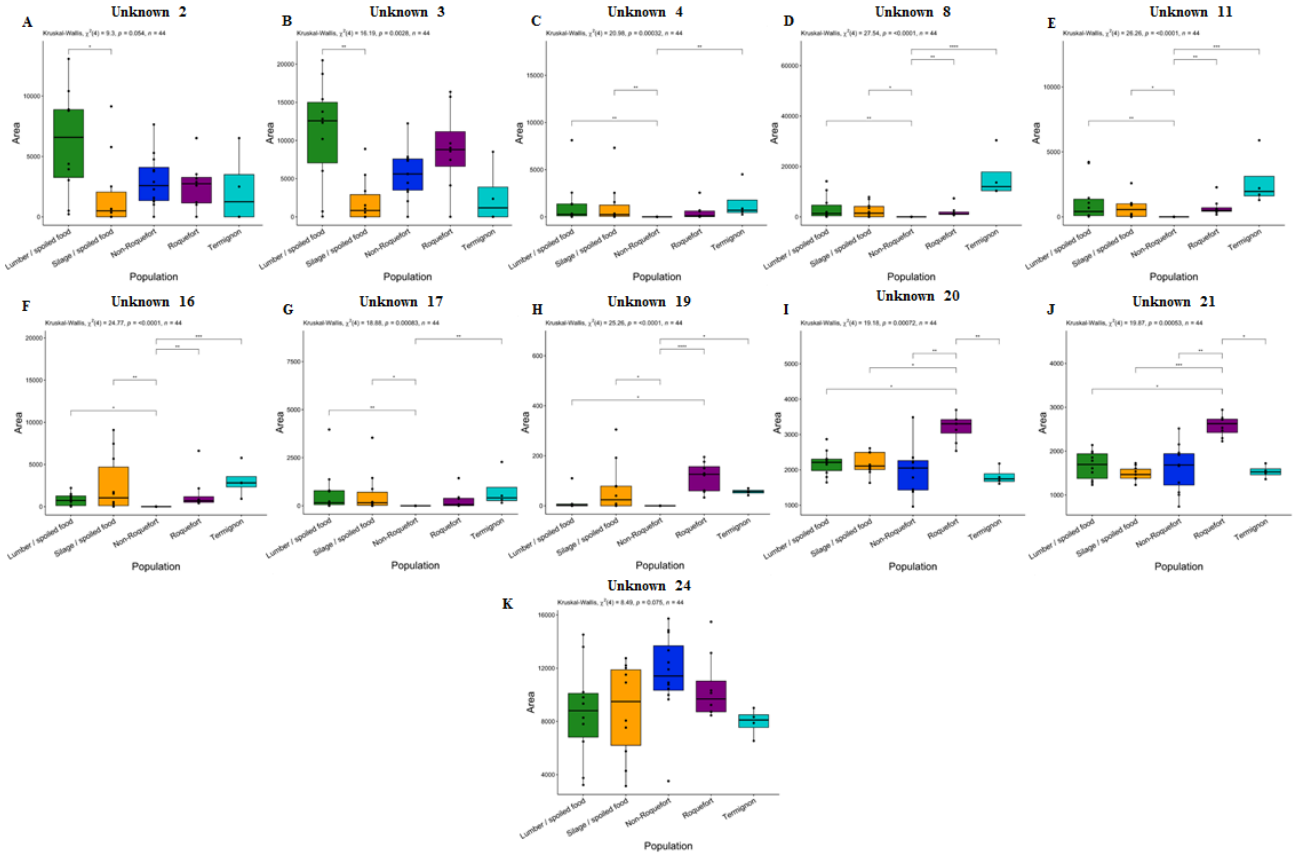

**Supplementary Figure 1: Production level of agroclavine (A), festuclavine A (B), Isofumigaclavine A (C), mycophenolic acid (MPA) isomer (D), homo-MPA (E), MPA-IV (F), -MPA-prenyl (G), roquefortine C and (H) roquefortine D (I) among the five *Penicillium roqueforti* populations.** Production level is expressed as the surface of the peak area of the targeted metabolite per mycelium mass. The different populations were colour-coded as follows: green for the lumber/spoiled food population, orange for the silage/spoiled food population, dark blue for the non-Roquefort cheese population, purple for the Roquefort cheese population and light blue for the Termignon cheese population. The results of the global test for a population effect is given at the top of each panel. Pairwise significant differences are indicated by asterisks. The boxplots represent the median (center line), the first quartile and third quartile (box bounds), the maximum and minimum excluding outlier points (whiskers), points being the outliers, *i.e.* with values either below the first quartile minus 1.5 fold the interquartile range or above the third quartile plus 1.5 fold the interquartile range.




**Supplementary Figure 2: Production level of cyclo-(Phe-Val-Val-Phe) (A), Phe-Val-Val-Phe (B), Phe-Val-Val-Tyr (C), fatty acid 2 (D), fatty acid 3 (E), fatty acid 6 (F), among the five *Penicillium roqueforti* populations.** Production level is expressed as the surface of the peak area of the targeted metabolite per mycelium mass. The different populations were colour-coded as follows: green for the lumber/spoiled food population, orange for the silage/spoiled food population, dark blue for the non-Roquefort cheese population, purple for the Roquefort cheese population and light blue for the Termignon cheese population. The results of the global test for a population effect is given at the top of each panel. Pairwise significant differences are indicated by asterisks. The boxplots represent the median (center line), the first quartile and third quartile (box bounds), the maximum and minimum excluding outlier points (whiskers), points being the outliers, *i.e.* with values either below the first quartile minus 1.5 fold the interquartile range or above the third quartile plus 1.5 fold the interquartile range.




**Supplementary Figure 3: Production level of terpene 1 (A), terpene 2 (B), terpene 3 (C), terpene 4 (D), terpene 5 (E), terpene 6 (F), terpene 7 (G), terpene 8 (H), terpene 9 (I) with formulas in Table 1, among the five *Penicillium roqueforti* populations .** Production level is expressed as the surface of the peak area of the targeted metabolite per mycelium mass. The different populations were colour-coded as follows: green for the lumber/spoiled food population, orange for the silage/spoiled food population, dark blue for the non-Roquefort cheese population, purple for the Roquefort cheese population and light blue for the Termignon cheese population. The results of the global test for a population effect is given at the top of each panel. Pairwise significant differences are indicated by asterisks. The boxplots represent the median (center line), the first quartile and third quartile (box bounds), the maximum and minimum excluding outlier points (whiskers), points being the outliers, *i.e.* with values either below the first quartile minus 1.5 fold the interquartile range or above the third quartile plus 1.5 fold the interquartile range.




**Supplementary Figure 4: Production level of unknow 2 (A), unknow 3 (B), unknow 4 (C), unknow 8 (D), unknow 11 (E), unknow 16 (F) unknow 17 (G), unknow 19 (H), unknow 20 (I), unknow 21 (J), unknow 24 (K) with formulas in Table 1, among the five *Penicillium roqueforti* populations.** Production level is expressed as the surface of the peak area of the targeted metabolite per extract matrix mass and mycelium mass. The different populations were colour-coded as follows: green for the lumber/spoiled food population, orange for the silage/spoiled food population, dark blue for the non-Roquefort cheese population, purple for the Roquefort cheese population and light blue for the Termignon cheese population. The results of the global test for a population effect is given at the top of each panel. Pairwise significant differences are indicated by asterisks. The boxplots represent the median (centre line), the first quartile and third quartile (box bounds), the maximum and minimum excluding outlier points (whiskers), points being the outliers, *i.e.* with values either below the first quartile minus 1.5 fold the interquartile range or above the third quartile plus 1.5 fold the interquartile range.

## C. Principaux résultats

Les résultats principaux de l'étude sont :

- Variabilité plus forte des profils de production de métabolites dans les populations non domestiquées que dans les populations domestiquées (particulièrement la population non-Roquefort), principalement due à une plus grande variété d'acides gras, d'amides d'acides gras et de terpènes produits dans ces populations non-domestiquées.

- Hypotoxigénicité des souches de populations domestiquées liée à une absence de production de MPA dans la population non-Roquefort, et une production de PR toxine en dessous du seuil de quantification dans les populations non-Roquefort et Roquefort.

- Présence de modifications génétiques, à savoir délétion dans le gène *mpaC* (première enzyme intervenant dans la voie pour le MPA) et substitution introduisant un codon STOP prématuré dans le gène "ORF 11" du cluster de gènes associé à la production de la PR toxine, expliquant les précédentes observations.

- Absence de modifications dans le cluster de gènes de la PR toxine pouvant expliquer les observations pour la population Roquefort et suggérant une régulation en cis ou trans

- Révision de la voie de production de la PR toxine via proposition d'intervention du cytochrome P450 codé par l'ORF 11 entre la production d'érémofortine A et d'érémofortine C sur la base de la forte production d'érémofortines A et B, et de la faible production d'érémofortine C (ion candidat associé au terpène 11) et de la PR toxine constatées pour les souches de la population non-Roquefort.

# IV. Chapitre 3 : Cartographie QTL de caractères d'intérêts fromagers chez *Penicillium roqueforti*

## A. Introduction et contribution

Chez *P. roqueforti,* les populations présentent, entre-elles, des phénotypes différents qui peuvent présenter un intérêt pour la production fromagère, parmi lesquels les niveaux de lipolyse, protéolyse, croissance et sporulation mais aussi hypotoxinogénicité (Dumas *et al*, 2020 ; Caron *et al*, 2021, Crequer *et al*., 2023). Les deux populations fromagères utilisées de nos jours présentent chacune peu de diversité génétique et de la dégénérescence. Cependant, elles présentent de grandes différences génétiques et phénotypiques. La mise au point d'une méthode d'induction de la reproduction sexuée chez *P. roqueforti* (Ropars *et al*, 2014, 2016) a ouvert la voie à de nouvelles méthodes d'amélioration variétale tout en réintroduisant de la diversité génétique et phénotypique, contrant ainsi la dégénérescence de ces populations. Pour cela, les approches d'études d'associations de type cartographie QTL sont particulièrement intéressantes pour permettre, par exemple, d'identifier des cibles pour des approches d'amélioration variétale assistée par marqueurs. De plus, *P. roqueforti* présente des avantages pour ce type d'approche, notamment du fait de l'accès à la phase haploïde, de la connaissance de son génome de taille relativement réduite, et des différences génétiques et phénotypiques entre ses populations.

Ce chapitre vise à apporter des éléments de réponse aux questionnements scientifiques suivants :

*Quelles sont les régions du génome responsables des variations phénotypiques d'intérêt, notamment pour la production fromagère (en termes de protéolyse, lipolyse, croissance, couleur et production de métabolites secondaires) ?*

Ces travaux ont été initiés avant la mise en évidence de la population « Termignon » (chapitre 2). Ainsi, sur la base des quatre populations précédemment identifiées (Dumas *et al*, 2020), cinq croisements entre des individus de populations différentes ont été réalisés. Pour cette étude, un séquençage en longues lectures (*long read*) des génomes parentaux des souches Roquefort et non-Roquefort a également été réalisé permettant un assemblage en chromosomes complets pour ces

génomes. L'utilisation de ces génomes et des reads illumina a permis un scaffolding en chromosomes complets pour les génomes des parents ensilage/contaminant et bois/contaminant. Ces assemblages ont permis une comparaison des génomes parentaux. Les descendants de la première F1 des différents croisements ont été phénotypés sur différents caractères (vitesse de croissance, lipolyse, protéolyse, couleur et production de métabolites secondaires), et génotypés en GBS (génotypage par séquençage). A partir de ces données une analyse par cartographie QTL a permis de réaliser les premières cartes génétiques de *P. roqueforti* et d'identifier des régions impliquées dans les phénotypes étudiés, ce qui offre de nouvelles perspectives d'étude des régulations expliquant les variations phénotypiques entre populations et permet d'ouvrir la voie à des approches de sélection assistée par marqueur.

Cette dernière partie fait suite à des travaux engagés avant que je ne commence à travailler sur le sujet de ma thèse. Pour cet article ma contribution a principalement résidé dans une contribution au phénotypage pour la production des métabolites secondaires des six parents et de 470 descendants répartis au sein de trois croisements, l'analyse des données de génotypage par séquençage des cinq croisements, la réalisation de la cartographie QTL des cinq croisements et l'analyse des génomes parentaux.

## B. Article

Ces travaux prennent la forme d'un article intitulé "*Generation of diversity in the blue cheese mold* Penicillium roqueforti *and identification of pleiotropic QTL for key cheese-making phenotypes*" en cours de finalisation.

# Generation of diversity in the blue cheese mold *Penicillium roqueforti* and identification of pleiotropic QTL for key cheese-making phenotypes

Authors:

Thibault CARON[1,3,$], Ewen CREQUER[1,2,$], Mélanie LE PIVER[3], Stéphanie LE PRIEUR[1], Sammy BRUNEL[3], Alodie SNIRC[1], Jean-Philippe VERNADET[1], Gwennina CUEFF[2], Daniel ROUEYRE[3], Michel PLACE[3], Christophe CHASSARD[5], Adeline SIMON[6], Ricardo RODRIGUEZ DE LA VEGA[1], Monika COTON[2], Emmanuel COTON[2], Marie FOULONGNE-ORIOL[4*], Antoine BRANCA[1,7*], Tatiana GIRAUD[1*],

1: Ecologie Systématique Evolution, IDEEV, Bâtiment 680, 12 route RD128, Gif-sur-Yvette, France

2: Univ Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, F-29280, Plouzané, France

3: Laboratoire Interprofessionnel de Production – SAS L.I.P., 34 rue de Salers, Aurillac, France

4: INRAE, MycSA, Mycologie et Sécurité des Aliments, 33882 Villenave d'Ornon, France

5: Université Clermont Auvergne, INRAE, Vetagro Sup, UMRF, 20 Côte de Reyne, Aurillac, France

6: Université Paris-Saclay, INRAE, UR1290 BIOGER, Palaiseau, France

7: Université Paris-Saclay, CNRS, IRD, UMR Évolution, Génomes, Comportement et Écologie, 91190 Gif-sur-Yvette, France

*These authors jointly supervised the study.

$These authors contributed equally to this work.

Corresponding author: Ewen Crequer <Ewen.Crequer@univ-brest.fr>; "Tatiana Giraud" <tatiana.giraud@universite-paris-saclay.fr>;

**Abstract**

Elucidating the genomic architecture of quantitative traits is essential for our understanding of adaptation and for breeding in domesticated organisms. *Penicillium roqueforti* is the mold used for the maturation of all types of blue cheeses worldwide, contributing to flavor and aroma through proteolytic and lipolytic activities. The two main domesticated cheese populations have lost most of their genetic diversities, but are differentiated and carry opposite mating types. We produced haploid F1 progenies from five crosses, between parents belonging to the Roquefort and non-Roquefort cheese populations or to the silage and lumber/spoiled food populations. Analyses of high-quality genome assemblies of the parental strains revealed chromosomal rearrangements corresponding to five large translocations, two having occurred via a circular intermediate. The offsprings were genotyped with GBS (genotype-by-sequencing) and genetic maps indicated homogeneous crossing-over distributions along chromosomes, except in the translocated regions. Several genomic regions showed segregation distortion, possibly linked to degeneration in cheese lineages. We found transgressions for several traits relevant for cheese making, with offspring having more extreme trait values than parental strains. We identified quantitative trait loci (QTLs) for colony color, lipolysis, proteolysis, extrolite production, including mycotoxins, but not for growth rates. Some genomic regions appeared rich in QTLs for both lipid and protein metabolism, and other regions for the production of multiple extrolites, indicating that QTLs have pleiotropic impacts. Some QTLs corresponded to known biosynthetic gene clusters, such as for the production of melanin or extrolites. F1 hybrids constitute valuable strains for cheese producers, with new traits and genetic diversity, and allowed identifying target genomic regions for traits important in cheese making, paving the way for strain improvement and innovations for cheese production. The findings further contribute to our understanding of the genetic mechanisms underlying rapid adaptation of organisms to a new environment. The detection of the same QTLs between independently domesticated *P. roqueforti* lineages, and with pleiotropic effects, suggests convergent adaptation targeting major regulators.

Keywords: genetic map, filamentous fungi, translocation, chromosomal rearrangements, breeding, yeast, food, Starship

**Introduction**

Most traits of agricultural or evolutionary significance are quantitative and genetically complex, involving multiple genes that interact with one another and the environment (Falconer & Mackay, 1995). Genomic loci showing diversity associated with quantitative trait variation are called QTLs, for "quantitative trait loci". Domesticated species are good models for understanding such genomic architecture of traits involved in adaptation. Indeed, they have been subjected to recent and strong selection on known traits, and display highly contrasting phenotypes compared to wild populations, as well as between different domesticated varieties. In addition to the fundamental interest in understanding the genomic basis of adaptive changes, the agronomically important traits targeted for genetic improvement generally follow quantitative inheritance.

In the QTL mapping approach, genotyping and phenotyping of progenies allow assessing statistical associations between genotypes and phenotypes and thereby identifying genomic regions affecting traits of interest (Falconer & Mackay, 1995). The QTL approach has largely advanced our understanding of the genomic architecture of important traits, for example in crops and cattle (Kumar *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2014; Adamczyk *et al.*, 2013). Studies of the genomic architecture of adaptation in crops have revealed that traits involved in domestication were often controlled by only a few QTLs with pleiotropic effects, often being major regulators (Telias *et al.*, 2011; Wirén & Jensen, 2011; Wang *et al.*, 2010; Sweeney & McCouch, 2007; Wright, 2015; Wright *et al.*, 2015; Baach *et al.*, 2008; Johnsson *et al.*, 2014; Baklava *et al.*, 2010; Andargier *et al.*, 2014; Kongjaimun *et al.*, 2012; Kantar *et al.*, 2017; Somta *et al.*, 2020; Bomblies & Doebley, 2006; Martìnez-Ainsworth & Tenaillon, 2016). The most emblematic example is the *teosinte branched 1 (tb1)* locus in maize, that determines apical dominance as well as other domestication traits, which is due to a transposable element insertion in a regulatory region (Doebley, Stec & Hubbard, 1997; Martìnez-Ainsworth & Tenaillon, 2016).

Domesticated fungi used for food production, such as *Saccharomyces cerevisiae* for fermentation, filamentous fungi for cheese maturation or the button mushroom *Agaricus bisporus* for direct human consumption, also represent good models for understanding the genomics of adaptation, in particular as they have small and compact genomes (Gladieux *et al.*, 2014). QTL mapping proved to be an efficient tool for identifying the genes affecting phenotypes impacting technological performances of industrial yeast strains, such as thermotolerance, chemical resistance, dehydration stress tolerance, and phenotypes associated with the fermentation process, such as volatile compounds production, ethanol production, in nitrogen-limited fermentations and in nitrogen consumption and utilization (Nguyen *et al.*, 2022; Kessi-Pérez *et al.*, 2020; Eder *et al.*, 2018; Wilkening *et al.*, 2014; Swinnen *et al.*, 2012; Liti & Louis, 2012; Steinmetz *et al.*, 2002). In addition to classic QTLs, traits have also been reported to be impacted in yeasts by aneuploidy (Todd, Forche & Selmecki, 2017) and genomic rearrangements

(Zimmer *et al.*, 2014). QTL mapping has also been successfully used in the button mushroom *A. bisporus,* for identifying the genomic regions controlling color and spore number (Foulongne-Oriol *et al.*, 2012; Imbernon *et al.*, 1996), in the causal agent of the cereal disease *Fusarium* head blight, *Fusarium graminearum*, for identifying the genetic determinants of aggressiveness (Laurent *et al.*, 2021), and in the yeast *Lachancea waltii*, for identifying genomic regions controlling the growth rate in the presence of various drugs (Peltier *et al.*, 2021).

*Penicillium roqueforti* is the mold used for the maturation of all types of blue cheeses worldwide, responsible for the typical blue-veined aspect, and contributing to their specific flavor and aroma, in particular through high levels of proteolytic and lipolytic activities (Moreau, 1980; Cerning *et al.*, 1987; Collins *et al.*, 2003). When this study was performed, four populations had been identified in *P. roqueforti,* two populations being used to produce cheeses and two populations being found in molded silage and lumber or in spoiled food (Dumas *et al.*, 2020). The two populations used for cheese maturation each show footprints of bottlenecks and a domestication syndrome, with phenotypes contrasting with those of the non-cheese populations and beneficial for several important aspects of cheese safety, appearance and flavor (Dumas *et al.*, 2020; Caron *et al.*, 2020; Crequer *et al.*, 2023). The two cheese populations each correspond to a clonal lineage, with contrasted phenotypes and diversity levels between each other, and inoculated in different types of cheeses, *i.e.* Roquefort PDO (protected designation of origin) versus other blue cheeses (Gillot *et al*., 2015; Dumas *et al.*, 2020). The *P. roqueforti* cheese populations produce cheeses with higher percentages of blue area and with higher quantities of desired volatile compounds than non-cheese populations (Caron *et al*., 2020).

The Roquefort population, found in Roquefort PDO cheeses, displays some level of genetic diversity and exhibits traits beneficial for pre-industrial cheese production,*e.g.* slower growth in cheese models and greater spore production on bread, the traditional multiplication medium (Gillot *et al.*, 2017; Dumas *et al.*, 2020). The Roquefort population also produces higher quantities and more diverse positive aromatic compounds in cheeses, which is due to its faster and different proteolysis and lipolysis activities (Caron *et al.*, 2020; Dumas *et al.*, 2020). In addition, the Roquefort population produced cheese with lower water activity, which could restrict spoiler microorganisms (Caron *et al.*, 2020). Lipolysis and proteolysis are important traits in *P. roqueforti,* involved in cheese maturation, yielding the specific volatile and metabolic compounds responsible for the desired strong and spicy blue cheese flavors (Cerning, 1987; Collins *et al.*, 2003; Gillot *et al.*, 2017).

The other cheese population, *i.e.* non-Roquefort, is constituted by a single clonal lineage, due to a recent strong selection for a single "performant" strain, and is found in all types of blue cheese worldwide except Roquefort PDO, and display phenotypes more suited for industrial cheese production, such as the production of volatiles important for aroma and flavor, *e.g.* methyl ketones (Caron *et al.*, 2020), a more efficient cheese cavity colonization ability and higher tolerance to salt, to

acidic pH and to lactic acid compared to other populations (Dumas *et al.*, 2020; Ropars *et al.*, 2020; Crequer *et al.*, 2023). The non-Roquefort clonal lineage acquired large genomic regions by horizontal transfers (Dumas *et al*., 2020; Ropars *et al*., 2015), mediated by giant Starships mobile elements, (Gluck-Thaler *et al*., 2022), which encompass genes with functions in lactose metabolism or competition against other microorganisms. The non-Roquefort lineage further displays footprints of positive selection in genes involved in volatil compound production (Dumas *et al.*, 2020) and has lost the ability to secrete the mycophenolic acid (MPA) mycotoxin, an immunosuppressant used for preventing transplant organ rejection (Matas *et al*., 2013), because of a deletion in a key gene (mpaC) of its biosynthesis pathway (Gillot *et al*., 2017; Coton *et al*., 2020). *Penicillium roqueforti* can secrete other metabolites, *i.e.* extrolites, including some being considered as toxins (*e.g.* Roquefortine C and PR toxin), found in variable concentrations in blue cheeses, although not causing acute health hazards (Scott, 1981; Fontaine *et al.*, 2015; Hymery *et al.*, 2017). Other *P. roqueforti* extrolites can be of interest, such as andrastin A and Iso-fumigaclavine A, potential antitumor compounds (Ge *et al.*, 2009; Matsuda *et al.*, 2013). These active compounds may be used by the fungus in the competition against other microorganisms (Jakubczyk *et al.*, 2020; Conrado *et al.*, 2022), and thus avoid cheese spoilage, although little is known on these aspects.

Recently, a third cheese population has been identified in *P. roqueforti*, found in Termignon cheeses, which are naturally colonized by this mold and produced using artisanal practices in the French Alps (Crequer *et al.*, 2023). This Termignon population displays intermediate phenotypes between cheese and non-cheese populations, and exhibits higher diversity (Crequer *et al.*, 2023), but has only been identified after the present study had been performed. The two non-cheese *P. roqueforti* populations are found in other anthropized environments, one population occurring mainly in silage and to a lesser extent in spoiled food, hereafter named the silage population, and the second one mainly in spoiled food and to a lesser extent on lumber.

Identifying the genomic regions controlling the phenotypes contrasting between the four *P. roqueforti* populations thriving in different niches would have important fundamental implications for our understanding of the genomic architecture of adaptation and also applied consequences for strain improvement by marker-assisted selection in progenies. However, because of the clonal population structure of the two domesticated cheese lineages, it is not possible to identify the genetic determinants of important traits for cheese making through phenotype/genotype association without generating a recombinant population, which would also allow generating genetic and phenotypic diversity from the two single clonal lineages used in most blue cheeses worldwide (Dumas et al., 2020). Fortunately, sexual reproduction can be induced in *P. roqueforti* (Ropars *et al.*, 2014), the two cheese lineages carry opposite mating types, and some strains have retained some level of sexual fertility, despite the general degeneration in sexual reproduction ability in the cheese populations (Ropars *et al.*, 2016). As the life

cycle of *P. roqueforti* has a dominant haploid phase, direct access to this phase allows association genetics to be carried out on first-generation offsprings.

Here, we therefore aimed at generating diversity in cheese P. roqueforti populations and at identifying the genomic regions controlling the phenotypic differences between the non-Roquefort and Roquefort lineages and more generally between *P. roqueforti* populations. For this goal, we produced five sexual F1 haploid progenies by crossing six fertile haploid *P. roqueforti* strains from the four originally identified populations at the beginning of the study, focusing particularly on the cross between the two cheese populations, Roquefort and non-Roquefort. We studied in the progenies several phenotypes important for cheese making, *i.e.* lipolysis, proteolysis, growth, color and the production of the main known extrolites: Roquefortine C and PR toxin, with its intermediates Eremofortins A and B, as well as metabolites with lower toxicity risk, *i.e.* andrastin A, (iso)-fumigaclavine A and MPA (Coton *et al.*, 2020 ; Chàvez *et al.*, 2023). Depending on the desired cheese product, different values may be wanted for the various traits analyzed. For example, slower growth, lipolysis and proteolysis may allow to store cheeses longer without product degradation, while faster lipolysis may contribute to stronger aromas and faster growth to bluer cheeses (Caron *et al.*, 2020). We analyzed 1073 offspring with single nucleotide polymorphisms (SNPs) obtained using genotype-by-sequencing (GBS). Because genotyping revealed the presence of the two parental alleles in some genomic regions in the otherwise haploid offspring, we also generated high-quality genome assemblies for the parental strains, to compare the parental genomes and identify genomic translocations. We built genetic maps and ran QTL analyses to identify the genetic architecture of the phenotypes important for cheese making.

## Results

### Five fertile cross involving at least one cheese strain

We chose the five most fertile crosses among 17 trials involving in each case at least one cheese strain. We identified the isolated spores that were actually recombinant ascospores and not asexual conidia by using 11 microsatellite markers. We focused on the cross between the two cheese populations, *i.e.* Roquefort (R) and non-Roquefort (N), as it may be the most interesting for strain improvement in the cheese making context, and we isolated 387 recombinant offsprings (Table CRO). The other crosses each involved a cheese strain and a strain from a non-cheese population, either silage (S) or lumber/food spoiler populations (L) and we isolated between 157 and 185 recombinant offsprings for each of these four crosses (Table CRO).

### Transgression and heterosis in phenotype distributions

We measured several phenotypes important for blue cheese production, *i.e.,* mycelium growth, colony color, lipolysis, proteolysis and extrolite production. We analyzed nine variables summarizing these traits in the five progenies, plus seven traits related to extrolite production in three crosses, resulting in 66 trait distributions (9x5+7x3). Among these 66 distributions, 28 did not significantly deviate from normality, 10 best fitted a unimodal distribution, and 30 a bimodal distribution (Supplementary Figures DIS-HER and DIS-MIC; Supplementary Table MOD). None of the phenotype distributions were trimodal or amodal (Supplementary Table MOD).

The distribution of the five progenies on the principal component analysis based on trait values (Supplementary Figure PCA) shows that they represent overall a higher phenotypic diversity than each cross considered separately. A few traits appeared positively or negatively correlated (Figure PHE D), some associations being expected, such as between color traits (*e.g.* blue and red) or between the production of different targeted extrolites (Marcano *et al.*, 2023; Torrent *et al.*, 2017; Rojas-Aedo *et al.*, 2018; Gillot *et al*., 2017). Other associations were more surprising, such as the negative correlation between proteolysis rate on the one hand and green and hue level on the other hand (Figure PHE D).

We found heterosis in the progenies, computed as the difference in mean trait values between the parents and their progenies (Supplementary Table HET). Out of the 66 phenotype distributions, 53 displayed significant positive or negative heterosis. We found negative heterosis in all crosses for the production of PR toxin (the most toxic *P. roqueforti* mycotoxin) and andrastin A, indicating that progenies produced on average less of these two extrolites than their parent mean, which can be beneficial for cheese making. In contrast, we found positive heterosis in all crosses for MPA production, a less toxic extrolite. All tested phenotypes exhibited both positive and negative transgressions across all crosses, *i.e.* with some offspring displaying higher values and others lower values than either parent, which holds promise for the generation of phenotype diversity and strain improvement. We found a large proportion of offsprings with low or no PR toxin production in the RxN and SxN crosses. We detected in all crosses negative transgression in Roquefortine C production and many offsprings with no MPA production, which is promising for the selection of hypotoxinogenic strains.

**High values of phenotype heritability**

**Narrow-sense heritability (h2) represents the part of phenotypic variance explained by additive genetic variance, which is the most easily selected for.**

The narrow-sense heritability of growth rate, lipolysis, proteolysis and color across the five progenies, estimated by regressions of the progeny trait means on the parent trait means, were relatively high, with for example 2/3 of traits with $h^2 > 30\%$ (Table HER). Some estimates were below zero or higher than 100% (Figure PHE), but narrow-sense heritability estimates based on regressions between

offspring and parent trait means may not be highly reliable with only five crosses, and even only three crosses in the case of the targeted extrolites. For extrolite production, we also estimated broad-sense heritability as we measured two replicates for each strain (Supplementary Table HER). The broad sense heritability estimates for extrolite production were high, ranging between 91.3 % for Roquefortine C and 99.6% for isofumigaclavine A, which is promising for selection (Supplementary Table HER).

**Translocations between parental genomes**

The comparison of high-quality genome assemblies revealed five large genomic chromosomal rearrangements between the parents in four crosses (LxN, RxN, RxS, RxL; Figure CIR), which had impacts on genetic maps. These translocations ranged from 60 to 530 kb in size. The two silage parents and the non-Roquefort parent showed syntenic genomes between each other, suggesting that they kept the ancestral arrangement order. We could therefore infer that four of the translocations (L1, L2, L3 and L4) occurred in the lumber population while the fifth one, R1, occurred in the Roquefort population (Figure CIR). We detected no particular transposable element family or clusters at the margin of the translocations or DUF domains specific to Starship elements.

The L1 and L4 regions displayed internal rearrangements between their copies in different genomic locations: the last 3' portion of each of the L1 and L4 regions in the parents with the ancestral arrangement was located in 5' of the L1 and L4 regions in the translocated parent (Supplementary Figure MOB). This internal rearrangement suggests that the translocation occurred via a circular intermediate mechanism, with an insertion cutting site in each of the L1 and L4 regions different from their excision site (Supplementary Figure MOB).

Both parental alleles in the R1 region were found together in 38, 31 and 24 % of the RxN, RxL and RxS offspring in GBS data, respectively (Figure CIR). The Oxford Nanopore long-read mapping depths confirmed the presence of two R1 region copies in the six analyzed offsprings from the RxN cross with both R1 region parental alleles detected in GBS data. Similarly, the long-read mapping confirmed that the five offspring with a single parental allele in GBS data carried a single copy of the translocated region in their genomes. The absence of this translocated region is likely lethal as we did not detect any offspring with no R1 copy, while some recombination events should have generated offspring with none of the two copies. We detected no offspring with both parental alleles nor an absence of the region for the translocations L1 to L4, indicating that both the duplication or absence of these regions lead to inviability.

We checked that the presence of the two R1 copies in haploid genomes was stable after culturing and replication of 24 offsprings of the RxN cross carrying the two parental alleles. After cultivating these 24 offsprings from the RxN cross for one week on plates and transferring conidia from the edge of the

colony to new plates 19 times, PCRs showed that the cultivated lineages still carried the two R1 parental alleles. We did not detect any RIP footprints (C-to-T repeat-induced point mutations) in the R1 regions of the six offsprings with a duplicated R1 region and with high-quality genome assemblies. However, RIP footprints would only be expected in the following generation (F2), after a sex event involving genomes with the duplicated region, as RIP is known to occur during the short dikaryotic phase of sexual reproduction in ascomycetes (Galagan & Selker, 2004).

**Genetic maps, recombination pattern and segregation biases**

We identified between 2462 and 2943 reliable markers in the progenies of the five crosses, evenly distributed along the non-Roquefort reference genome. For constructing genetic maps, we excluded redundant markers, *i.e.* those physically close and with identical segregation patterns in a given cross. We thus constructed the genetic maps with 1,448 markers for the RxN cross, and 676 to 785 markers for the other crosses with fewer analyzed offsprings (Table MAP). The genetic maps for the five crosses displayed lengths between 775 and 913 cM, with a mean of 857 cM (Table MAP). We detected four linkage groups in each genetic map, corresponding to the four chromosomes in the parental genome assemblies (Figure MAP). The mean number of crossing-overs per chromosome was 2.15, with a maximum of 2.58 for chromosome 1, the longest chromosome, and a minimum of 1.25 for chromosome 4, the smallest chromosome. The mean recombination rate was estimated between 27.0 cM/Mb and 31.8 cM/Mb, with a mean of 29.8 ± 1.8 cM/Mb (Table MAP). The LxN cross had a particularly low mean recombination rate, mainly due to the presence of two cold spots of recombination on chromosome 1 (indicated by a plateau in the plot of genetic map positions against genomic positions; empty rectangles in Figure MAP), with local recombination rates of 6.7 cM/Mb and 3.1 cM/Mb, respectively (Table MAP). The edges of the two cold spots corresponded to the translocated regions in LCP06039 chromosome 1 (regions L1, L2, L3, Figure CIR and MAP). This is likely due to the inviability of offspring carrying either zero or two copies of the translocated region because of recombination events between their insertion sites (Figure CIR). Other regions with low or no recombination rates corresponded to horizontally transferred regions only present in the reference genome, putative centromeres, translocated and TE-rich regions (Figure CIR and MAP).

In the five crosses, large regions presented segregation biases, with under-representation of alleles from the cheese populations (*i.e.* either from the Roquefort or non-Roquefort parents; Figure QTL). Such segregation biases could allow the purge of deleterious mutations in the cheese clonal lineages, but could also render the selection of valuable alleles in linkage with deleterious alleles in these regions more challenging. The segregation bias against the non-Roquefort parent allele in the second half of chromosome 4 (between 3.5Mb and 4.2Mb) was present in all crosses involving the non-Roquefort parent (Figure QTL) and was very strong (>90% of the alternative allele in all three crosses). Such strong under-representation of alleles from the cheese population in all of these three

crosses can be due to the lower fertility of domesticated populations (Ropars *et al.*, 2016), with likely deleterious alleles accumulated through clonal replication that leads to low viability of the ascospores carrying them. Another segregation bias with strong over-representation (> 90%) of silage parental alleles was found in the RxS and SxN crosses, in chromosome 1 from 4.2 to 4.5Mb (Figure QTL). The under-represented allele, that of the cheese parents, displayed no segregation bias in the other crosses involving the cheese parents (Figure QTL), suggesting that the presence of either a selfish element (*e.g.* a spore killer) or a highly beneficial allele for early growth in the corresponding region in the silage/spoiled food parents rather than a deleterious one in the cheese parent. This interpretation is supported by the over-representation of the silage allele in two different crosses and the lack of bias in the RxL and LxN crosses in this region, while these observations would not be expected if the cheese parents had deleterious alleles in this region. The segregation bias with over-representation of Roquefort alleles at the end of chromosome 1 is likely due to the lack of the R1 translocated region that leads to offspring inviability. Symmetrically, the alleles from the other parent tended to be over-represented at the R1 locus on chromosome 2, but not significantly so. This suggests that the location of R1 may be more advantageous on chromosome 1 than on chromosome 2.

**Detection of QTL with pleiotropic effects**

We investigated QTLs for the nine traits associated with lipolysis, proteolysis, growth, color and for the seven traits associated with extrolite production (Supplementary Table QTL). We found QTLs for all tested phenotypes except for growth rate (Figure QTL; Supplementary Table QTL), indicating that marker-assisted selection for these traits may be performed for strain improvement and diversification. We detected 123 QTLs across all phenotypes and crosses, 109 explaining more than 5% of the variance (hereafter called "major QTLs"). We identified 58 major QTLs for the eight parameters related to lipolysis, proteolysis and color, across the five crosses, with 8 to 17 QTLs per cross, with a mean of 1.3 major QTLs and a maximum of 3 major QTLs per trait and cross. For extrolite production, we identified 13 to 23 major QTLs across the three progenies analyzed for these traits, with a mean of 2.4 and a maximum of 5 major QTLs per extrolite and cross (Table QTLs, Figure QTLs).

The identified QTLs and the direction of their effects were in agreement with the past occurrence of selection for color, proteolysis, lipolysis and extrolite production in cheese populations. We indeed identified QTLs impacting colony color, bluer colonies being associated with cheese parent alleles, and in particular in the genomic region containing the dihydroxynaphthalene-melanin biosynthesis cluster, known to be involved in melanin production (Figure QTL). The cheese parent alleles were also both associated with slower proteolysis and faster lipolysis, in connection with firmer texture and longer cheese storage and the production of typical blue cheese flavors, respectively. We identified QTLs for the production of three extrolites, MPA, PR toxin and Roquefortine C,, the non-Roquefort

alleles being associated with lower production levels (Figure QTL). This is consistent with a selection for bluer color, more efficient lipolysis and less efficient proteolysis in domesticated lineages, as well as lower extrolite production levels.

Most of the major QTL regions presented pleiotropic effects. The 109 major QTLs were indeed not distributed homogeneously across the genome, with, instead, regions carrying clustered QTLs for different phenotypes (Figure QTL, Supplementary Figure PLEIO). We considered as pleiotropic regions those presenting overlaps in QTL regions of at least two different trait classes in a given cross (proteolysis, lipolysis, color and extrolite production). We identified five such regions, among which three regions displayed pleiotropic impact on the four trait classes, *i.e.* proteolysis, lipolysis, color and extrolite production, across the different progenies, and also within some progenies for multiple traits (empty vertical rectangles in Figure QTL, Supplementary Figure PLEIO). For the pleiotropic region on chromosome 2, the Roquefort allele was associated with faster lipolysis and lower proteolysis. This QTL region displayed significant interactions for lipolysis with two other QTLs, in chromosomes 3 and 4; such interactions between loci in determining a trait value constitute positive epistasis. The same region also impacted color. For the pleiotropic regions detected in chromosomes 1 and 3, the non-Roquefort alleles were associated with slower proteolysis, faster lipolysis and bluer colony color (Table QTL, Figure QTL). We further found epistasis for other types of phenotypic traits, particularly between different QTLs controlling proteolysis (Table QTL, Figure QTL). QTL interactions had the same sign (positive or negative) between crosses in some cases and different signs in other cases, indicating that epistatic interactions are dependent on the genetic background. Such epistasis could impair selection, as recombination breaks up allelic combinations, while specific allelic combinations are beneficial under positive epistasis.

We also identified QTLs for extrolite level production, including some outside of their known biosynthesis gene clusters, suggesting that these QTLs correspond to trans-acting regulators. For three extrolites (MPA, PR toxin and Roquefortine C), we identified QTLs with intervals included in their biosynthesis cluster, with non-Roquefort alleles associated with lower production levels. The lower MPA production level associated with the non-Roquefort allele is likely due to the deletion in the *mpaC* gene that was identified in the non-Roquefort population (Gillot *et al.*, 2017 ; Crequer *et al.*, 2024). We also found a QTL in a region including the PR toxin biosynthesis gene cluster, with lower production level of the PR toxin but accumulation of its production intermediates, eremofortins A and B, associated with the non-Roquefort allele at the PR toxin biosynthesis cluster. This suggests a disruption in the cluster driving low production levels of the toxin and accumulation of its intermediates probably due to the premature STOP codon in the ORF 11 of the biosynthetic gene cluster in non-Roquefort population (Crequer *et al*., 2024). The offsprings harboring a non-Roquefort allele for the various biosynthesis gene clusters displayed lower production levels of the two most

toxic *P. roqueforti* extrolites, PR toxin and Roquefortine C, and of the less toxic MPA extrolite, which is consistent with a selection for an hypotoxinogenicity trait in the non-Roquefort population (Fontaine *et al.*, 2015; Hymery *et al.*, 2017 ; Crequer *et al*., 2024). Most of the QTLs associated with extrolite production were not located within their biosynthesis gene cluster, which suggests the implication of trans-acting regulators. These QTLs were often shared between different extrolites, suggesting a co-regulation of their pathways, which could facilitate the selection for low extrolite production in strains bred for cheese production. In particular, isofumigaclavine A production shared five of its eight major QTLs with Andrastin A production, suggesting co-regulation of the production of the two extrolites. We detected QTLs for all tested extrolites, except Roquefortine C, in the two regions containing the R1 insertion sites (Figure QTL), with lower production associated with the presence of the R1 region. Such a QTL clustering suggests the presence of a master regulator of extrolite production in the R1 region. We in fact found an ortholog of a master regulator gene in the R1 region, namely the srk1 gene, regulating osmotic and oxidative responses in *fungi* (Marquina *et al.*, 2022). The selection of offsprings with two R1 regions could allow further decreases in overall extrolite content, and in particular that of the studied mycotoxins in cheese.

We detected an andrastin A QTL next to the Wallaby horizontally transferred region (HTR) in the RxN cross and a proteolysis QTL in the region containing the CheesyTer HTR in each of the SxN and LxN crosses (Figure QTL). Multiple other phenotypes have previously been suggested to be controlled by these HTRs, such as milk sugar metabolism and interactions with other microorganisms (Ropars *et al.*, 2015), but the indel nature of these HTRs may render harder to detect their associations with phenotypes, as markers are lacking in one of the parents.

We also checked whether QTL regions encompassed other regulators known to be involved in extrolite production (*prlaeA,* Marcano *et al.*, 2023, *pcz1,* Gil-Durán *et al.*, 2015, and *sfk1*, Torrent *et al.*, 2017) as well as other essential phenotypes in *P. roqueforti*, such as conidiation or growth rate. We located *pcz1* in the pleiotropic region of chromosome 2, encompassing QTLs for andrastin A production and color, melanin being involved in both color and conidiation (Gil-Durán *et al.*, 2015); *pcz1* could therefore be a candidate for the QTLs controlling andrastine A production and color via expression regulation. While no QTL interval overlapped with *prlaeA*, a QTL region controlling MPA production in one cross encompassed *sfk1*. However, this QTL region overlaps with a shorter MPA QTL present in another cross without *sfk1* in the confidence interval, which suggests no implication of *sfk1* in MPA production variation.

The QTL intervals were too large to identify particular genes or functions beyond the horizontal gene transfers, biosynthesis gene clusters of the targeted extrolites or other *a priori* candidate genes. Indeed, with on average one gene every 3kb in the annotated Roquefort parental strain and a median QTL length of 760 kb, half of the QTL regions are expected to encompass more than 250 genes. We

therefore only tried to identify candidate genes in the smallest QTL intervals explaining more than 20% of the phenotypic variance. We found an enrichment in genes involved in carbohydrate catabolism for a QTL associated with color in the pleiotropic region of chromosome 2 (g3621 to g3634), and a pepsin gene (endopeptidase, g5778) for a QTL associated with proteolysis in chromosome 3. Carbohydrate catabolism and pepsin are of paramount importance for secondary starters, to use the remaining lactose residues to establish themselves early in the cheese matrix (Cerning *et al.*, 1987), and to degrade caseins and therefore to participate in proteolysis (Grippon *et al.*, 1977), respectively.

**Discussion**

In this study, we aimed at generating genetic and phenotypic diversity in the blue cheese fungus *P. roqueforti* by analyzing haploid F1 progenies from five crosses between cheese or non-cheese strains, and identifying QTLs for key traits in cheese making. This will be essential for both strain breeding purposes and for studying the genomic architecture of traits selected during domestication. Generating diversity and reshuffling alleles is crucial as deleterious mutations have accumulated in the two clonal lineages currently used for cheesemaking. Moreover, their low diversity raises concerns for the sustainable use of *P. roqueforti* for cheese making. We successfully generated offspring by crossing strains from different populations of *P. roqueforti*, despite the known low fertility of the cheese populations (Ropars *et al.*, 2016). The progenies displayed a broad diversity for the phenotypes important for cheese making, in terms of growth, color, proteolysis and lipolysis rates, as well as extrolite production, with more extreme trait values than the parents. We detected QTLs for all these traits except growth, often displaying pleiotropic effects. These findings will be highly valuable for strain breeding, and further suggests that humans have domesticated this cheese fungus by selecting major regulators, as reported in crops (Telias *et al.*, 2011; Wirén & Jensen, 2011; Wang *et al.*, 2010; Sweeney & McCouch, 2007; Wright, 2015; Wright *et al.*, 2015; Baach *et al.*, 2008; Johnsson *et al.*, 2014; Baklava *et al.*, 2010; Andargier *et al.*, 2014; Kongjaimun *et al.*, 2012; Kantar *et al.*, 2017; Somta *et al.*, 2020; Bomblies & Doebley, 2006; Martìnez-Ainsworth & Tenaillon, 2016).

*Variability in phenotypes in progenies, with heterosis and positive transgression for most traits*

We found large phenotypic variation, transgression and heterosis in progenies for multiple relevant phenotypes for blue cheese production, *i.e*. mycelium growth, lipolysis, proteolysis and extrolite production. Progenies displayed transgression, with the trait values of some offspring being much more extreme than those of the parents. All progenies also exhibited heterosis, indicating mean trait values in offspring that may be better than the mean value of the parents. Both transgression and heterosis are promising for strain improvement and diversification. Furthermore, we detected QTLs

for most traits, indicating that selection is possible, and even marker-assisted selection. The generation of variation is particularly important in *P. roqueforti*, as the two main cheese populations, Roquefort and non-Roquefort, have lost most of their genetic diversities due to recent bottlenecks followed by strong selection in industrialization times (Dumas *et al.*, 2020). These clonal lineages even degenerate in terms of sexual fertility and probably for other traits of interest for cheese making (Ropars *et al.*, 2016). Sexual reproduction is the only way to purge deleterious mutations that accumulate during clonal propagation. The progeny between the Roquefort and non-Roquefort strains is particularly promising, as a European regulation requires a food safety assessment ("Novel food" law; UE No 2015/2283) for the use of microorganisms for food production except if they have already been used for food before May 1997. The cross of parental strains already used for cheese production for decades should therefore meet the European Union requirements. The other crosses may also be of great interest, even for the European market, as the regulation might be interpreted in terms of species rather than strains, as already done for example in wine and beer yeasts.

*Translocations and segregation biases*

The obtained high-quality genome assemblies led to the identification of five translocations between the parental strains, having occurred independently in three lineages. We also identified offspring carrying twice the R1 rearranged region. For these translocations, we did not find any offspring completely lacking them, indicating that their absence in genomes may lead to offspring unviability. For the L1, L2, L3, and L4 translocations, we detected no offspring with twice the regions either, implying that their duplications are also lethal. We detected lower production levels for the targeted metabolites in offspring carrying two copies of the R1 region. These offspring may therefore be highly valuable for cheese making, especially as the presence and locations of the translocations were stable through multiple replications and culture events. For further improvement, it should however be checked that future crosses with these offsprings will not induce RIP in the duplicated region. RIP footprints (*i.e*. mutations from CA to TA in repeated sequences) have indeed been already detected in *P. roqueforti* (Cheeseman & Ropars *et al.*, 2014).

We detected no particular transposable element types or abundance at the margin of the translocations. In particular, we detected no DUF3435 domain, typical of Starship elements, that move within and between fungal genomes via a circular intermediate (Bucknell & MDonald, 2023) and are involved in horizontal gene transfers in *P. roqueforti* (Gluck-Thaler *et al*., 2022). Nevertheless, the translocations L1 and L4 appeared to have occurred via a circular form. These regions may therefore correspond to a new type of large mobile element with a circular intermediate. These findings reinforce the view that fungal genomes are highly dynamic, with frequent gene movements, within genomes, between individuals or even between species, and that this dynamics contributes to adaptation (Bucknell & MDonald, 2023).

For several translocated regions, either their lack or duplication in genomes led to to unviability, which induced the cosegregation of the two insertion sites, potentially generating linkage drag in future breeding, *i.e.* cosegregation of desired and undesired alleles in progenies. For other translocated regions, only their absence was lethal, and this led to segregation biases in progenies. We detected additional segregation biases, in other genomic regions, mostly with under-representation of the parental strain from the parental domesticated cheese populations. Such biases are likely due to degeneration in the cheese clonal lineages, with alleles less fit than in the wild populations, especially under sexual reproduction and ascospore germination (Ropars *et al.*, 2016). We detected a strong segregation distortion in chromosome 4, with an absence of the non-Roquefort alleles in the progeny. This suggests an unviability of the ascospores carrying the non-Roquefort allele, in agreement with the low fertility of the non-Roquefort population, showing high post-mating sterility, *i.e.* formation of cleistothecia without ascospores (Ropars *et al.*, 2016). The region with segregation distortion in chromosome 4 contained two orthologs of genes involved in sporulation in the *Saccharomyces cerevisiae* yeast, g9043 and g9061 coding for SPS22-like (Coluccio *et al.*, 2004) and RMD1-like proteins (inferred by electronic annotation, UniprotKB-KW; Enyenihi & Saunders, 2003), suggesting that the region contains genes essential for sexual reproduction. The region with segregation distortion in chromosome 4 also included genes with premature stop codons in the non-Roquefort parent, although with either no predicted function or a function with *a priori* no relationship with sexual reproduction (g8973 and g8998). In the case of the RxS and SxN segregation bias in chromosome 1, the under-represented Roquefort and non-Roquefort alleles displayed no segregation bias in the other crosses involving the same Roquefort and non-Roquefort parents. This indicates that the bias depends on the genetic background and may therefore be due to epistatic interactions leading to a deleterious effect or a selfish meiotic drive element (Grognet *et al.*, 2014; Turner & Perkins, 1979).

*QTL identification and the genomic architecture of adaptation*

We identified QTLs for all phenotypes but growth, confirming that selection of these traits for strain improvement can be considered. There were only a few major QTLs per trait and cross, which should facilitate strain breeding. The QTLs for color, lipolysis and proteolysis on the one hand, and for extrolite production on the other hand, clustered in the same genomic regions, suggesting pleiotropy, or clustering of genes with effects on these different pathways. The three pleiotropic regions affecting color, and lipid and protein degradation have the same effects, with faster lipolysis, slower proteolysis and bluer colony color for the cheese strain allele. This is consistent with a selection for a bluer color, stronger flavors and a longer conservation in domesticated lineages of *P. roqueforti* for cheese making. Furthermore, such pleiotropy or gene clustering may render selection for these traits easier or more challenging depending on whether alleles coding for desired and unwanted traits are associated. Actually, pleiotropic regions controlling multiple important traits for cheese making may be the result

of human selection targeting major regulators, and their finding informs on the genomic architecture of adaptation. The control of traits involved in domestication by only a few QTLs and their pleiotropy have been reported in animals and plants, often due to major transcription regulators, human selection having targeted "masterminds" (Martìnez-Ainsworth & Tenaillon, 2016), but also to the genetic determinant of important crop traits being clustered in genomes (Wright, 2015; Kantar *et al.*, 2017). Here we show that such pleiotropic regions are present in two independently domesticated lineages of *P. roqueforti,* with the same type of effect on the phenotype, suggesting evolutionary convergence (Ropars & Giraud, 2022) and selection of major regulators with pleiotropic effects.

Known shared regulators of various secondary metabolites include *prlaeA*, *sfk1* and *pcz1*, their silencing or knock-out decreasing the production of roquefortine C, andrastin A et MPA (Marcano *et al.*, 2023; Torrent *et al.*, 2017; Rojas-Aedo *et al.*, 2018). Over-expression of *pcz1* decreases the production of roquefortine C and andrastin A, and increases the production of MPA; *pcz1* also impacts growth, conidiation and spore germination (Gil-Durán *et al.*, 2015); *pcz1* was found in one of the pleiotropic regions with, notably, an impact on andrastin A production and color phenotype, a phenotype mostly due to conidia pigmentation.

In addition, we found QTL regions containing the biosynthesis gene clusters involved in PR toxin, MPA and roquefortine C production. In the RxS and LxN crosses, we found a QTL affecting the colony color in a region containing the DHN melanin biosynthesis gene cluster, known to code for the production of *P. roqueforti* conidia pigment (Cleere *et al.*, 2024; Seekles *et al.*, 2021). Besides these *a priori* candidates, the QTL analysis did not point to particular genes or regulatory regions, as the regions with significant impacts were large, encompassing many genes, which impaired searching for relevant gene functions. Furthermore, as shown in plant domestication, several important traits have evolved due to transposable element insertions in regulatory regions (Martìnez-Ainsworth & Tenaillon, 2016; Yao *et al.*, 2015), in which case approaches based on gene functions may not be powerful.

*QTLs for desired traits in* Penicillium roqueforti

We observed a large diversity of phenotypes within each of the generated progenies compared to current commercial strains, and an even greater diversity across the five progenies. We detected pleiotropic regions, acting on multiple metabolism traits, which could facilitate or impair the selection for desired combinations of lipolysis, proteolysis and color. The presence of additional QTLs elsewhere in the genome suggests that a finer selection could be possible for one of the traits without affecting the others. Our study thus paves the way for strain improvement and diversification in cheese- making strains.

Toxin production is a concern in *P. roqueforti*, in particular the production of PR toxin and Roquefortine C. The low toxin concentrations found in cheese and the long history of safe consumption of blue cheeses indicate the innocuity of commercial strains in cheese production (Crequer *et al.*, submitted). Nevertheless, selecting strains with even lower toxin production would be of major interest. We found several QTLs with effects on extrolite production. In particular, QTLs in the biosynthesis gene clusters of PR toxin, roquefortine C and MPA indicated that the corresponding non-Roquefort parental alleles decreased extrolite production. This suggests selection for lower toxicity in the domesticated non-Roquefort lineage. In addition, lower production of several extrolites was associated with the duplication of the R1 region. Selection of these alleles could thus further improve the safety of *P. roqueforti* use in cheese production or for new products such as vegan cheese. While toxin production is detrimental for cheese safety, other extrolites can be interesting to produce for medical applications: for example, MPA is an immunosuppressant used for preventing transplant organs rejection (Matas *et al.*, 2013), and andrastin A, a potential antitumor compound (Ge *et al.*, 2009; Matsuda et *al.*, 2013). Our study shows large positive transgression for the production of these extrolites and multiple QTL regions. These results are highly promising to increase their production level.

We detected QTLs for color as well as for protein and lipid degradation. In blue cheeses, lipolysis and proteolysis by *P. roqueforti* influence texture, taste and the production of aromatic compounds, the latter being mainly influenced by lipolysis (Cantor *et al.*, 2004). Currently, the texture and the amount of aromatic compounds in the final product is mostly controlled by the length of the ripening period. A longer ripening time increases the duration of lipolysis and proteolysis in cheeses, leading to a softer texture and the production of more pronounced aromatic compounds in the final product (Cantor *et al.*, 2004). Although the general consumer demand is moving towards milder products (Michel Place, L.I.P. S.A.S. pers. com.), producers aim to develop a range of products with varying degrees of flavor to meet the diversity of consumer preferences (*i.e.* product segmentation). For example, the Carles firm producing Roquefort PDO cheeses generated a new strain (called "Maxime") producing milder cheeses, with lighted blue color, called "Elegance" (https://www.professionfromager.com/salon-virtuel/france/occitanie/article/carles). Another interest of producers is the visual aspect of the cheese, which depends on the initial color of the spores and the ability of the strain to maintain this color in conditioned atmospheres (Fairclough *et al.*, 2011). We identified QTLs for these traits, indicating that selection for strain improvement and diversification should be possible, for example the selection of strains with different colors, and proteolysis or lipolysis activities.

Breeding could thus be performed in *P. roqueforti* using crosses between different populations and then back-crosses to retain only the desired new traits while purging deleterious mutations. It would

thus be possible to use the QTLs identified here for marker-assisted selection, as tested in Saccharomyces cerevisiae for malic consumption (Vion *et al*., 2021) . As *Penicillium roqueforti* is haploid, there is no issue of inbreeding depression and selection is particularly efficient, as there is no dominance effect of masking alleles. Marker-assisted selection is all the more useful in *P. roqueforti* as the assessment of cheese features requires a long and time-consuming process of cheese making with multiple replicates in controlled environments (Caron *et al.*, 2021).

**Conclusion**

We managed to generate F1 offsprings from different crosses, including one between parents from the two cheese populations, and obtained high variability in phenotypes in progenies. This is crucial given the very low diversity currently available in each of the Roquefort and non-Roquefort cheese populations. Despite genomic rearrangements and segregation biases due to deleterious alleles, the QTL approach identified regions involved in important traits for cheese making. The high heritabilities and the QTLs identified for all traits but growth indicate that selection should be efficient for strain improvement. Segregation biases, linkage drag, pleiotropy and genomic rearrangements may however reduce the efficacy of selection.

Further efforts could increase the number of offsprings and use the Termignon cheese population recently discovered in non-inoculated French cheeses produced at a small scale in the Alps, as this population is genetically and phenotypically differentiated from the two other cheese populations (Crequer *et al.*, 2023). With a better understanding of the demands of consumers and cheese producers, association genetics could become a very promising tool for the improvement of *P. roqueforti* strains, increasing blue cheese quality and diversity. Few studies have addressed these questions in the domestication of fungi so far, beyond yeasts and the button mushroom. From a fundamental point of view, identifying the genomic regions controlling traits of interest to humans helps understand the genetic mechanisms behind the adaptation of organisms to their environment. In particular, our findings of similar QTLs between independently domesticated *P. roqueforti* lineages, with pleiotropic effects, indicate convergent adaptation targeting major regulators.

**Materials and methods**

**Progeny production**

The production of progenies was obtained following the protocol in Ropars *et al.* (2014) with some modifications. Six *P. roqueforti* strains (Table CRO) were selected for their fertility as observed in a previous study (Ropars *et al.*, 2016) and based on their phenotypic differences estimated from

proteolysis and lipolysis measurements (Dumas *et al.*, 2020). They were crossed in all possible pairs given their mating types, either MAT1-1 (three strains) or MAT1-2 (three strains) (Table CRO).

For each cross, three Petri dishes were inoculated on an oat medium supplemented with biotin after sterilization (6.4 µg/L; Böhm *et al.*, 2012). On each Petri dish, 5 µL of an uncalibrated spore suspension was used to inoculate agar sections at opposite sites on the Petri dish, located perpendicular to the sections inoculated with aliquots of conidia of the opposite sexual type (Figure PIC A; O'Gorman, Fuller & Dyer, 2009). Petri dishes were sealed with food-grade plastic film and incubated upside down at 19°C in the dark. The contact zone between strains (Figure PIC A) was examined with a binocular loupe and an optical microscope regularly for four to six weeks to check for the presence of cleistothecia (sexual structures). When cleistothecia were found, three to five of them were sampled, crushed with tweezers, and observed under an optical microscope with lactophenol cotton blue dye solution for ascospore detection (Figure PIC B and C). We took the pictures with a Nikon DS-Fi2 camera, on an inverted optical microscope with apodized phase contrast (Nikon France, Champigny-sur-Marne, France). When ascospores were identified, all the cleistothecia of the corresponding Petri dish were collected in a 0.05% Tween-20 water suspension (P1379-100mL Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Because cleistothecia are covered with conidia derived from asexual reproduction, we developed a treatment to kill them before releasing ascospores from cleistothecia. Approximately 500 µL of the cleistothecia suspension was pooled with 500 µL of a commercial 2.6% sodium hypochlorite solution and gently agitated for 20 seconds; then 1 mL of water was added to stop the sodium hypochlorite action. Cleistothecia were washed twice with one-minute centrifugation at 7,000 rpm, removal of the supernatant and resuspension in Tween 20. Then, we crushed cleistothecia with a sterile piston (Piston Pellet Eppendorf, Montesson, France) and filtered residues with a 40 µm filter (cell screen, Greiner, Les Ulis, France). Single-ascospore isolation was carried out with a dilution method on malt extract agar Petri dishes (MEA, Galloway & Burgess 1952).

**Recombinant offspring detection**

We chose five fertile crosses for further analyses (Table CRO). Genomic DNA was extracted from fresh mycelium and conidia suspension after single-ascospore isolation and growth for five days on MEA media using the Nucleospin soil kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). For checking that isolated spores were recombinant offspring and not asexual conidia, we used 11 microsatellite markers (Ropars *et al.*, 2014) labeled with fluorescence, out of which between five and nine were polymorphic depending on the cross. These markers were amplified with the Multiplex PCR kit (Qiagen, Les Ulis, France) using a touchdown program with an initial denaturation of 15 min at 95°C, 35 cycles of 30 s at 94°C, a decrease of 1°C every 90 s from 60 to 50°C, and 60 s at 72°C. The PCR program ended with a final 30 min extension step at 72°C. Genotyping by capillary fractionation electrophoresis was performed at INRAe Clermont-Ferrand (INRAe Platform GENTYANE, Clermont-Ferrand,

FRANCE). The profiles obtained were analyzed with the GENEMAPPER v4.0 software (Applied Biosystem, Villebon-sur-Yvette, France) to detect recombination between parental genotypes. Only strains with recombinant genotypes were retained, *i.e.* carrying alleles from one parent at some markers and alleles for the other parent at other markers.

**Genome sequencing, assembly and analysis**

We generated long-read-based genome assemblies by sequencing the genomes of the LCP06136 parental strains, as well as 24 F1 offsprings, with Oxford Nanopore MinION technology with an R9 flow cell, a high-quality genome assembly of the other parental strain (LCP06133) being available (Crequer *et al.*, 2023). We also generated genome assemblies for the other parents, based on Illumina sequencing and assemblies guided by the Oxford Nanopore assemblies of the LCP06136 and LCP06133 parents.

DNA was extracted from mycelium and conidia with the Nucleospin soil kit for the progeny and with the NucleoBond High Molecular Weight DNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) for the parental strain LCP06136, with mechanical disruption of about 30 mg of lyophilized mycelium with two tungsten beads (3 mm diameter) for 5 min at 30 Hz. The Nanopore library was prepared with the SQK-LSK109 ligation sequencing kit, starting with 1.5 µg DNA, and sequencing was performed in-house with a MinION combined with a MinIT (version 19.06.9), a 72 hour run, and with the Fastcalling basecalling algorithm. The genome of the LCP06136 strain was sequenced alone in a R9 flow cell, whereas the 24 offspring genomes were sequenced in a 12-plex with the Rapid Barcoding Sequencing kit SQK-RBK004. We assessed run quality using Porechop v0.2.3_sequan2.1.1 (Wick *et al.*, 2017), and when necessary, demultiplexed the Nanopore raw reads with the default parameters.

*De novo* assemblies of the genomes were constructed from both Illumina and Nanopore reads. For the LCP06136 parental genome, the raw Nanopore reads were trimmed and assembled with Canu v1.8 (Koren *et al.*, 2017) with the option genomeSize=28m. The assembly obtained with Canu was polished twice with Illumina reads (Dumas *et al.*, 2020) using Pilon v1.24 (Walker *et al.*, 2014) with the default settings. For each round of polishing, Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012; Langmead *et al.*, 2019) was used to align the Illumina trimmed reads with the assembly for polishing with a maximum length (-X) of 1000bp. The Illumina reads were first trimmed with Trimmomatic v0.36 (Bolger, Lohse & Usadel, 2014) with the following options: ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:10 TRAILING:10 SLIDINGWINDOW:5:10 MINLEN:50. Redundant contigs were removed based on a self-alignment using NUCmer version 3.1 (Kurtz *et al.*, 2004). For other parental strains (LCP06037, LCP06039, LCP06043, LCP06059), available Illumina reads (Dumas *et al.*, 2020) were trimmed with Trimmomatic v0.36 (Bolger, Lohse & Usadel, 2014) the same way as previously described, and assembled with SOAPdenovo2 v2.04 (Luo *et al.*, 2012) using the corresponding default size 23 k-mer

length. The assemblies obtained were then scaffolded using Ragout v2.3 with the LCP06136 and the LCP06133 genomes as references (Kolmogorov *et al.*, 2018). For the 24 offspring genomes, the raw Nanopore reads were trimmed and assembled both with Canu v1.8 (Koren *et al.*, 2017) and with Flye version 2.9 (Kolmogorov *et al.*, 2019), and then merged using Quickmerge (Solares *et al.*, 2018). The merged assemblies obtained were polished once with a concatenation of Illumina reads of the parental strain LCP06136 and LCP06133 (Dumas *et al.*, 2020) in the same way as for the LCP06136 parental genome. The obtained assemblies were scaffolded using Ragtag v2.1.0 (Alonge *et al.*, 2022). We evaluated the quality of the final assemblies with Quast v5.0.2 (Gurevich *et al.*, 2013) and their completeness with BUSCO v5.3.2 (Manni *et al.*, 2021) using the eurotiales_odb10 lineage dataset. Based on the quality and completeness, we selected 11 out of the 24 offspring strain assemblies for further analyses.

Transposable elements (TEs) were annotated using the REPET package (https://urgi.versailles.inra.fr/Tools/REPET). The TEdenovo pipeline (Flutre *et al.*, 2011) was used to detect repeated elements in LCP06136 and LCP06133 (https://doi.org/10.57745/SIP7CH) genomes, and to provide consensus sequences. These consensus sequences were classified with PASTEC v1.3 (Hoede *et al.*, 2014), based on the Wicker hierarchical TE classification system (Wicker *et al.*, 2007) and manually curated. The resulting bulk library of consensus sequences was then used to annotate TE copies in the six whole genomes (namely, LCP06136 and LCP06133, LCP06037, LCP06039, LCP06043, LCP06059) using the TEannot pipeline (Quesneville *et al.*, 2005). Repeat-induced point mutations (RIP) in assemblies were detected using the web-based tool The RIPper (Van Wyk *et al.*, 2019).

All final assemblies were formatted (contigs being renamed and ordered in descending order of size), and repeats of the LCP06133 and LCP06136 parental genomes were masked with RepeatMasker v4.1.2 (Smit, Hubley & Green, 2013) after *de novo* repeat detection using RepeatModeler v2.0.2 (Smit & Hubley, 2008). We performed gene annotation on the masked assemblies of the parental strain LCP06136 using the Funnannotate v1.8.9 pipeline (Palmer *et al.*, 2020), with Braker v2.1.6, which uses a combination of the *ab initio* gene predictors Augustus and GeneMark-ET (Brůna *et al.*, 2021). We ran BRAKER twice, first using the BUSCO dataset of proteins eurotiales_odb10 (Manni *et al.*, 2021), and then using the RNA-seq dataset from Punt *et al.*(2020) and mapped using STAR v2.5.4b (Dobin *et al.*, 2013) with the default settings. We combined the results of the two BRAKER runs with TSEBRA (the Transcript Selector for BRAKER; https://github.com/Gaius-Augustus/TSEBRA).

We studied synteny between assemblies by investigating collinearity of one-to-one orthologs along whole genome alignments, using nucmer v3.1 (Kurtz *et al.*, 2004), with 500pb as the minimum match length. We visualized synteny between genomes by plotting one-to-one ortholog links using Circos v0.69-6 (Krzywinski *et al.*, 2009).

**Phenotyping**

We selected four traits for their applied interest in cheesemaking that are easily measurable with precision and at high throughput, for which we assessed the phenotypes in all the isolated offspring obtained for the five analyzed crosses. The growth rate was measured using a ScanStation (Intersciences, Mourjou, France), an incubator for temperature-controlled growth (set at at 22.5°C) taking pictures regularly for each of 100 Petri dishes as well as analyzing images. We spread 5 µL of standardized spore suspension (250 spores/inoculation) on each Petri dish, containing malt medium (Biokar BK045 HA) at 15 $g.L^{-1}$ in source water (Cristalline, Chelles, France), sterilized at 120°C during 15 minutes. The ScanStation took pictures of the Petri dishes right side up on a black background, for five days every 30 minutes, *i.e.* 240 measures per strain (Figure PIC D). The ScanStation estimated the colony area and diameter for each picture, by counting the number of pixels corresponding to the fungal colony. Because the colony diametral growth was near linear when plotted against days (Supplementary Figure REG), we used, as a measure of growth rate, the slope of the linear regression computed with the *lm* function of the base package R software v4.3.2 (http://www.r-project.org/). The coefficients of determination ($r^2$), measuring the fit of the data to a line, are presented in the Supplementary Table RSQ and the linear regression of an offspring with a median $r^2$ in the Supplementary Figure REG. To ensure the robustness of the linear fit, strains with coefficients of determination below 0.98 were not considered in the QTL analysis of this trait (21 of 885, *i.e.* 2.4% of strains filtered out).

The colony color was measured after growth on raw sheep milk powder medium (Biocoop, Paris, France) at 21% in source water, sterilized at 105°C for five minutes, and mixed with 1.7% agar in source water, sterilized at 121°C for 15 minutes. After 13 days of growth, two pictures were taken by the ScanStation under standardized conditions of light and on a white background (Figure PIC F). We recorded for each strain the colony color decomposition using RGB (red, green and blue) and HSB (hue, saturation, and brightness) with ImageJ v1.52n (Schneider 2012; Supplementary Table SCRPT). In the RGB system, the levels of red, green and blue are represented by a range of integers from 0 to 255 (256 levels for each color). In the HSB system, hue ranges from 0 to 360 (0 is red, 120 is green, 240 is blue), saturation and brightness from 0 to 100% (0% saturated is neutral grey, 100% saturated is the full color ; 0% brightness is black, 50% brightness is normal, 100% brightness is white). In order to obtain uncorrelated components from the RGB data, we divided each value by the sum of the three components. For each of these parameters, we recorded average values across all the colony pixels for each strain. For QTL detection, we chose *a posteriori,* among these color parameters, those whose distributions and heritabilities were optimal for QTL analysis (*i.e.* largest and uncorrelated variance); we thus retained the RGB proportion, as well as HSB.

The lipolytic and proteolytic activities of *P. roqueforti* strains were measured *in vitro* following Dumas *et al.* (2020): for each strain, 50 µl of standardized spore suspensions (ca. 2,500 spores/inoculation) were inoculated at the top of a test tube containing agar and tributyrin for lipolytic activity measure (10 $mL.L^{-1}$, ACROS Organics) or semi-skimmed cow milk for the proteolytic activity measure (40 $g.L^{-1}$, Casino). The lipolytic and proteolytic activities were estimated by the degree of compound degradation, which changes the media from opaque to translucent. We measured the distance between the initial mark and the hydrolyzed, translucent front, after 7, 14, 21 and 28 days of growth at 20°C in the dark (Figure PIC E). As lipolysis curves were nearly linear when plotted against days, we estimated the lipolysis rate with a linear regression computed with the R base package function *lm*. Proteolysis profiles appeared less linear but with no clear sigmoid pattern, so we also chose to fit linear models. The coefficients of determination ($r^2$), measuring the fit of the data to a line, are presented in the Supplementary Table RSQ and an example of a linear regression of an offspring with a median $r^2$ in the Supplementary Figure REG.

For extrolite production, we grew fungal cultures in 24-well sterile microplates containing 2 mL of yeast extract sucrose (YES) agar medium buffered at pH 4.5 with phosphate-citrate buffer and characterized by a high C/N ratio to favor extrolite production as previously described (Frisvad & Filtenborg, 1983). For each strain, 1 µL of a calibrated spore suspension ($10^6$ $spores.mL^{-1}$) prepared from a 7-day culture was inoculated in the center of the well. Two replicates per strain were performed for extrolite analyses. The plates were incubated at 25°C in the dark for seven days and then stored at -20°C until extrolite analysis. For extrolite extractions, we used an optimized "high-throughput" extraction method (Lo *et al.*, 2023; Crequer *et al.*, submitted). Briefly, 2g-aliquots (the entire YES culture obtained from a well) were homogenized after thawing samples with a sterile flat spatula then 12.5 mL of acetonitrile (ACN) supplemented with 0.1% formic acid (v/v) was added, samples were vortexed for 30 sec followed by 15 min sonication. Extracts were again vortexed before being centrifuged for 10 min at 5000g at 4°C. The supernatants were directly collected and filtered through 0.45 µm PTFE membrane filters (GE Healthcare Life Sciences, UK) into amber vials and stored at -20°C until analyses. Extrolite detection and quantification were performed using an Agilent 6530 Accurate-Mass Quadropole Time-of-Flight (Q-TOF) LC/MS system equipped with a Binary pump 1260 and degasser, well plate autosampler set to 10°C and a thermostated column compartment. Filtered 2 µL aliquots were injected into a ZORBAX Extend C-18 column (2.1x50 mm and 1.8 µm, 600 bar) maintained at 35°C with a flow rate set to 0.3 $mL.min^{-1}$. The mobile phase A contained milli-Q water + 0.1% formic acid (v/v) and 0.1% ammonium formate (v/v) while mobile phase B was ACN + 0.1% formic acid. Mobile phase B was maintained at 10% for 4 min, followed by a gradient from 10 to 100% for 18 min. Then, mobile phase B was maintained at 100% for 5 min before a 5-min post-time. Samples were ionized in positive (ESI+) electrospray ionization modes in the mass spectrometer with the following parameters: capillary voltage 4 kV, source temperature 325°C,

nebulizer pressure 50 psig, drying gas 12 L.min$^{-1}$, ion range 100-1000 m/z. Target extrolite characteristics used for quantifications are given in Supplementary Table ION and included commercially available extrolites produced by *Penicillium* species, namely andrastin A, eremofortins A & B, (iso)-fumigaclavin A, mycophenolic acid and roquefortine C. Andrastin A, eremofortins A & B and (iso)-fumigaclavin A standards were obtained from Bioviotica (Goettingen, Germany), while all others were from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). All stock solutions were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) at 1 mg.mL$^{-1}$ in amber vials. As the PR toxin was not commercially available, a previously produced purified stock solution (Gillot *et al.*, 2017) without known concentration was used to ensure MPA (mycophenolic acid) and PR toxin were separated (as they have the same mass) as well as linearity of PR toxin quantification. For these analyses, metabolite identification was performed using both the mean retention time ± 1 min and the corresponding ions listed in Supplementary Table ION. We used a matrix-matched calibration curve ($R^2$ >0.99 for all extrolites except 2 >0.96) to confirm linearity the relation between signal area and extrolite concentration with final concentrations ranging from 1 to 10000 ng.mL$^{-1}$ according to the target metabolite and method performance was carried out as previously described (Gillot *et al.*, 2017).

**Statistical analysis on phenotypes**

For phenotype distributions, we performed tests of normality with the *shapiro.test* function of the base package of R software v4.3.2 (http://www.r-project.org/). We ran tests for unimodality with the *dip.test* function of the Diptest package v0.75-7 (Maechler, 2016) and tests for bimodality with the *bimodality_coefficient* function of the Mousetrap package v3.2.1 (Kieslich *et al.*, 2019) with a threshold of 0.555 according to Pfister *et al.*, 2013. We performed the trimodality and amodality tests with the *is.trimodal* and *is.amodal* functions, respectively, of the LaplacesDemon v16.1.6 package (Hall *et al.*, 2021). We computed the average heterosis as ((F1 - MP) / MP) * 100, F1 and MP being the trait mean values of the progeny and the parents, respectively.

We computed the matrix of pearson-spearman correlation coefficients with the R stats package v4.3.2 (http://www.r-project.org/). We produced the violin plots using vioplot v0.4.0 (Adler *et al.*, 2022), ggplot2 v3.4.3 (Wickham, 2016) and reshape2 v1.4.4 (Wickham, 2007) R packages. We performed the principal component analysis (PCA) using the function *PCA* from the R base package, assigning trait means to missing values. Plots were drawn using FactoMineR v2.8 (Lê *et al.*, 2002), factoextra v1.0.7 (Kassambara & Mundt, 2020) and corrplot v0.92 (Taiyun & Simko, 2021) packages.

**Phenotype heritability**

Because we could not perform replicated measurements of phenotypes for each strain for lipolysis, proteolysis, growth rate and color, we only estimated the narrow sense heritability of these phenotypes across the five progenies by performing linear regressions of the five F1 progenies mean trait values on the mean values of the parental pairs using the *lm* function from the R base package. Extrolite production was determined for three crosses (SxN, RxN and RxL), with two replicates for each strain; we therefore estimated broad-sense heritability for these phenotypes for each cross based on variability among replicates, in addition to narrow-sense heritability as for the other phenotypes. Broad sense heritability was determined by performing a one-way ANOVA with the *lm* function of the stats v4.2.1 package in R.

**Genotyping based on indels**

We genotyped 389 offspring from the cross RxN between LCP06136 (Roquefort; MAT1-1; https://www.ebi.ac.uk/ SAMEA103939766) and LCP06133 (non-Roquefort; MAT1-2; SAMEA103939763) with 200 markers with a polymorphism of amplification size between the two parental strains, due to the presence of indels (Supplementary Table IND). Primers were designed (i) to yield an amplicon size between 150 to 410 bp and a difference ranging from six to 20 bp between alleles, (ii) to be compatible in multiplex and (iii) to be evenly distributed along the assembly of the reference genome available at the beginning of the study (FM164; EMBL accession numbers HG792015 to HG792062, Cheesman & Ropars et al., 2014). Indels were detected after a whole assembly alignment (blast v2.9.0; Altschul *et al.*, 1990) of the two parental strains with the gap and extension penalties set to 1. After adding 250 base pairs upstream and downstream from the hit position, we performed a multi-alignment using MAFFT (Katoh, 2002) with the whole genomes of the parental strains of the other crosses. We only kept a consensus sequence generated using consambig (Rice, Longden & Bleasby, 2000) and designed primers using Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012).

To reduce the cost of fluorescence primers, we only used four universal fluorescent primers (M13(-21), D8S1132f, D12S1090f, DYS437f), labeled with different fluorescent dyes (FAM, ATTO550, ATTO565, YAKIMA Yellow; Eurofins, Ebersberg, Germany). The specific primers attached during PCR to universal fluorescent primers thanks to a tail added to each specific primer matching an edge of the universal primers (Schuelke, 2000; Missiaggia & Grattapaglia, 2006). For each locus, the PCR amplification thus required three primers: the forward fluorescent universal primer, the forward specific primer with a 5' tail corresponding to the chosen universal primer and the regular specific reverse primer. The 200 markers were genotyped in 25 multiplex groups of 8 locus organized according to their amplicon size and their color fluorescent dye (Supplementary Table IND). For each multiplex, two separate sets of quadruplex PCR reactions were performed to minimize the interaction between primers and then pooled into octoplexes for the genotyping step. The PCR mix contained 0.16 µM of each of the fluorescent universal primer and of the reverse specified primer and

0.04 µM of the 5' tail forward primer in a final 15 µl reaction volume (2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix with 3 mM $Mg^{2+}$, 10x primer mix with 1.6 or 0.4 µM of each primer, 3 µl of DNA diluted 50 fold) using the same PCR cycle conditions as for the microsatellites loci previously described in the recombinant offspring detection paragraph, except that it started with a hybridization temperature of 62°C instead of 60°C. Genotyping and analysis were also done as previously described in the recombinant offspring detection paragraph.

**Genotyping based on GBS**

For all five crosses, we genotyped the obtained progeny (1073 offsprings in total) at the AGAP CIRAD platform with genotyping-by-sequencing using the *Ape*kI enzyme. DNAs were purified after digestion on QIAquick columns (Qiagen, Les Ulis, France) and their qualities were controlled using a TapeStation instrument (Agilent Technologies, Les Ulis, France). Sequencing was performed on an Illumina Hiseq 4000 (2x150 bp). The following numbers of recombinant offsprings were genotyped by GBS: 384 for the cross RxN, 157 for the cross RxS, 185 for the cross RxL, 176 for the cross SxN and 171 for the cross LxN.

Demultiplexed reads were mapped to the LCP06136 high-quality genome for the crosses RxL and RxS and to the LCP06133 high-quality genome for the crosses RxN, LxN and SxN using *Bowtie2* version 2.3.4.1 (Langmead & Salzberg, 2012; Langmead *et al.*, 2019). In *Bowtie2,* we set the maximum length (-X) to 1000 and used the preset "very-sensitive-local". We used SAMtools v1.7 (Danecek *et al.,* 2021) to sort and filter out duplicate reads and reads with a mapping quality score above ten for SNP calling. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) were called using the GATK v4.1.2.0 Haplotype Caller (McKenna *et al.*, 2010), generating a gVCF file per strain with option ploidy 2 to detect potential duplicated regions in progenies, as we had found indels with two alleles in some offsprings. GVCFs were combined using GATK CombineGVCFs, genotypes with GATK GenotypeGVCFs, and biallelic SNPs were selected after filtration using GATK SelectVariants. We filtered SNPs using GATK VariantFiltration and options QUAL <30, DP < 5, QD < 20.0, FS > 60.0, MQ < 40, 0.05<AF<0.95, SOR > 3.0, MQRankSum < -12.5, ReadPosRankSum < -8.0, DP>5.0 and GQ<10. We generated the genotype matrix based on the VCF file with *Bcftools* v1.11 (Li, 2011; Danecek *et al.,* 2021). Markers with no data or with no differences between the two parental genomes were filtered out. To reconstruct offspring genotypes, we performed SNP calling in the diploid mode in order to detect double copies of translocated regions. Markers corresponding to the translocated regions were in fact called as heterozygous in some offsprings; they were therefore placed in offspring at the two parental locations, which were each assigned the corresponding parental allele.

After performing crosses and isolating ascospores, we detected sectors of two slightly different morphotypes in subsequent cultures of the parental strain LCP06039 aiming at phenotype

measurements. However, genetic data indicated that the cross was performed with a pure strain and not a mixture: (i) the indel genotypes of the two morphotypes were assessed and were identical, and (ii) the GBS genotypes of the two morphotypes were not typed directly, but we did not detect genome-wide segregation distortion in the progeny in GBS data for this cross, while a cross involving a mixture of strains with different genotypes should result in over-representation of the alleles by the pure parent; on the contrary, the segregation distortions detected in some genomic regions corresponded to over-representations of the strain showing two morphotypes rather than its under-representation. We therefore considered that a single strain contributed to the cross and that the two morphotypes were the result of plasticity or a few somatic mutations in a single strain. We therefore built the genetic map and ran a QTL analysis for the LxN cross. For analyses involving parental traits, and therefore potentially affected by the presence of two morphotypes (*i.e.* for heritability estimates and transgression detection) we computed estimates using all three possible values for the LCP06039 parent strain phenotype: the means of the trait values for the two morphotypes or the value of one of the two morphotypes. This did not affect conclusions as the two morphotypes were actually very close for all trait measures.

**Experiment on the stability of genotypes across replication**

As we identified a genomic region with two alleles present in multiple offspring in the RxN cross with associated QTLs, we wanted to check whether this particular genotype was stable during strain culture and across multiple replication steps. We therefore cultivated, on malt agar, the two parental strains from the RxN cross and the 11 offspring for which genomes were sequenced with Nanopore, six with alleles of both parents for this genomic region, four with the LCP06136 parental allele and one with the LCP06133 allele. We cultivated the strains for one week on malt agar and replated them on a new plate by transplanting some conidia from the edge of the colonies. We performed 19 replication steps. In the end, we re-genotyped the lines with the six indel markers present in the rearranged region.

**Linkage map and QTL detection**

The genetic map and statistical tests for QTL association were performed using the R software v3.5.1 (http://www.r-project.org/) with the ASMap v1.0-5 package (Taylor & Butler, 2017) for the genetic map and qtl v1.60 package (Broman *et al.*, 2003) for statistical tests. For the genetic map, we used unique segregating markers with less than 10% missing data and markers with segregation distortion with significant Chi Square p-values adjusted with Bonferroni corrections. Individuals with more than 30% of missing data were filtered out (Table CRO), concerning up to 14% of the offspring of a cross. Linkage groups and marker ordering were determined with the *mstmap* function of AsMap package, with parameter "bychr" set as FALSE and a p.value of $10^{-12}$. Markers with less than 20% missing data and less than 95% of one parental allele were then reintegrated in linkage groups with the *pull.cross*

function with "max.rf" and "min.lod" parameters set at 0.1 and 20, respectively. We reconstructed marker order in linkage groups with the *mstmap* function, the parameter "bychr" set as TRUE, and a p.value of $10^{-12}$. We estimated genetic distances between markers with the AsMap *quickEst* function and the Kosambi's mapping function. We compared the obtained order to the reference genome order using the *compareorder* function of the qtl package with error probability set at 0.005. We changed the order only if it improved the LOD score and minimized the linkage group length. We represented the relationships between chromosome physical positions and genetic maps using ALLMAPS in JCVI utility libraries v1.3.6 (Tang *et al.*, 2015), adapted to include genetic features.

We performed single QTL detection using the *scanone* function of the qtl package v1.6 with the threshold at 5% being estimated with 1000 permutations. We used the *addqtl* function of the qtl package to mask the first set of QTLs and thus detect additional QTLs that may have been hidden by the main ones. We estimated confidence intervals for QTL using the *lodint* function of the qtl package with default parameters. We identified QTL interactions using the *scantwo* function with the Haley-Knott method using a threshold at 5% estimated by 1000 permutations. We performed analyses of variance (ANOVAs) using a linear model with the *fitqtl* function of the qtl package, keeping interactions between loci only when they were significant in both scantwo and the full model AVOVAs. We extended QTL confidence intervals including the first or last marker of a linkage group to the start or end of the corresponding chromosome. For comparisons of QTL interval positions between crosses, we transposed the intervals determined with the positions on the Roquefort parent genomes (for RxL and RxS crosses) onto the non-Roquefort genome. To do this, we extracted genome sequences using bedtools getfasta v2.30.0 (Quinlan & Hall, 2010) and mapped the extracted sequences onto the non-Roquefort parent genome using minimap2 v2.17-r941 (Li, 2018). The representation of the aligned QTL intervals was constructed using the karyoplotR v1.24.0 package (Gel & Serra, 2017).

**Acknowledgements**: This study has been funded by the ANR-19-CE20-0002-02 Fungadapt ANR, ERC Genomefun 309403 Stg, ERC Blue Proof of Concept, Fondation Louis D (French Academy of Sciences) grants, the LIP SAS and the ANRT (Association Nationale Recherche Technologie). TC and ECr acknowledge the E3GP3 network for facilitating collaborations and skills transfer from MF laboratory. We acknowledge the staff at the GENTYANE genotyping platform (INRAe GDEC, Clermont-Ferrand, France) for microsatellite and indel genotyping and the AGAP CIRAD platform for GBS sequencing. We gratefully acknowledge Intersciences for the loan and set-up of the ScanStation (https://www.interscience.com/en/products/real-time-incubator-and-colony-counter/). We also thank Jeanne Ropars for her help in obtaining the progeny.

**Author contribution**

TG, TC, AB, DR, CC and MP designed the study. TG, DR, ECo and MP acquired funding. TC, AS and SLP performed crosses, isolated strains and extracted DNAs, supervised by TG. TC, MLP and SB performed experiments for phenotyping lipolysis, proteolysis and growth rates supervised by CC, DR and MP. TC, AS and SLP performed genotyping and genome sequencing, supervised by TG. ECr and GC performed experiments for estimating the production of extrolites supervised by MC. TC and AS performed the experiment on the stability of genotypes across replication and the Oxford Nanopore sequencing, supervised by TG. TC, ECRs and JPV performed the genomic analyses, supervised by TG, MFO and AB. TC, TG and ECr wrote the first draft of the manuscript. All authors revised the manuscript.

**Table CRO:** Crosses performed using six parental strains of *Penicillium roqueforti* from four different populations (R, for Roquefort, N, for non-Roquefort, L, for lumber/spoiled food, S, for silage/spoiled food) with opposite mating types (MAT1-1 and MAT1-2), the number of isolated ascospores and the number of offsprings phenotyped for growth rate, color, lipolysis and proteolysis rates, and extrolite production. LCP: « Laboratoire de Cryptogamie, Paris ». *The strain LCP06039 was found to be a mixture of two morphotypes ("dark" and "light"), which was detected after the cross had been performed. ¤These offspring have been genotyped with indels, in addition to GBS (genotyping by sequencing).

| Cross | MAT1-1 mating type | | MAT1-2 mating type | | Number of isolated ascospores | Number of genotyped offspring | Number of offspring phenotyped for growth rate | Number of offspring phenotyped for color | Number of offspring phenotyped for lipolysis rate | Number of offsprings phenotype for proteolysis rate | Number of offspring phenotyped for extrolite production |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Population | Strain | Population | Strain | | | | | | | |
| RxN | Roquefort | LCP06136 | non-Roquefort | LCP06133 | 389 | 384¤ | 307 | 311 | 387 | 382 | 274 |
| RxS | Roquefort | LCP06136 | silage/ spoiled food | LCP06043 | 157 | 157 | 157 | 157 | 157 | 156 | 0 |
| RxL | Roquefort | LCP06136 | lumber/spoiled food | LCP06037 | 185 | 185 | 129 | 131 | 150 | 141 | 120 |
| SxN | silage/food spoiler | LCP06059 | non-Roquefort | LCP06133 | 176 | 176 | 92 | 92 | 150 | 150 | 75 |
| LxN | lumber/food spoiler | LCP06039* | non-Roquefort | LCP06133 | 171 | 171 | 91 | 91 | 150 | 151 | 0 |

**Table MAP:** Genetic map characteristics of the five crosses performed using six parental strains of *Penicillium roqueforti* from four different populations (R, for Roquefort, N, for non-Roquefort, L, for lumber/spoiled food, S, for silage/spoiled food), the number of markers, the length of linkage groups and of maps, the average and maximum spacing in cM between markers, the recombination rate in cM/Mb, and the size in Mb, per linkage group and in total.

| Cross | Linkage group | Number of markers | Mean number of crossing overs | Length (cM) | Average spacing (cM) | Maximum spacing (cM) | Mean recombination rate (cM/Mb) | Reference size (Mb) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **SxN** | L.1 | 213 | 2.74 | 274 | 1.3 | 8.8 | 32.21 | 8.51 |
| | L.2 | 242 | 2.49 | 249 | 1 | 12.8 | 29.97 | 8.31 |
| | L.3 | 189 | 1.97 | 197 | 1 | 8.8 | 25.51 | 7.72 |
| | L.4 | 94 | 1.19 | 120 | 1.3 | 8.8 | 28.47 | 4.22 |
| | overall | 738 | 8.39 | 841 | 1.1 | 12.8 | 29.25 | 28.75 |
| **LxN** | L.1 | 161 | 1.98 | 199 | 1.2 | 9.2 | 23.39 | 8.51 |
| | L.2 | 248 | 2.55 | 255 | 1 | 9.2 | 30.69 | 8.31 |
| | L.3 | 164 | 1.95 | 195 | 1.2 | 6.7 | 25.25 | 7.72 |
| | L.4 | 103 | 1.28 | 128 | 1.3 | 8.6 | 30.36 | 4.22 |
| | overall | 676 | 7.75 | 776 | 1.2 | 9.2 | 26.99 | 28.75 |
| **RxN** | L.1 | 466 | 2.78 | 279 | 0.6 | 7.3 | 32.79 | 8.51 |
| | L.2 | 435 | 2.48 | 248 | 0.6 | 8.7 | 29.85 | 8.31 |
| | L.3 | 378 | 2.22 | 223 | 0.6 | 9.6 | 28.88 | 7.72 |
| | L.4 | 179 | 1.25 | 126 | 0.7 | 8.7 | 29.89 | 4.22 |
| | overall | 1458 | 8.74 | 875 | 0.6 | 9.6 | 30.43 | 28.75 |
| **RxS** | L.1 | 191 | 2.74 | 275 | 1.4 | 11.7 | 32.32 | 8.51 |
| | L.2 | 242 | 2.47 | 248 | 1 | 13.9 | 29.85 | 8.31 |
| | L.3 | 227 | 2.55 | 256 | 1.1 | 12.4 | 33.15 | 7.72 |
| | L.4 | 115 | 1.33 | 133 | 1.2 | 7.5 | 31.55 | 4.22 |
| | overall | 775 | 9.10 | 913 | 1.2 | 13.9 | 31.75 | 28.75 |
| **RxL** | L.1 | 186 | 2.64 | 264 | 1.4 | 14.9 | 31.03 | 8.51 |
| | L.2 | 295 | 2.66 | 267 | 0.9 | 13.5 | 32.14 | 8.31 |
| | L.3 | 181 | 2.30 | 231 | 1.3 | 9.5 | 29.91 | 7.72 |
| | L.4 | 129 | 1.19 | 119 | 0.9 | 12.9 | 28.23 | 4.22 |
| | overall | 791 | 8.79 | 881 | 1.1 | 14.9 | 30.64 | 28.75 |
| **Crosses mean** | L.1 | 243.4 | 2.58 | 258.2 | 1.18 | 10.38 | 30.348 | 8.51 |
| | L.2 | 292.4 | 2.53 | 253.4 | 0.9 | 11.62 | 30.5 | 8.31 |
| | L.3 | 227.8 | 2.20 | 220.4 | 1.04 | 9.4 | 28.54 | 7.72 |
| | L.4 | 124 | 1.25 | 125.2 | 1.08 | 9.3 | 29.7 | 4.22 |
| | overall | 887.6 | 8.55 | 857.2 | 1.04 | 12.08 | 29.812 | 28.75 |

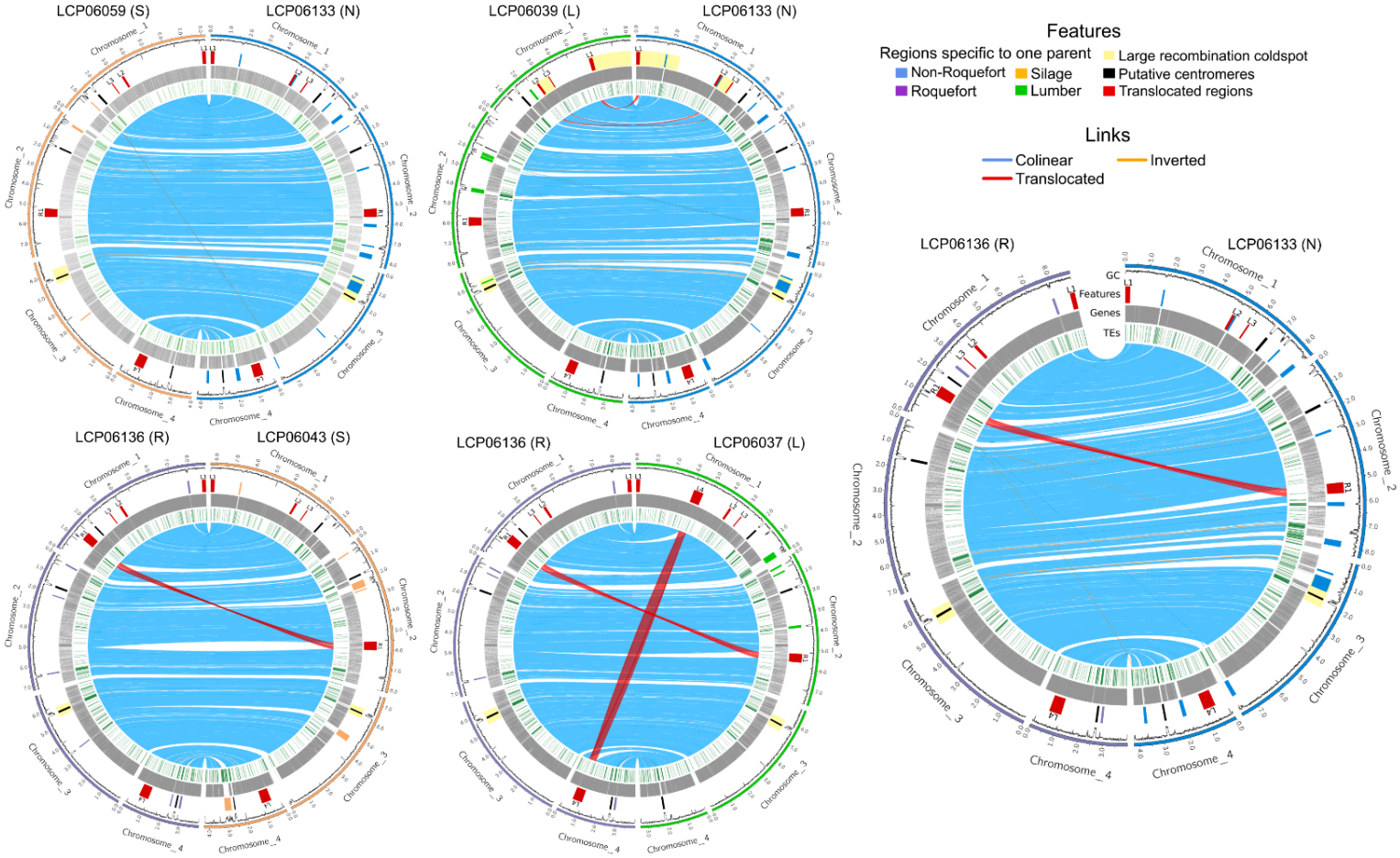



Figure CIR:
Genome comparisons between parental strains for each cross. Chromosomes are represented with colors corresponding to the population-of-origin of the strains: light orange, blue, purple and green for silage (S), non-Roquefort, (N) Roquefort (R) and lumber (L) populations, respectively. From outside to inside, the tracks represent the i) GC content, ii) translocated regions of more than 50kb between parental genomes in red (with their IDs, the first letter indicating the population-of-origin of the parent in which the translocation occurred), specific regions that are lacking in other genomes (*i.e.* acquired horizontally transferred regions) with their color indicating the populations in which they are present, putative centromeres in black, and large recombination cold spots in light yellow, iii) predicted genes in grey and iv) transposable elements in green. Orthologs between genomes are linked one to each other, with blue, orange and red links, indicating synteny, inversions or >50kb translocations, respectively.

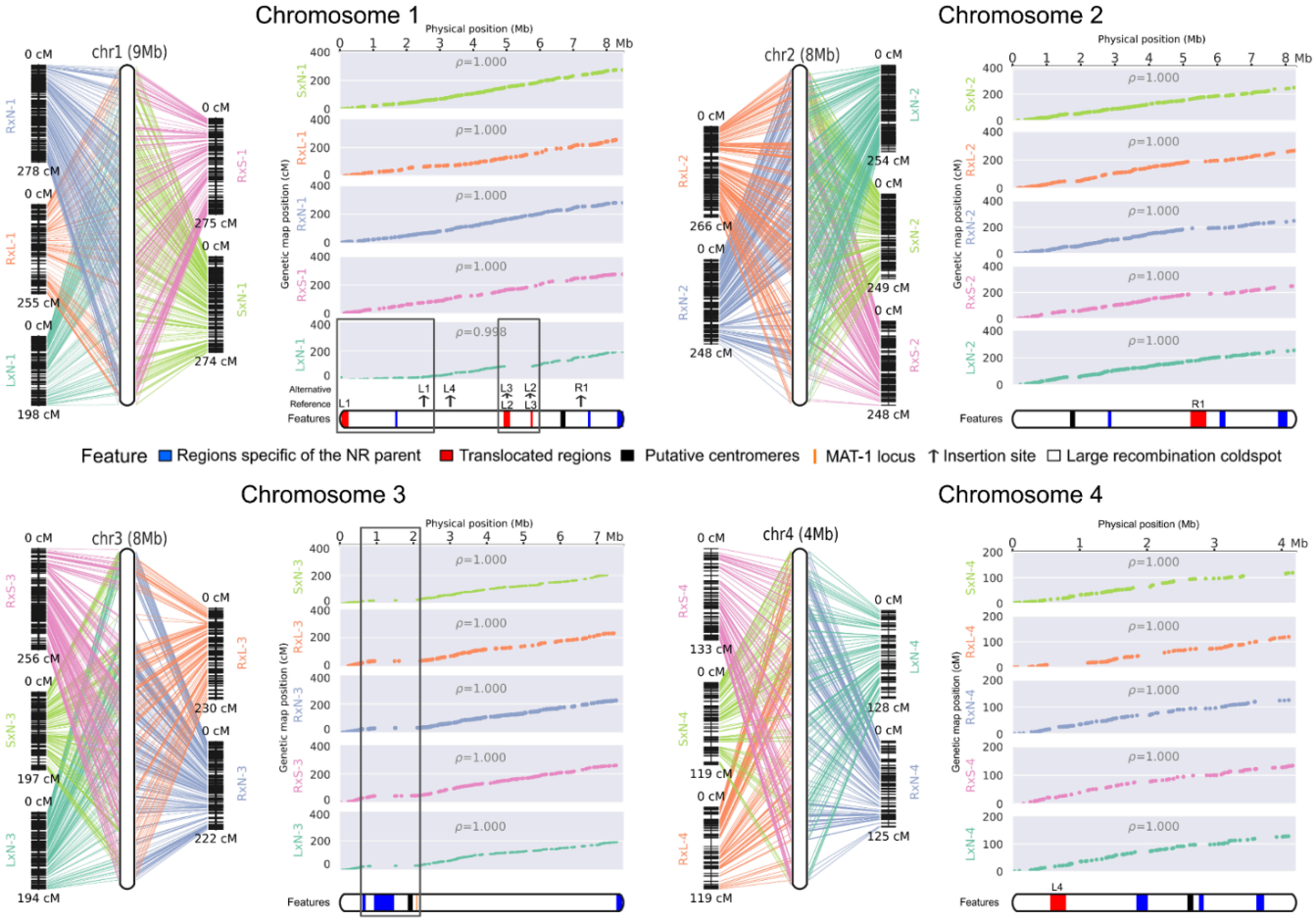



Figure MAP:
Genetic and physical maps for the four chromosomes of *Penicillium roqueforti,* obtained by analysing five inter-population crosses. Each panel corresponds to a individual chromosome, line graphs on the left represent linkage groups (one color per cross, with cross IDs as in Table CRO; note that different parents were used for the silage and lumber populations between crosses); the lines link markers to chromosomes of the reference genome (LCP06133 non-Roquefort parent). In each panel, plots on the right represent the relationship between genetic and physical distance, with one plot per cross and the same color code as in left panels. At the bottom of each panel, the reference chromosome is represented, with filled black, red and blue rectangles representing the putative centromeres, the translocated regions and the horizontally transferred regions of more than 50kb when present, respectively. The red translocated regions are labelled as in Figure CIR. The orange bar in chromosome 3 represents the mating-type locus position. The empty black rectangles indicate large recombination cold spots situated between translocated or parent-specific regions.

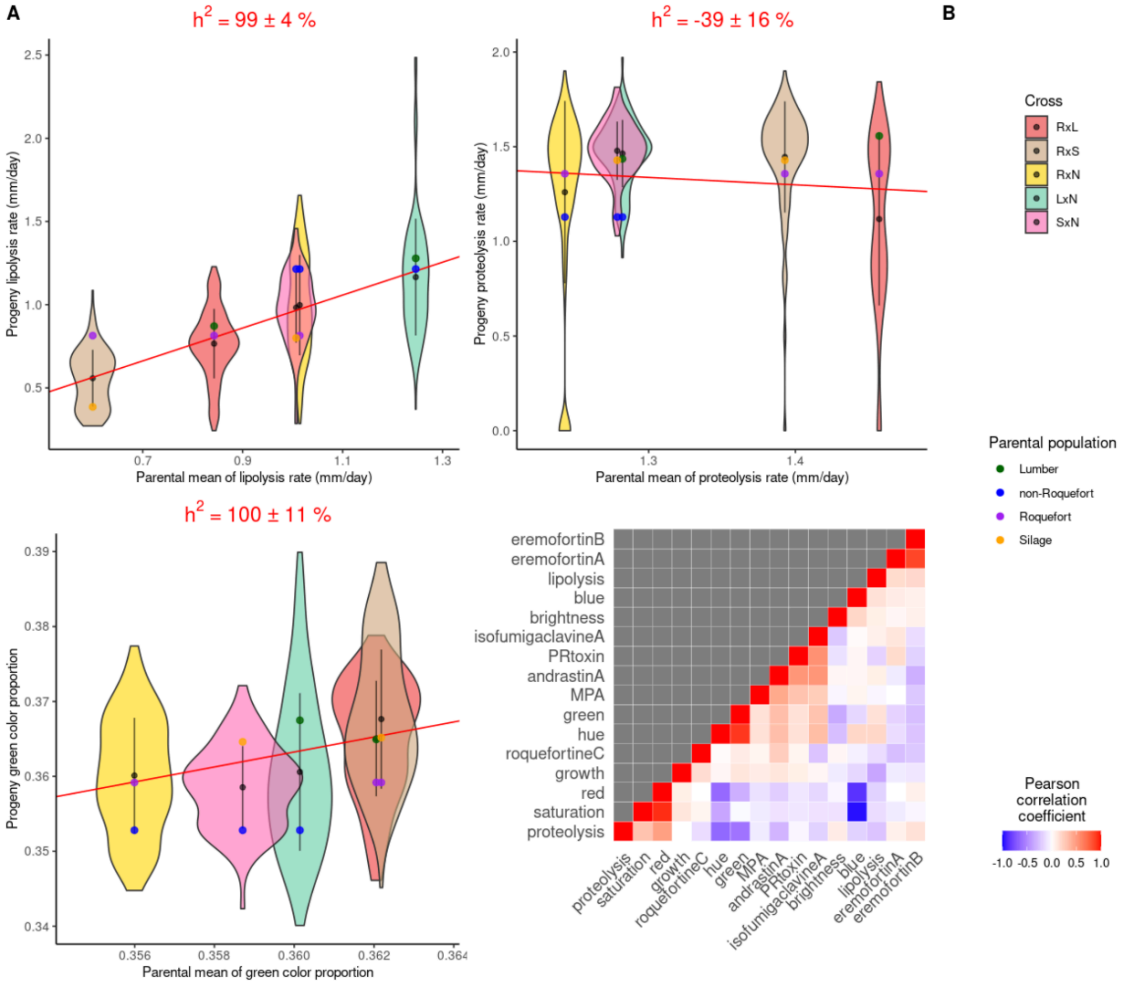



Figure PHE:
Distributions of phenotypes in the five progenies as a function of their parental means, for (A) the lipolysis rate (mm/day), (B) the proteolysis rate (mm/day) and (C) the relative green colour channel of the progeny; the parental means are plotted along the x axis (RxL in red, RxS in beige, RxN in yellow, LxN in turquoise and SxN in pink). The black point and line represent the mean and standard deviation, respectively, for each progeny. The coloured points represent the parental values (lumber in green, non-Roquefort in blue, Roquefort in purple, silage in orange). The red line represents the linear regression across progrenies, from which the slope is used to estimate the heritability ($h^2$) value given at the top. (D) Pearson correlation coefficients, as a color gradient, between trait values across offsprings and crosses.

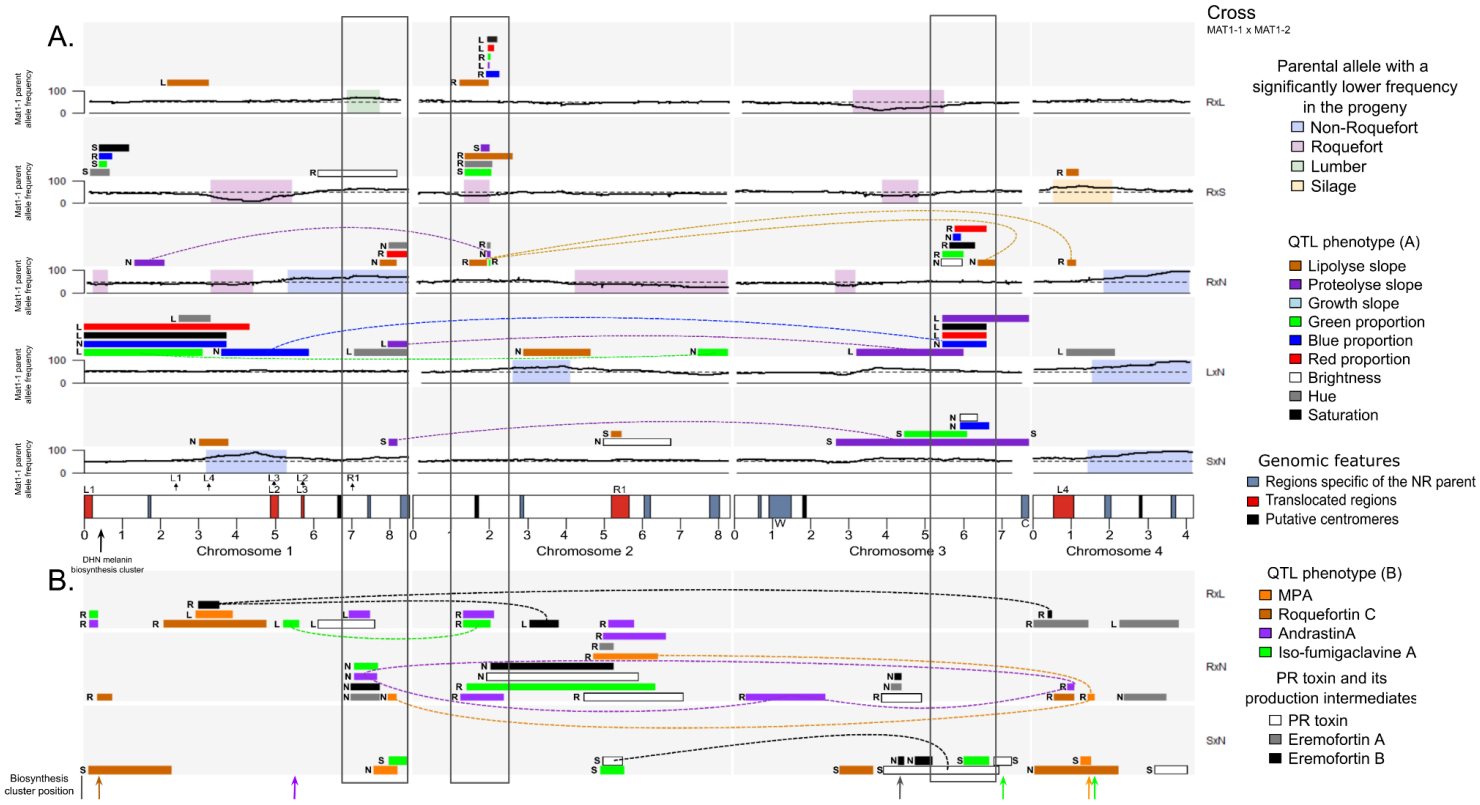



**Figure QTL:** Representation of identified quantitative trait loci (QTLs) and segregation distortion along the four chromosomes of *Penicillium roqueforti* in five progenies. Only QTLs explaining more than 5% of the total variance are represented. The color of the bars indicates the considered trait while the letter indicates the parent having the alleles increasing the trait value. Dotted lines link the QTLs with significant interactions and color indicates the phenotype. The cross ID is indicated on the right, the first parent carrying the MAT1-1 mating type. (A) QTLs identified for phenotypes linked to lipolysis, proteolysis, growth and colony color for the five crosses (in lines, indicated on the right with the same code as in Table CRO, note that different parents were used for the silage and lumber populations between crosses). Black curves represent the proportion in progenies of the allele from the parent carrying the MAT1-1 mating type. Transparent colored rectangles on curves indicate regions with significant segregation distortion, their color corresponding to the under-represented parental allele: blue, purple, green and yellow for non-Roquefort, Roquefort, lumber/spoiled food and silage/spoiled food parents, respectively. The x-axis represents genomic physical positions. At the bottom, the four chromosomes of the reference genome (LCP06133) are represented, with rectangles representing genomic features: large horizontally transferred regions specific to the reference genome in blue, and translocated regions in the reference genome in red (with same IDs as in Figure Circos). The location of the horizontally transferred regions (W for *Wallaby* and C for *CheesyTer*) are indicated. The location of the dihydroxynaphthalene (DHN) melanin production cluster is indicated by a black arrow. The large vertical empty black rectangles indicate pleiotropic QTL regions, with effects on multiple traits. (B) QTLs identified for extrolite production (with colors corresponding to the different toxins), analyzed in three crosses (SxN, RxN and LxN). The locations of the gene clusters of the toxin biosynthesis pathways are indicated by arrows with the same color code (the PR toxin cluster being in gray, eremofortin A and B being intermediates)

Figures supplémentaires:

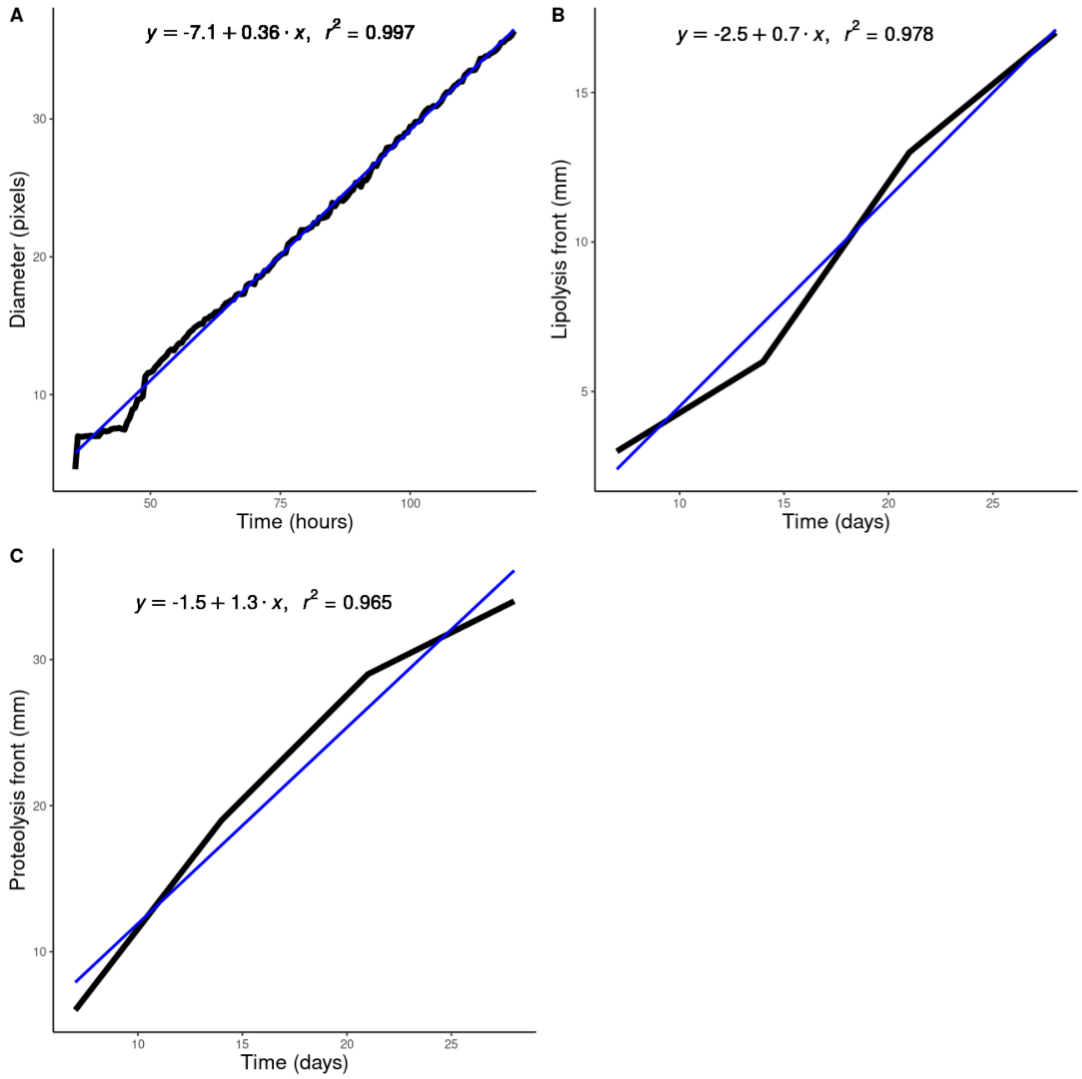



**Figure REG:** Example of phenotype measures and parameter estimation, for an offspring having a median $r^2$ value for the regression fit: (A) growth dynamic, *i.e.* colony diameter (in pixel numbers on pictures) as a function of time (hours), (B) lipolysis dynamics and (C) proteolysis dynamics, B and C representing the distance of the lysis front (*i.e* characterized by medium fading) in mm per day. The linear regression lines are shown in blue, and their equations and coefficients of determination are given at the top.

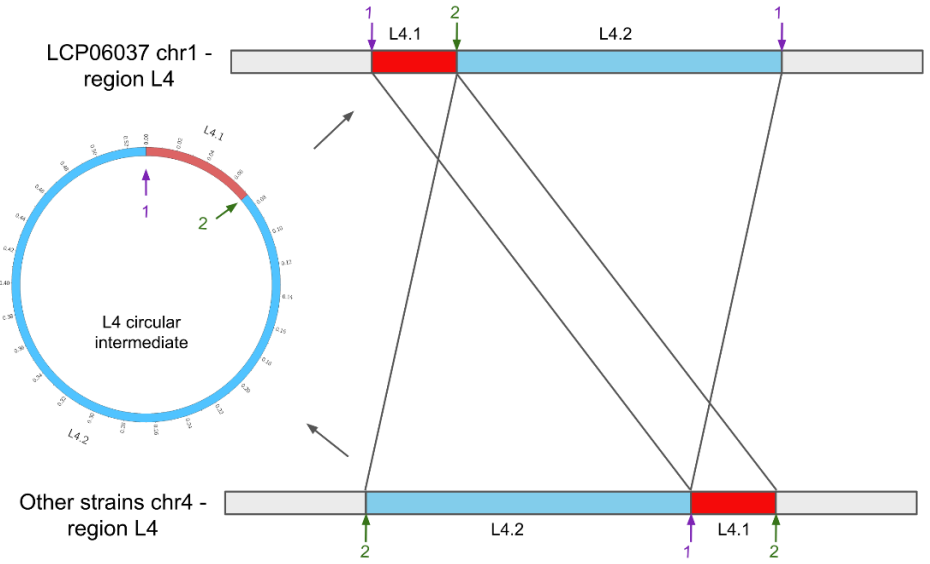



**Figure MOB:** Focus on the L4 translocated region in the *P. roqueforti* LCP06037 strain, the same pattern being observed for the L1 region in the LCP06039 strain. The L4 region is subdivided into two subregions, L4.1 in red and L4.2 in blue, with different relative positions, suggesting a circular intermediate for the translocation. The cut sites for the proposed circular intermediate are indicated by purple and green arrows, respectively, and numbered 1 and 2. Synteny comparison of the L4 translocated region present in the chromosome 1 in the LCP06037 lumber parental strain and in the chromosome 4 in other parents, showing here the example of the LCP06136 strain. Proposed circular intermediate.

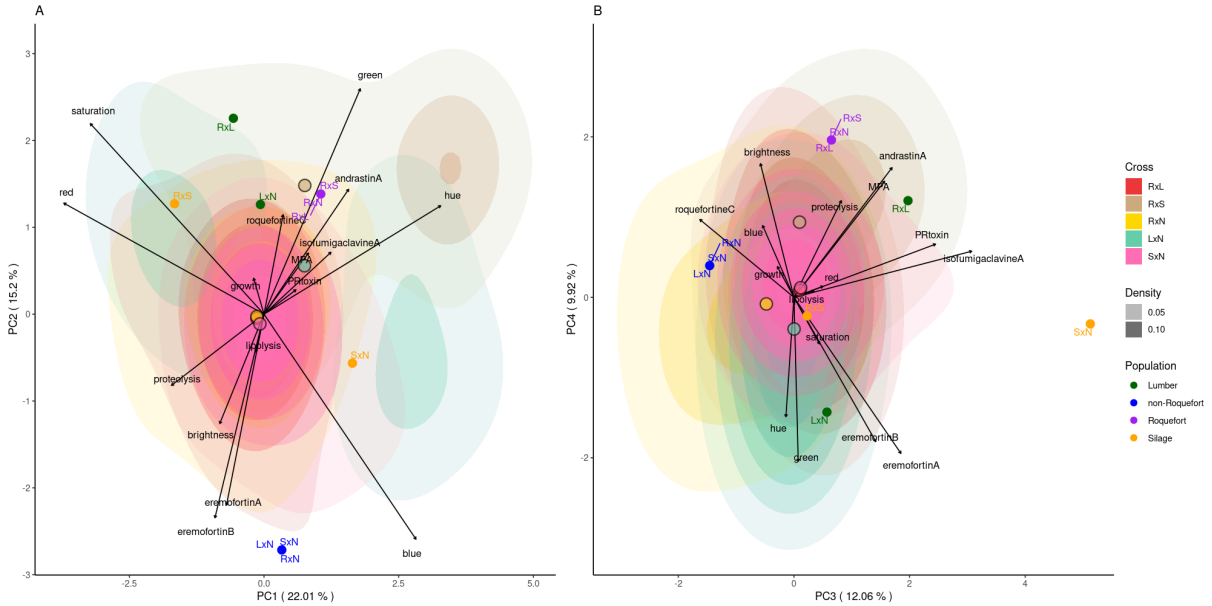



**Figure ACP:** Biplot of a principal component analysis with the two first components (A) and the third and fourth (B). For every cross the progeny scores are displayed in a different color (LxN in red, RxL in brown, RxN in yellow, RxS in turquoise, SxN in pink) and with two density levels (from 0.05 to 0.10 in light color and above 0.10 in dark color). Large dots represent the barycentres of each progeny scores in the same colors (the red one is under the yellow one). The 4 fold loadings of the phenotypes are represented by the black arrows. Small dots show the scores of the parental strains from different populations (lumber in green, non-Roquefort in blue, Roquefort in purple and silage in orange) in the labels show the cross they are involved in. The percentage in the axis labels shows the total variance explained by the component.

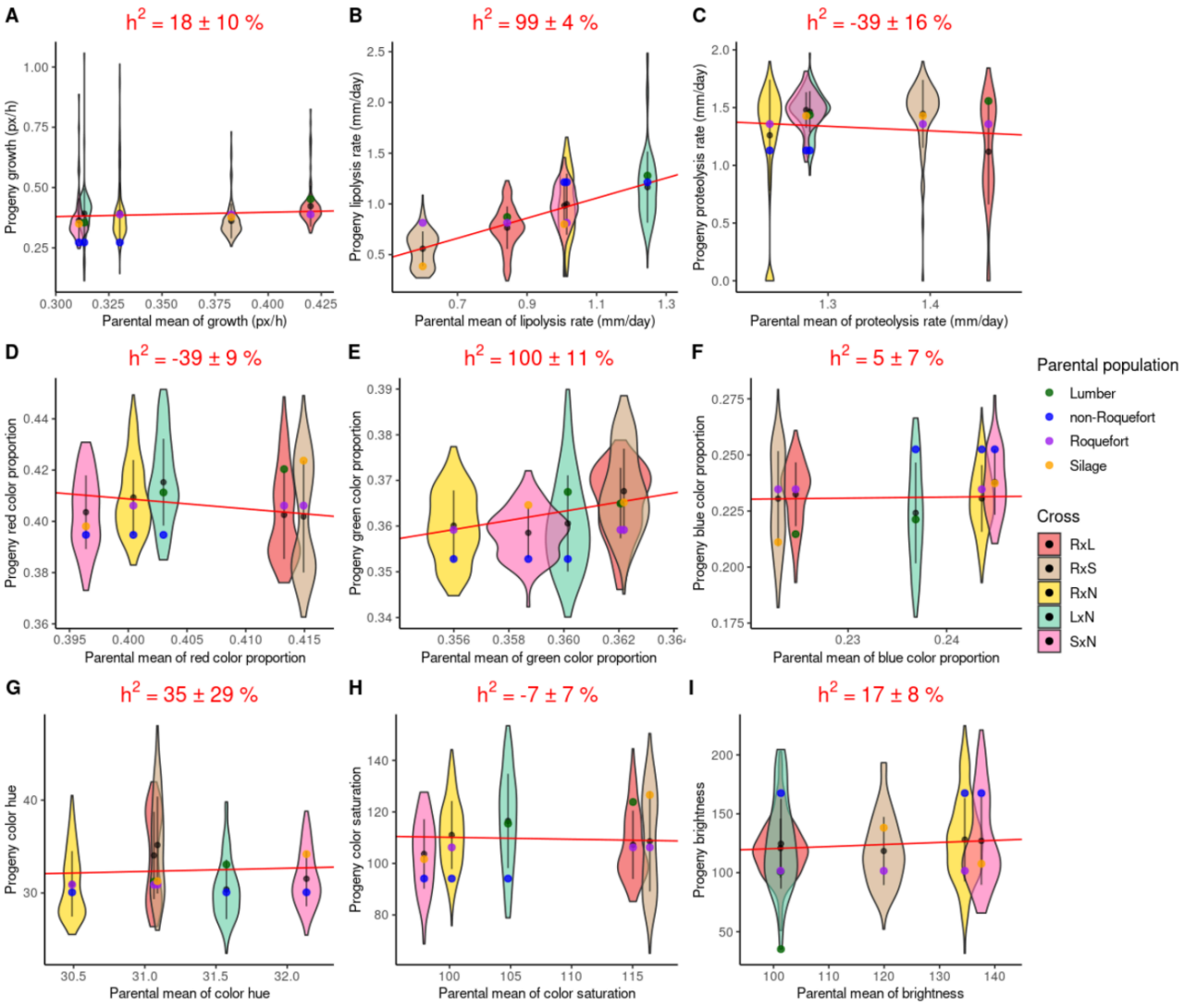



Figure DIS-HER : Distributions of phenotypes measured in the five progenies as a function of the parental means: (A) diametral growth in pixel per hour, (B) lipolysis rate in mm/day, (C) proteolysis rate in mm/day, (D) relative red, (E) green, (F) blue, (G) hue, (H) saturation and (I) brightness; progenies are represented along the x axis, RxL in red, RxS in beige, RxN in yellow, LxN in turquoise and SxN in pink. The black point and line represent the mean and standard deviation, respectively, in progenies. The coloured points represent the parental values (lumber in green, non-Roquefort in blue, Roquefort in purple, silage in orange). The red line represents the linear regression from which the slope is used to estimate the heritability value ($h^2$) given at the top.

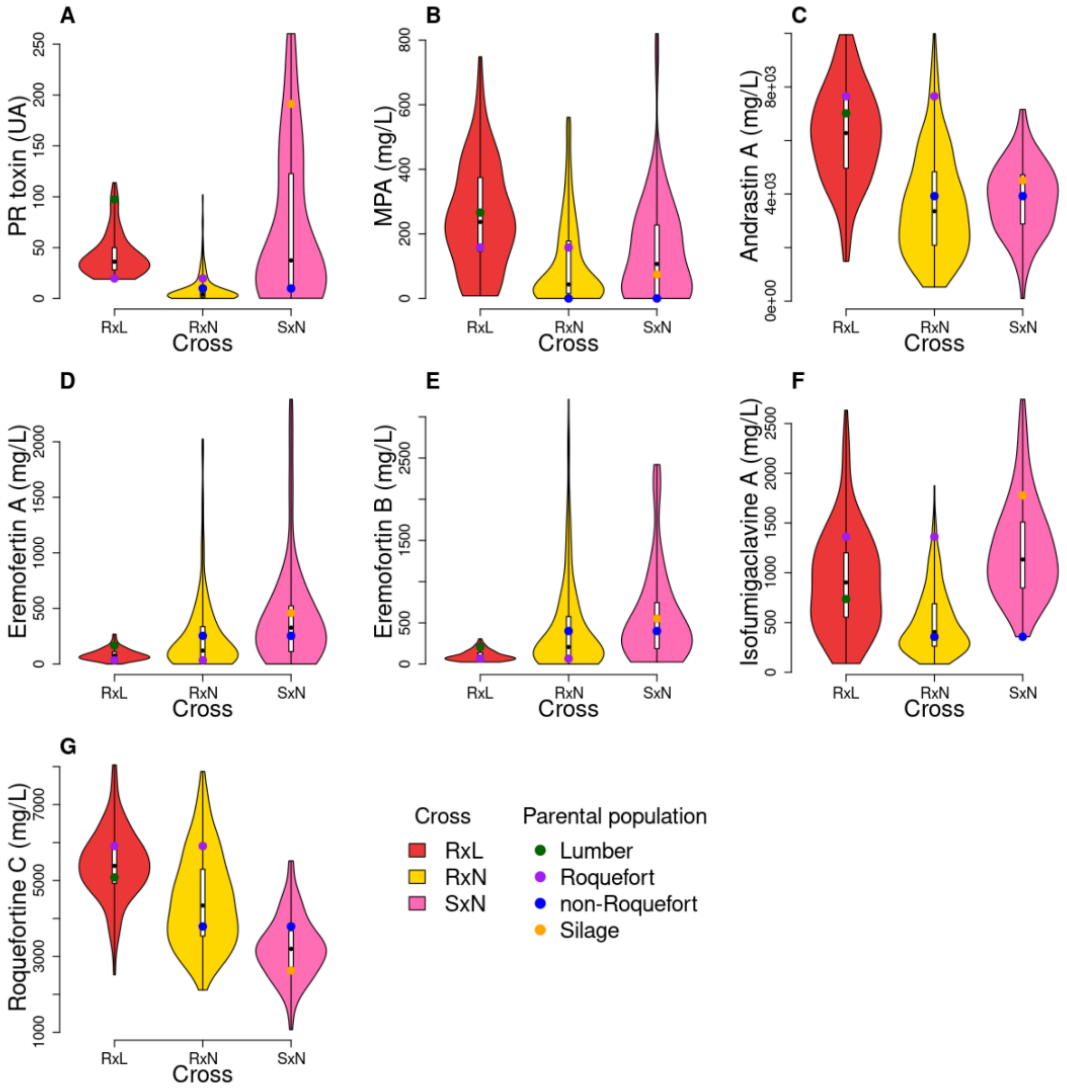



Figure DIS-MIC: Distributions of extrolites in three progenies: (A) PR toxin production, (B) mycophenolic acid, (C) andrastin A, (D) eremofortin A, (E) eremofortin B, (F) (iso)-fumigaclavine A and (G) roquefortine C; progenies are represented along the x axis: RxL in red, RxN in yellow and SxN in pink. The coloured points represent the parental values (lumber in green, non-Roquefort in blue, Roquefort in purple, silage in orange). All units are in ml/L except the PR toxin, which is expressed in arbitrary units.

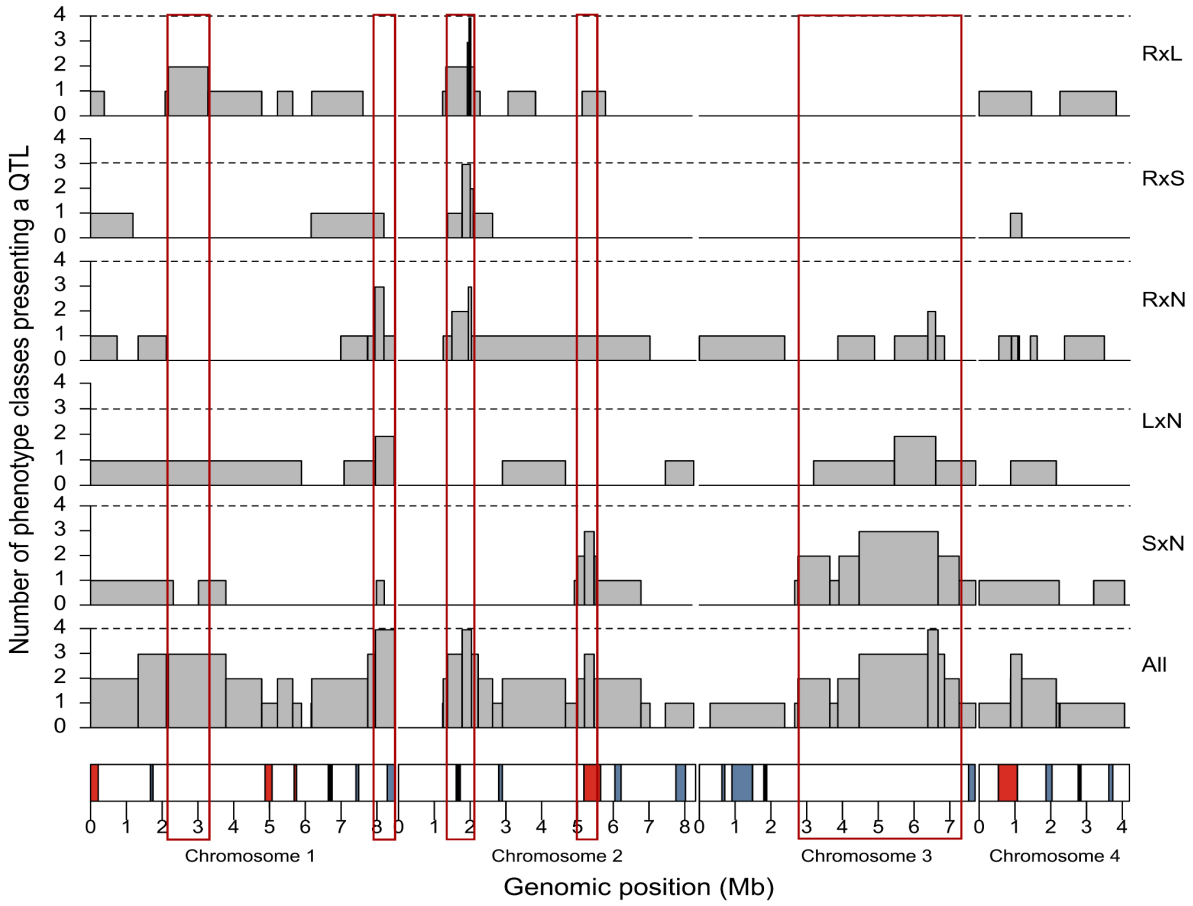



**Figure PLEIO:** Number of phenotype classes (*i.e.* lipolysis, proteolysis, color and extrolite production) presenting a QTL along the genome positions. The crosses are represented one per line, with the cross ID indicated on the right, the first parent carrying the MAT1-1 mating type; the bottom line represents a pool of all crosses. The x-axis represents genomic physical positions (Mb). At the bottom, the four chromosomes of the reference genome (LCP06133) are represented by rectangles depicting genomic features: large horizontally transferred regions specific to the reference genome, in blue, and translocated regions in the reference genome, in red. The large vertical empty red rectangles indicate pleiotropic QTL regions, with effects on multiple traits in at least one cross.

**References**

Adamczyk, K., Pokorska, J., Makulska, J., Earley, B., & Mazurek, M. (2013). Genetic analysis and evaluation of behavioural traits in cattle. *Livestock Science*, *154*, 1–12. https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.01.016

Adler, D., Kelly, T., Elliott, T., & Adamson, J. (2022). *vioplot: Violin plot.* (0.4.0) [Computer software]. https://github.com/TomKellyGenetics/vioplot

Alexa, A., & Rahnenfuhrer, J. (2016). *topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology* [Computer software]. https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/topGO.html

Alonge, M., Lebeigle, L., Kirsche, M., Jenike, K., Ou, S., Aganezov, S., Wang, X., Lippman, Z. B., Schatz, M. C., & Soyk, S. (2022). Automated assembly scaffolding using RagTag elevates a new tomato system for high-throughput genome editing. *Genome Biology*, *23*(1), 258. https://doi.org/10.1186/s13059-022-02823-7

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403–410. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2

Andargie, M., Pasquet, R. S., Gowda, B. S., Muluvi, G. M., & Timko, M. P. (2014). Molecular mapping of QTLs for domestication-related traits in cowpea (*V. unguiculata* (L.) Walp.). *Euphytica*, *200*(3), 401–412. https://doi.org/10.1007/s10681-014-1170-9

Baack, E. J., Sapir, Y., Chapman, M. A., Burke, J. M., & Rieseberg, L. H. (2008). Selection on domestication traits and quantitative trait loci in crop–wild sunflower hybrids. *Molecular Ecology*, *17*(2), 666–677. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03596.x

Bachlava, E., Tang, S., Pizarro, G., Schuppert, G. F., Brunick, R. K., Draeger, D., Leon, A., Hahn, V., & Knapp, S. J. (2010). Pleiotropy of the branching locus (*B*) masks linked and unlinked quantitative trait loci affecting seed traits in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics*, *120*(4), 829–842. https://doi.org/10.1007/s00122-009-1212-1

Bernardes, J. P., Stelkens, R. B., & Greig, D. (2017). Heterosis in hybrids within and between yeast species. *Journal of Evolutionary Biology*, *30*(3), 538–548. https://doi.org/10.1111/jeb.13023

Böhm, J., Hoff, B., O'Gorman, C. M., Wolfers, S., Klix, V., Binger, D., Zadra, I., Pöggeler, S., Dyer, P. S., & Kück, U. (2012). Sexual reproduction and mating-type – mediated strain development in the penicillin-producing fungus *Penicillium chrysogenum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(4), 1476–1481. https://doi.org/10.1073/pnas.1217943110/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1217943110

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, *30*(15), 2114–2120. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170

Bomblies, K., & Doebley, J. F. (2006). Pleiotropic Effects of the Duplicate Maize *FLORICAULA/LEAFY* Genes *zfl1* and *zfl2* on Traits Under Selection During Maize Domestication. *Genetics*, *172*(1), 519–531. https://doi.org/10.1534/genetics.105.048595

Broman, K. W., Wu, H., Sen, Ś., & Churchill, G. A. (2003). R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics*, *19*(7), 889–890. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg112

Brůna, T., Hoff, K. J., Lomsadze, A., Stanke, M., & Borodovsky, M. (2021). BRAKER2: Automatic eukaryotic genome annotation with GeneMark-EP+ and AUGUSTUS supported by a protein database. *NAR Genomics and Bioinformatics*, *3*(1), lqaa108. https://doi.org/10.1093/nargab/lqaa108

Buchanan, R. L., Golden, M. H., & Whiting, R. C. (1993). Differentiation of the effects of pH and lactic or acetic acid concentration on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. *Journal of Food Protection*, *56*(6), 474–479. https://doi.org/10.4315/0362-028X-56.6.474

Bucknell, A. H., & McDonald, M. C. (2023). That's no moon, it's a *Starship*: Giant transposons driving fungal horizontal gene transfer. *Molecular Microbiology*, mmi.15118. https://doi.org/10.1111/mmi.15118

Cantor, M. D., Van Den Tempel, T., Hansen, T. K., & Ardö, Y. (2004). Blue cheese. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, *2*, 175–198. https://doi.org/10.1016/S1874-558X(04)80044-7

Caron, T., Piver, M. L., Péron, A.-C., Lieben, P., Lavigne, R., Brunel, S., Roueyre, D., Place, M., Bonnarme, P., Giraud, T., Branca, A., Landaud, S., & Chassard, C. (2021). Strong effect of *Penicillium roqueforti* populations on volatile and metabolic compounds responsible for aromas, flavor and texture in blue cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, *354*, 109174. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109174

Cerning, J., Gripon, J.-C., Lamberet, G., & Lenoir, J. (1987). Les activités biochimiques des *Penicillium* utilisés en fromagerie. *Le Lait*, *67*(1), 3–39. https://doi.org/10.1051/lait:198711

Chávez, R., Vaca, I., & García-Estrada, C. (2023). Secondary metabolites produced by the blue-cheese ripening mold *Penicillium roqueforti*; biosynthesis and regulation mechanisms. *Journal of Fungi*, *9*(4), 459. https://doi.org/10.3390/jof9040459

Cheeseman, K., Ropars, J., Renault, P., Dupont, J., Gouzy, J., Branca, A., Abraham, A.-L., Ceppi, M., Conseiller, E., Bensimon, A., Giraud, T., & Brygoo, Y. (2014). Multiple recent horizontal transfers of a large genomic region in cheese making fungi. *Nature Communications*, *5*, 2876 (2014). https://doi.org/10.1038/ncomms3876

Cleere, M.M., Novodvorska, M., Geib, E., Whittaker, J., Dalton, H., Salih, N., Hewitt, S., Kokolski, M., Brock, M. & Dyer, P.S. (2024) New colours for old in the blue-cheese fungus *Penicillium roqueforti*. npj *Science of Food*, 8, 3.

Collins, Y. F., McSweeney, P. L. H., & Wilkinson, M. G. (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: A review of current knowledge. *International Dairy Journal*, *13*(11), 841–866. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00109-2

Coluccio, A., Bogengruber, E., Conrad, M. N., Dresser, M. E., Briza, P., & Neiman, A. M. (2004). Morphogenetic pathway of spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, *3*(6), 1464–1475. https://doi.org/10.1128/EC.3.6.1464-1475.2004

Conrado, R., Gomes, T. C., Roque, G. S. C., & De Souza, A. O. (2022). Overview of bioactive fungal secondary metabolites: Cytotoxic and antimicrobial compounds. *Antibiotics*, *11*(11), 1604. https://doi.org/10.3390/antibiotics11111604

Cosciani-Cunico, E., Dalzini, E., Ducoli, S., Sfameni, C., Bertasi, B., Losio, M.-N., Daminelli, P., & Varisco, G. (2015). Behaviour of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 during the cheese making of traditional raw-milk cheeses from Italian Alps. *Italian Journal of Food Safety*, *4*(2). https://doi.org/10.4081/ijfs.2015.4585

Coton, E., Coton, M., Hymery, N., Jany, J. L., & Mounier, J. (2020). *Penicillium roqueforti*: An overview of its genetics, physiology, metabolism and biotechnological applications. *Fungal Biology Reviews*, *34*(2), 59–73. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2020.03.001

Crequer, E., Ropars, J., Jany, J.-L., Caron, T., Coton, M., Snirc, A., Vernadet, J.-P., Branca, A., Giraud, T. & Coton, E. (2023) A new cheese population in *Penicillium roqueforti* and adaptation of the five populations to their ecological niche. *Evolutionary Applications*, **16**, 1438–1457.

Crequer, E., COTON, E., Cueff, G., Cristiansen, J.V., Frisvad, J.C., Vega, R.R. de la, Giraud, T., Jany, J.-L. & Coton, M. (2024) Different metabolite profiles across *Penicillium roqueforti*

populations associated with ecological niche specialisation and domestication. *bioRxiv*, 2024.01.12.575369.

Cryer, N. C., Butler, D. R., & Wilkinson, M. J. (2005). High throughput, high resolution selection of polymorphic microsatellite loci for multiplex analysis. *Plant Methods*, *1*, 1–5. https://doi.org/10.1186/1746-4811-1-3

Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S. A., Davies, R. M., & Li, H. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience*, *10*(2), giab008. https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008

Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, *29*(1), 15–21. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635

Doebley, J., Stec, A., & Hubbard, L. (1997). The evolution of apical dominance in maize. *Nature*, *386*(6624), 485–488. https://doi.org/10.1038/386485a0

Dumas, É., Feurtey, A., Rodríguez de la Vega, R. C., Le Prieur, S., Snirc, A., Coton, M., Thierry, A., Coton, E., Le Piver, M., Roueyre, D., Ropars, J., Branca, A., & Giraud, T. (2020). Independent domestication events in the blue-cheese fungus *Penicillium roqueforti*. *Molecular Ecology*, *33913*(January), 451773. https://doi.org/10.1111/mec.15359

Eder, M., Sanchez, I., Brice, C., Camarasa, C., Legras, J.-L., & Dequin, S. (2018). Qtl mapping of volatile compound production in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *BMC Genomics*, *19*, 166. https://doi.org/10.1186/s12864-018-4562-8

Enyenihi, A. H., & Saunders, W. S. (2003). Large-Scale Functional Genomic Analysis of Sporulation and Meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *163*(1), 47–54. https://doi.org/10.1093/genetics/163.1.47

Fairclough, A. C., Cliffe, D. E., & Knapper, S. (2011). Factors affecting *Penicillium roquefortii* (*Penicillium glaucum*) in internally mould ripened cheeses: Implications for pre-packed blue cheeses. *International Journal of Food Science & Technology*, *46*, 1586–1590. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02658.x

Falconer, D. S., & Mackay, T. F. C. (1995). *Introduction to Quantitative Genetics*. Pearson Education Limited.

Flutre, T., Duprat, E., Feuillet, C., & Quesneville, H. (2011). Considering Transposable Element Diversification in *De Novo* Annotation Approaches. *PLoS ONE*, *6*(1), e16526. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016526

Fontaine, K., Hymery, N., Lacroix, M. Z., Puel, S., Puel, O., Rigalma, K., Gaydou, V., Coton, E., & Mounier, J. (2015). Influence of intraspecific variability and abiotic factors on mycotoxin production in *Penicillium roqueforti*. *International Journal of Food Microbiology*, *215*, 187–193. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.021

Fontaine, K., Mounier, J., Coton, E., & Hymery, N. (2016). Individual and combined effects of roquefortine C and mycophenolic acid on human monocytic and intestinal cells. *World Mycotoxin Journal*, *9*(1), 51–62. https://doi.org/10.3920/WMJ2014.1861

Foulongne-Oriol, M., Rodier, A., Rousseau, T., & Savoie, J.-M. (2012). Quantitative trait locus mapping of yield-related components and oligogenic control of the cap color of the button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(7), 2422–2434. https://doi.org/10.1128/AEM.07516-11

Fox, J., & Weisberg, S. (2019). *An {R} Companion to applied regression* (T. Oaks, Ed.). Sage. https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/

Frisvad, J. C., & Filtenborg, O. (1983). Classification of terverticillate *Penicillia* based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. Applied and Environmental Microbiology, 46(6), 1301–1310. https://doi.org/10.1128/aem.46.6.1301-1310.1983

Galagan, J. E., & Selker, E. U. (2004). RIP: The evolutionary cost of genome defense. *Trends in Genetics*, *20*(9), 417–423. https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.07.007

Ge, H. M., Yu, Z. G., Zhang, J., Wu, J. H., & Tan, R. X. (2009). Bioactive alkaloids from endophytic *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Natural Products*, *72*(4), 753–755. https://doi.org/10.1021/np800700e

Gel, B., & Serra, E. (2017). karyoploteR: An R/Bioconductor package to plot customizable genomes displaying arbitrary data. *Bioinformatics*, *33*(19), 3088–3090. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx346

Gil-Durán, C., Rojas-Aedo, J. F., Medina, E., Vaca, I., García-Rico, R. O., Villagrán, S., Levicán, G., & Chávez, R. (2015). The *pcz1* gene, which encodes a Zn(II)2Cys6 Protein, is involved in the control of growth, conidiation, and conidial germination in the filamentous fungus *Penicillium roqueforti*. *PLOS ONE*, *10*(3), e0120740. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120740

Gillot, G., Jany, J.-L., Poirier, E., Maillard, M., Debaets, S., Thierry, A., Coton, E., & Coton, M. (2017). Functional diversity within the *Penicillium roqueforti* species. *International Journal of Food Microbiology*, *241*, 141–150. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.001

Gladieux, P., Ropars, J., Badouin, H., Branca, A., Aguileta, G., De Vienne, D. M., Rodríguez de la Vega, R. C., Branco, S., & Giraud, T. (2014). Fungal evolutionary genomics provides insight into the mechanisms of adaptive divergence in eukaryotes. *Molecular Ecology*, *23*(4), 753–773. https://doi.org/10.1111/mec.12631

Gluck-Thaler, E., Ralston, T., Konkel, Z., Ocampos, C. G., Ganeshan, V. D., Dorrance, A. E., Niblack, T. L., Wood, C. W., Slot, J. C., Lopez-Nicora, H. D., & Vogan, A. A. (2022). Giant *Starship* elements mobilize accessory genes in fungal genomes. *Molecular Biology and Evolution*, *39*(5), msac109. https://doi.org/10.1093/molbev/msac109

Grognet, P., Lalucque, H., Malagnac, F., & Silar, P. (2014). Genes that bias mendelian segregation. *PLoS Genetics*, *10*(5), e1004387. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004387

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, *29*(8), 1072–1075. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086

Hall, B., Hall, M., Statisticat, L., Brown, E., Hermanson, R., Charpentier, E., Heckq, D., Laurent, S., Gronau, Q. F., & Singmann, H. (2021). *Package "LaplacesDemon"* (16.1.6) [Computer software]. https://github.com/LaplacesDemonR/LaplacesDemon

Hoede, C., Arnoux, S., Moisset, M., Chaumier, T., Inizan, O., Jamilloux, V., & Quesneville, H. (2014). PASTEC: An Automatic transposable element classification tool. *PLoS ONE*, *9*(5), e91929. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091929

Hymery, N., Puel, O., Tadrist, S., Canlet, C., Le Scouarnec, H., Coton, E., & Coton, M. (2017). Effect of PR toxin on THP1 and Caco-2 cells: An *in vitro* study. *World Mycotoxin Journal*, *10*(4), 375–386. https://doi.org/10.3920/WMJ2017.2196

Imbernon, M., Callac, P., Gasqui, P., Kerrigan, R. W., & Velcko, A. J. (1996). *BSN*, the primary determinant of basidial spore number and reproductive mode in *Agaricus bisporus*, maps to chromosome *I*. *Mycologia*, *88*(5), 749–761. https://doi.org/10.1080/00275514.1996.12026713

Jadhav, M. S. (2015). An update on important functionally characterized genes / QTLs of agronomic importance in crop plants. *Indian Research Journal of Genetics & Biotechnology*, *7*(1), 44–49.

Jakubczyk, K., Kałduńska, J., Kochman, J., & Janda, K. (2020). Chemical Profile and Antioxidant Activity of the Kombucha Beverage Derived from White, Green, Black and Red Tea. *Antioxidants*, *9*(5), 447. https://doi.org/10.3390/antiox9050447

Johnsson, M., Rubin, C. ‐J., Höglund, A., Sahlqvist, A. ‐S., Jonsson, K. B., Kerje, S., Ekwall, O., Kämpe, O., Andersson, L., Jensen, P., & Wright, D. (2014). The role of pleiotropy and linkage in genes affecting a sexual ornament and bone allocation in the chicken. *Molecular Ecology*, *23*(9), 2275–2286. https://doi.org/10.1111/mec.12723

Kantar, M. B., Nashoba, A. R., Anderson, J. E., Blackman, B. K., & Rieseberg, L. H. (2017). The Genetics and Genomics of Plant Domestication. *BioScience*, *67*(11), 971–982. https://doi.org/10.1093/biosci/bix114

Kassambara, A., & Mundt, F. (2020). *factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses* (R package version 1.0.7) [Computer software]. https://CRAN.R-project.org/package=factoextra

Katoh, K. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, *30*(14), 3059–3066. https://doi.org/10.1093/nar/gkf436

Kessi-Pérez, E. I., Molinet, J., & Martínez, C. (2020). Disentangling the genetic bases of *Saccharomyces cerevisiae* nitrogen consumption and adaptation to low nitrogen environments in wine fermentation. *Biological Research*, *53*(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/s40659-019-0270-3

Kieslich, P. J., Henninger, F., Wulff, D. U., Haslbeck, J. M. B., & Schulte-Mecklenbeck, M. (2019). Mouse-tracking: A practical guide to implementation and analysis. In *A handbook of process tracing methods*. PsyArXiv. https://doi.org/10.31234/osf.io/zuvqa

Kolmogorov, M., Armstrong, J., Raney, B. J., Streeter, I., Dunn, M., Yang, F., Odom, D., Flicek, P., Keane, T. M., Thybert, D., Paten, B., & Pham, S. (2018). Chromosome assembly of large and complex genomes using multiple references. *Genome Research*, *28*(11), 1720–1732. https://doi.org/10.1101/gr.236273.118

Kolmogorov, M., Yuan, J., Lin, Y., & Pevzner, P. A. (2019). Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nature Biotechnology*, *37*(5), 540–546. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0072-8

Kongjaimun, A., Kaga, A., Tomooka, N., Somta, P., Vaughan, D. A., & Srinives, P. (2012). The genetics of domestication of yardlong bean, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Ssp. *Unguiculata* cv.-gr. *Sesquipedalis*. *Annals of Botany*, *109*(6), 1185–1200. https://doi.org/10.1093/aob/mcs048

Koren, S., Walenz, B. P., Berlin, K., Miller, J. R., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2017). Canu: Scalable and accurate long-read assembly via adaptive *k* -mer weighting and repeat separation. *Genome Research*, *27*(5), 722–736. https://doi.org/10.1101/gr.215087.116

Krzywinski, M., Schein, J., Birol, İ., Connors, J., Gascoyne, R., Horsman, D., Jones, S. J., & Marra, M. A. (2009). Circos: An information aesthetic for comparative genomics. *Genome Research*, *19*(9), 1639–1645. https://doi.org/10.1101/gr.092759.109

Kumar, J., Gupta, D. S., Gupta, S., Dubey, S., Gupta, P., & Kumar, S. (2017). Quantitative trait loci from identification to exploitation for crop improvement. *Plant Cell Reports*, *36*(8), 1187–1213. https://doi.org/10.1007/s00299-017-2127-y

Kurtz, S., Phillippy, A., Delcher, A. L., Smoot, M., Shumway, M., Antonescu, C., & Salzberg, S. L. (2004). Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biology*, *5*, R12. https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-2-r12

Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, *9*(4), 357–359. https://doi.org/10.1038/nmeth.1923

Langmead, B., Wilks, C., Antonescu, V., & Charles, R. (2019). Scaling read aligners to hundreds of threads on general-purpose processors. *Bioinformatics*, *35*(3), 421–432. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty648

Laurent, B., Moinard, M., Spataro, C., Chéreau, S., Zehraoui, E., Blanc, R., Lasserre, P., Ponts, N., & Foulongne-Oriol, M. (2021). QTL mapping in *Fusarium graminearum* identified an allele of FgVe1 involved in reduced aggressiveness. *Fungal Genetics and Biology*, *153*, 103566. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2021.103566

Lê, S., Josse, J., & Husson, F. (2008). **FactoMineR**: An *R* Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*, *25*(1). https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01

Li, H. (2011). A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*, *27*(21), 2987–2993. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr509

Li, H. (2018). Minimap2: Pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics*, *34*(18), 3094–3100. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty191

Liti, G., & Louis, E. J. (2012). Advances in Quantitative Trait Analysis in Yeast. *PLoS Genetics*, *8*(8), e1002912. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002912

Luo, R., Liu, B., Xie, Y., Li, Z., Huang, W., Yuan, J., He, G., Chen, Y., Pan, Q., Liu, Y., Tang, J., Wu, G., Zhang, H., Shi, Y., Liu, Y., Yu, C., Wang, B., Lu, Y., Han, C., … Wang, J. (2012). SOAPdenovo2: An empirically improved memory-efficient short-read *de novo* assembler. *GigaScience*, *1*(1), 18. https://doi.org/10.1186/2047-217X-1-18

Maechler, M. (2016). *Diptest: Hartigan's Dip Test Statistic for Unimodality—Corrected*. https://cran.r-project.org/package=diptest

Manni, M., Berkeley, M. R., Seppey, M., Simão, F. A., & Zdobnov, E. M. (2021). BUSCO Update: Novel and Streamlined Workflows along with Broader and Deeper Phylogenetic Coverage for Scoring of Eukaryotic, Prokaryotic, and Viral Genomes. *Molecular Biology and Evolution*, *38*(10), 4647–4654. https://doi.org/10.1093/molbev/msab199

Marcano, Y., Montanares, M., Gil-Durán, C., González, K., Levicán, G., Vaca, I., & Chávez, R. (2023). Pr*laeA* Affects the Production of Roquefortine C, Mycophenolic Acid, and Andrastin A in *Penicillium roqueforti*, but It Has Little Impact on Asexual Development. *Journal of Fungi*, *9*(10), 954. https://doi.org/10.3390/jof9100954

Marquina, M., Lambea, E., Carmona, M., Sánchez-Marinas, M., López-Aviles, S., Ayte, J., Hidalgo, E., & Aligue, R. (2022). A new negative feedback mechanism for MAPK pathway inactivation through Srk1 MAPKAP kinase. *Scientific Reports*, *12*(1), 19501. https://doi.org/10.1038/s41598-022-23970-8

Martínez-Ainsworth, N. E., & Tenaillon, M. I. (2016). Superheroes and masterminds of plant domestication. *Comptes Rendus Biologies*, *339*(7–8), 268–273. https://doi.org/10.1016/j.crvi.2016.05.005

Matas, A. J., Smith, J. M., Skeans, M. A., Thompson, B., Gustafson, S. K., Stewart, D. E., Cherikh, W. S., Wainright, J. L., Boyle, G., Snyder, J. J., Israni, A. K., & Kasiske, B. L. (2015). OPTN/SRTR 2013 Annual Data Report: Kidney. *American Journal of Transplantation*, *15*, 1–34. https://doi.org/10.1111/ajt.13195

Matsuda, Y., Awakawa, T., & Abe, I. (2013). Reconstituted biosynthesis of fungal meroterpenoid andrastin A. *Tetrahedron*, *69*(38), 8199–8204. https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.07.029

McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., & DePristo, M. A. (2010). The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, *20*(9), 1297–1303. https://doi.org/10.1101/gr.107524.110

Missiaggia, A., & Grattapaglia, D. (2006). Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple-tailed primers. *Genetics and Molecular Research*, *5*(1), 72–78.

Moreau, C. (1980). Le *Penicillium roqueforti*, morphologie, physiologie, intérêt en industrie fromagère, mycotoxines. *Le Lait*, *60*(595–596), 254–271. https://doi.org/10.1051/lait:1980595-59615

Nguyen Ba, A. N., Lawrence, K. R., Rego-Costa, A., Gopalakrishnan, S., Temko, D., Michor, F., & Desai, M. M. (2022). Barcoded bulk QTL mapping reveals highly polygenic and epistatic architecture of complex traits in yeast. *eLife*, *11*, e73983. https://doi.org/10.7554/eLife.73983

O'Gorman, C. M., Fuller, H. T., & Dyer, P. S. (2009). Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, *457*, 471–475. https://doi.org/10.1038/nature07528

Peltier, E., Bibi-Triki, S., Dutreux, F., Caradec, C., Friedrich, A., Llorente, B., & Schacherer, J. (2021). Dissection of quantitative trait loci in the *Lachancea waltii* yeast species highlights major hotspots. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, *11*(9), jkab242. https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab242

Petrizzelli, M., De Vienne, D., & Dillmann, C. (2019). Decoupling the Variances of Heterosis and Inbreeding Effects Is Evidenced in Yeast's Life-History and Proteomic Traits. *Genetics*, *211*(2), 741–756. https://doi.org/10.1534/genetics.118.301635

Pfister, R., Schwarz, K. A., Janczyk, M., Dale, R., & Freeman, J. B. (2013). Good things peak in pairs: A note on the bimodality coefficient. *Frontiers in Psychology*, *4*. https://doi.org/10.3389/fpsyg.2013.00700

Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., & R Core Team. (2018). *{nlme}: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*. https://cran.r-project.org/package=nlme

Punt, M., van den Brule, T., Teertstra, W. R., Dijksterhuis, J., den Besten, H. M. W., Ohm, R. A., & Wösten, H. A. B. (2020). Impact of maturation and growth temperature on cell-size distribution, heat-resistance, compatible solute composition and transcription profiles of *Penicillium roqueforti* conidia. *Food Research International*, *136*, 109287. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109287

Quesneville, H., Bergman, C. M., Andrieu, O., Autard, D., Nouaud, D., Ashburner, M., & Anxolabehere, D. (2005). Combined Evidence Annotation of Transposable Elements in Genome Sequences. *PLoS Computational Biology*, *1*(2), e22. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010022

Quinlan, A. R., & Hall, I. M. (2010). BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, *26*(6), 841–842. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033

Rice, P., Longden, L., & Bleasby, A. (2000). EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics*, *16*(6), 276–277. https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)02024-2

Rojas-Aedo, J. F., Gil-Durán, C., Goity, A., Vaca, I., Levicán, G., Larrondo, L. F., & Chávez, R. (2018). The developmental regulator Pcz1 affects the production of secondary metabolites in the filamentous fungus *Penicillium roqueforti*. *Microbiological Research*, *212–213*, 67–74. https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.05.005

Ropars, J., Caron, T., Lo, Y.-C., Bennetot, B., & Giraud, T. (2020). The domestication of Penicillium cheese fungi. *Comptes Rendus - Biologies*, *1*(0). https://doi.org/10.5802/crbiol.15

Ropars, J., & Giraud, T. (2022). Convergence in domesticated fungi used for cheese and dry-cured meat maturation: Beneficial traits, genomic mechanisms, and degeneration. *Current Opinion in Microbiology*, *70*, 102236. https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102236

Ropars, J., López-Villavicencio, M., Dupont, J., Snirc, A., Gillot, G., Coton, M., Jany, J.-L., Coton, E., & Giraud, T. (2014). Induction of sexual reproduction and genetic diversity in the cheese fungus *Penicillium roqueforti*. *Evolutionary Applications*, *7*(4), 433–441. https://doi.org/10.1111/eva.12140

Ropars, J., Rodríguez de la Vega, R. C., López-Villavicencio, M., Gouzy, J., Sallet, E., Dumas, É., Lacoste, S., Debuchy, R., Dupont, J., Branca, A., & Giraud, T. (2015). Adaptive Horizontal Gene Transfers Between Multiple Cheese-Associated Fungi. *Current Biology*, *25*(19), 2562–2569. https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.08.025

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 671–675. https://doi.org/10.1038/nmeth.2089

Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. A poor man's approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics. *Nature Biotechnology*, *18*, 233–234. https://doi.org/10.1038/72708

Scott, P. M. (1981). Toxins of *Penicillium* Species Used in Cheese Manufacture. *Journal of Food Protection*, *44*(9), 702–710. https://doi.org/10.4315/0362-028X-44.9.702

Seekles, S. J., Teunisse, P. P. P., Punt, M., Van Den Brule, T., Dijksterhuis, J., Houbraken, J., Wösten, H. A. B., & Ram, A. F. J. (2021). Preservation stress resistance of melanin deficient conidia from *Paecilomyces variotii* and *Penicillium roqueforti* mutants generated via CRISPR/Cas9 genome editing. *Fungal Biology and Biotechnology, 8*(1), 4. https://doi.org/10.1186/s40694-021-00111-w

Silva, M. V. B., dos Santos, D. J. A., Boison, S. A., Utsunomiya, A. T. H., Carmo, A. S., Sonstegard, T. S., Cole, J. B., & Van Tassell, C. P. (2014). The development of genomics applied to dairy breeding. *Livestock Science*, *166*(1), 66–75. https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.05.017

Smit, A., & Hubley, R. (2008). *RepeatModeler Open-1.0* (1.0) [Computer software]. http://www.repeatmasker.org

Smit, A., Hubley, R., & Green, P. (2013). *RepeatMasker Open-4.0.* (4.0) [Computer software]. http://www.repeatmasker.org

Solares, E. A., Chakraborty, M., Miller, D. E., Kalsow, S., Hall, K., Perera, A. G., Emerson, J. J., & Hawley, R. S. (2018). Rapid Low-Cost Assembly of the *Drosophila melanogaster* Reference Genome Using Low-Coverage, Long-Read Sequencing. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, *8*(10), 3143–3154. https://doi.org/10.1534/g3.118.200162

Somta, P., Chen, J., Yimram, T., Yundaeng, C., Yuan, X., Tomooka, N., & Chen, X. (2020). QTL Mapping for Agronomic and Adaptive Traits Confirmed Pleiotropic Effect of *mog* Gene in Black Gram [*Vigna mungo* (L.) Hepper]. *Frontiers in Genetics*, *11*, 635. https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00635

Steinmetz, L. M., Sinha, H., Richards, D. R., Spiegelman, J. I., Oefner, P. J., McCusker, J. H., & Davis, R. W. (2002). Dissecting the architecture of a quantitative trait locus in yeast. *Nature*, *416*(6878), 326–330. https://doi.org/10.1038/416326a

Sweeney, M., & McCouch, S. (2007). The Complex History of the Domestication of Rice. *Annals of Botany*, *100*(5), 951–957. https://doi.org/10.1093/aob/mcm128

Swinnen, S., Thevelein, J. M., & Nevoigt, E. (2012). Genetic mapping of quantitative phenotypic traits in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, *12*(2), 215–227. https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00777.x

Tang, H., Zhang, X., Miao, C., Zhang, J., Ming, R., Schnable, J. C., Schnable, P. S., Lyons, E., & Lu, J. (2015). ALLMAPS: Robust scaffold ordering based on multiple maps. *Genome Biology*, *16*(1), 3. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0573-1

Taylor, J., & Butler, D. (2017). *R* Package **ASMap**: Efficient Genetic Linkage Map Construction and Diagnosis. *Journal of Statistical Software*, *79*(6). https://doi.org/10.18637/jss.v079.i06

Telias, A., Lin-Wang, K., Stevenson, D. E., Cooney, J. M., Hellens, R. P., Allan, A. C., Hoover, E. E., & Bradeen, J. M. (2011). Apple skin patterning is associated with differential expression of *MYB10*. *BMC Plant Biology*, *11*(1), 93. https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-93

Todd, R. T., Forche, A., & Selmecki, A. (2017). Ploidy Variation in Fungi—Polyploidy, Aneuploidy, and Genome Evolution. *Microbiology Spectrum*, *5*(4), 1–31. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0051-2016.

Torrent, C., Gil-Durán, C., Rojas-Aedo, J. F., Medina, E., Vaca, I., Castro, P., García-Rico, R. O., Cotoras, M., Mendoza, L., Levicán, G., & Chávez, R. (2017). Role of *sfk1* Gene in the Filamentous Fungus *Penicillium roqueforti*. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 2424. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02424

Turner, B. C., & Perkins, D. D. (1979). Spore killer, a chromosomal factor in *Neurospora* that kill meiotic products not containing it. *Genetics*, *93*(3), 587–606. https://doi.org/10.1093/genetics/93.3.587

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, *40*(15), e115. https://doi.org/10.1093/nar/gks596

Van Wyk, S., Harrison, C. H., Wingfield, B. D., De Vos, L., Van Der Merwe, N. A., & Steenkamp, E. T. (2019). The RIPper, a web-based tool for genome-wide quantification of Repeat-Induced Point (RIP) mutations. *PeerJ*, *7*, e7447. https://doi.org/10.7717/peerj.7447

Vernozy-Rozand, C., Mazuy-Cruchaudet, C., Bavai, C., Montet, M. P., Bonin, V., Dernburg, A., & Richard, Y. (2005). Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, *105*(1), 83–88. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.005

Vion, C., Peltier, E., Bernard, M., Muro, M. & Marullo, P. (2021) Marker assisted selection of malic-consuming *Saccharomyces cerevisiae* strains for winemaking. efficiency and limits of a QTL's driven breeding program. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, **7**, 304.https://doi.org/10.3390/jof7040304

Walker, B. J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S., Cuomo, C. A., Zeng, Q., Wortman, J., Young, S. K., & Earl, A. M. (2014). Pilon: An Integrated Tool for Comprehensive Microbial Variant Detection and Genome Assembly Improvement. *PLoS ONE*, *9*(11), e112963. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112963

Wang, J., Liao, X., Li, Y., Zhou, R., Yang, X., Gao, L., & Jia, J. (2010). Fine mapping a domestication-related QTL for spike-related traits in a synthetic wheat. *Genome*, *53*(10), 798–804. https://doi.org/10.1139/G10-066

Wei, T., & Simko, V. (2021). *R package "corrplot": Visualization of a Correlation Matrix* (0.92) [Computer software]. https://github.com/taiyun/corrplot

Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017). Completing bacterial genome assemblies with multiplex MinION sequencing. *Microbial Genomics*, *3*(10). https://doi.org/10.1099/mgen.0.000132

Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J. L., Capy, P., Chalhoub, B., Flavell, A., Leroy, P., Morgante, M., Panaud, O., Paux, E., SanMiguel, P., & Schulman, A. H. (2007). A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics*, *8*(12), 973–982. https://doi.org/10.1038/nrg2165

Wickham, H. (2007). Reshaping Data with the {reshape} Package. *Journal of Statistical Software*, *21*(12), 1–20.

Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* [Computer software]. https://ggplot2.tidyverse.org

Wilkening, S., Lin, G., Fritsch, E. S., Tekkedil, M. M., Anders, S., Kuehn, R., Nguyen, M., Aiyar, R. S., Proctor, M., Sakhanenko, N. A., Galas, D. J., Gagneur, J., Deutschbauer, A., & Steinmetz, L. M. (2014). An Evaluation of High-Throughput Approaches to Qtl Mapping in

*Saccharomyces Cerevisiae*. *Genetics*, *196*(3), 853–865. https://doi.org/10.1534/genetics.113.160291

Wirén, A., & Jensen, P. (2011). A Growth QTL on Chicken Chromosome 1 Affects Emotionality and Sociality. *Behavior Genetics*, *41*(2), 303–311. https://doi.org/10.1007/s10519-010-9377-6

Wright, D. (2015). The Genetic Architecture of Domestication in Animals. *Bioinformatics and Biology Insights*, *9S4*, BBI.S28902. https://doi.org/10.4137/BBI.S28902

Wright, D., Rubin, C.-J., Martinez Barrio, A., Schütz, K., Kerje, S., Brändström, H., Kindmark, A., Jensen, P., & Andersson, L. (2010). The genetic architecture of domestication in the chicken: Effects of pleiotropy and linkage. *Molecular Ecology*, *19*(23), 5140–5156. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04882.x

Yao, J., Xu, J., Cornille, A., Tomes, S., Karunairetnam, S., Luo, Z., Bassett, H., Whitworth, C., Rees‐George, J., Ranatunga, C., Snirc, A., Crowhurst, R., De Silva, N., Warren, B., Deng, C., Kumar, S., Chagné, D., Bus, V. G. M., Volz, R. K., … Gleave, A. P. (2015). A *micro RNA* allele that emerged prior to apple domestication may underlie fruit size evolution. *The Plant Journal*, *84*(2), 417–427. https://doi.org/10.1111/tpj.13021

Zimmer, A., Durand, C., Loira, N., Durrens, P., Sherman, D. J., & Marullo, P. (2014). QTL Dissection of Lag Phase in Wine Fermentation Reveals a New Translocation Responsible for *Saccharomyces cerevisiae* Adaptation to Sulfite. *PLoS ONE*, *9*(1), e86298. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086298

## C. Principaux résultats

Les résultats principaux sont :

- Présence de larges translocations chez trois des six parents intervenant dans les cinq croisements réalisés, à savoir : le parent de la population Roquefort et les deux parents de la population bois de coupe / contamination alimentaire. Chaque parent présente des translocations de régions différentes.
- Présence de "points froids" de recombinaisons liés à ces translocations et pouvant s'étendre au-delà des régions concernées du fait d'incompatibilité allélique.
- Présence de biais de ségrégation majoritairement en défaveur des allèles des parents de populations fromagères à mettre en lien avec la plus faible fertilité de ces populations domestiquées.
- Existence de trois régions pléiotropes présentant des effets sur la pigmentation, la lipolyse et la protéolyse. Les deux parents domestiqués, Roquefort et non-Roquefort, présentent des régions pléiotropes différentes ce qui indique une possible convergence liée à la domestication.
- Mise en évidence de régions QTL pour tous les caractères à l'exception de la croissance ouvrant la porte à des améliorations variétales par sélection assistée par marqueur chez *P. roqueforti*.

# V. Discussion générale et perspectives

La domestication des microorganismes est un domaine favorable à l'étude de l'adaptation locale ; notamment, parce qu'elle implique une sélection forte et récente dans un environnement connu et pour des caractères connus. Les pratiques de production alimentaire humaine, notamment de produits fermentés, ont fait apparaître de nouvelles niches écologiques possédant des conditions biotiques et abiotiques spécifiques. Des pressions de sélection différentes entre les biotopes d'origine des espèces domestiquées et leurs environnements de domestication induisent des adaptations locales. Dans ce contexte, les espèces pour lesquelles sont connues des populations domestiquées et des populations qui ne le sont pas offrent un cadre utile pour l'étude des différenciations génétique et phénotypique. C'est le cas de l'espèce *Penicillium roqueforti* qui fait partie des microorganismes d'intérêt agroalimentaire, domestiquée pour son utilisation dans la production de fromage à pâte persillée, mais qui a aussi des représentants dans d'autres niches écologiques. L'impact de *P. roqueforti* sur la production fromagère a largement été étudié en particulier au niveau organoleptique, notamment son impact sur le pH, la texture ou les arômes des fromages produits (Cantor *et al*., 2004 ; Coton *et al*., 2020). Cependant, nombre de caractéristiques physiologiques et métaboliques de *P. roqueforti,* notamment sa résistance aux acides organiques, son halotolérance, sa psychrotolérance et sa micro-aérotolérance, ont été déterminées avant que l'on ait connaissance d'une structuration en différentes populations. Il n'est ainsi pas possible de différencier les caractéristiques qui résulteraient de caractéristiques de l'espèce, d'une adaptation locale à un biotope dit "sauvage" (souvent tout de même anthropisé) ou à l'environnement de domestication (c.à.d le fromage).

Cette thèse s'inscrit dans la continuité de travaux dont l'objectif est d'apporter des connaissances sur les conséquences de la domestication sur les génomes et les phénotypes chez *P. roqueforti* (Ropars *et al*., 2014 ; Gillot *et al*., 2015 ; Ropars *et al*., 2017 ; Gillot *et al*., 2017b ; Dumas *et al*., 2020 ; Caron *et al*., 2021). Les travaux précédents utilisant le prisme des populations ont étudié des différences de lipolyse, protéolyse, croissance et/ou sporulation dans des milieux en lien avec la domestication à savoir le fromage et le pain de seigle (Dumas *et al*., 2020). Ces études ont aussi porté sur l'impact spécifique des populations sur les propriétés organoleptiques des fromages (Caron *et al*., 2020).

Cette étude, dans le cadre collaboratif du programme ANR FUNGADAPT entre le LUBEM (Université de Bretagne Occidentale) et ESE (Université Paris-Saclay), visait à approfondir nos connaissances sur l'adaptation locale et la domestication des populations au sein de l'espèce *P. roqueforti*. Pour cela, l'étude a cherché à approfondir la caractérisation phénotypique des populations de *P. roqueforti* en mesurant l'impact de facteurs abiotiques sur la croissance de souches associées aux différentes populations, à déterminer les profils et niveaux de production en métabolites de chacune

des populations, et à déterminer l'architecture génétique de caractères liés à l'adaptation des populations via une approche de cartographie QTL.

Dans un premier temps, nous avons décrit l'existence d'une cinquième population de *P. roqueforti* associée au « Bleu de Termignon » qui a ainsi pu être intégrée par la suite aux études de phénotypage des populations (Cf. Chapitre II).

La découverte d'une cinquième population associée à une appellation fromagère géographiquement restreinte (4 producteurs fermiers présents dans les alpages de Termignon) offre des perspectives pour la suite de la recherche chez *P. roqueforti*. En effet, c'est une population pour le moment uniquement associée à une appellation pour laquelle *P. roqueforti* n'est pas inoculé, contrairement à la majorité des fromages bleus desquels des souches ont pu être isolées jusqu'à présent. Cette observation montre l'intérêt de faire des isolements à partir de fromages dans lesquels la moisissure n'est pas inoculée. C'est par exemple le cas des fromages Castelmagno et Strachitunt en Italie qui peuvent présenter un persillage naturel comme observé dans le bleu de Termignon et font l'objet d'appellations d'origine protégée depuis 1996 et 2013, respectivement. Les isolats obtenus à partir de ce type de productions fromagères pourraient offrir à l'avenir un intérêt particulier. En effet, ces nouveaux isolats pourraient, d'une part, s'intégrer dans une population existante ou au contraire être associés à une population inconnue à ce jour. L'ajout de souches fromagères génétiquement fortement distinctes pourrait permettre d'introduire une nouvelle diversité dans les souches proposées aux producteurs et le développement de nouveaux types de produits. En effet, les deux populations fromagères largement utilisées comme ferment en production fromagère montrent une réduction de la diversité génétique et de la fertilité, en particulier la population "non-Roquefort". Cela pourrait également permettre d'obtenir des souches adaptées à d'autres procédés de fabrication. Dans cette optique, un effort d'isolement pourrait être fait en ciblant les appellations de fromages à pâte persillée naturelle hors Europe. En effet, malgré des efforts pour introduire des représentants issus de fromages bleus à travers le monde, ce sont principalement des isolats issus de productions françaises et, dans une moindre mesure, anglaises, italiennes ou espagnoles qui ont été obtenus et pour lesquels ont été séquencés des génomes (Gillot *et al*., 2015 ; Dumas *et al*., 2020 ; Crequer *et al*., 2023).

Cette découverte d'une cinquième population montre l'importance des campagnes d'isolement pour les études de diversité. De même que les isolats fromagers séquencés sont majoritairement issus de France et des pays frontaliers, les isolats issus d'ensilages et de contaminations alimentaires restent également majoritairement issus de France et de Belgique ou plus largement d'Europe bien qu'ici aussi des efforts importants ont été réalisés pour élargir les collections. La question de l'échantillonnage est une question qui se pose largement pour les études populationnelles. En effet, chez *Saccharomyces cerevisiae,* par exemple, un échantillonnage extensif de l'espèce dans des pays et

sur des matrices variées a permis de révéler un nombre de populations de plus en plus important et quasiment chaque nouveau biotope étudié conduit à la description d'une nouvelle population (Marr *et al*., 2023). Ce type d'étude a aussi pu déterminer une probable origine asiatique à l'espèce *S. cerevisiae*. Ces mises en évidence ont été rendues possibles grâce notamment au développement de méthodes permettant d'augmenter l'efficacité d'isolement via l'utilisation de milieux de culture contenant de l'alcool (Pontes *et al*., 2020). Ainsi, il pourrait être d'intérêt d'utiliser des milieux sélectifs adaptés à l'isolement de *P. roqueforti* par exemple, des milieux contenant de l'acide lactique ou des toxines produites par *P. roqueforti* pour lesquels *P. roqueforti* présente une plus forte tolérance que les microorganismes avec lesquels il est en compétition. D'autre part, les collections de laboratoires ou d'instituts existants à travers le monde possédant des souches d'origines variées dont le génome n'est pas encore séquencé pourraient offrir une meilleure compréhension de l'espèce en permettant l'accès à une diversité sans nécessiter de nouveaux efforts d'isolement. Un enrichissement du nombre et de la diversité de souches pourrait notamment permettre, de mettre en évidence de nouvelles populations ou bien de décrire plus finement de structurations internes aux populations décrites ou de renforcer le modèle actuel. Cela ouvrirait la porte à une meilleure compréhension de l'adaptation chez *P. roqueforti*. Depuis le séquençage des génomes des souches utilisées pour le premier article constituant ce manuscrit de thèse, de nouveaux génomes ont été séquencés ou publiés par d'autres équipes, ce qui pourrait permettre d'améliorer notre vision de la diversité et des structures des populations chez *P. roqueforti*.

Outre la description d'une nouvelle population au sein de l'espèce *P. roqueforti*, cette première partie a visé à approfondir la caractérisation phénotypique des populations de *P. roqueforti* en fonction de facteurs abiotiques en lien avec leurs niches écologiques d'origine. L'un des résultats de cette étude est la mise en évidence d'une adaptation de la population "non-Roquefort" aux conditions d'affinage des fromages se traduisant, notamment, par une plus forte tolérance au sel et à l'acide lactique. La plus forte tolérance au sel est en accord avec les travaux de l'étude de Dumas *et al* (2020). La plus forte résistance de cette population à l'acide lactique est en revanche un résultat nouveau dont l'origine génétique reste à explorer. Une étude de génomique des populations s'attardant sur la question de la présence de pompes à efflux d'acide lactique ou d'une dégradation plus efficace de l'acide lactique par la population "non-Roquefort" pourrait amener des éléments de réponse. Une autre approche possible pour identifier les déterminants génétiques responsables de la plus forte résistance de la population à l'acide lactique serait de comparer le profil transcriptomique de souches tolérantes de la population "non-Roquefort" à des souches d'autres populations en présence et en absence de lactate. Dans cette même étude, nous n'avons pas mis en évidence une utilisation plus efficace de l'acide lactique pour produire de la biomasse. Ce dernier résultat ne va pas dans le sens d'une métabolisation plus efficace de l'acide lactique. Cependant, cette hypothèse n'est pas à exclure. L'étude a aussi montré une tendance (non significative) de la population "non-Roquefort" à avoir une température optimale de

croissance plus basse que celle des autres populations. Il pourrait être intéressant d'aller au-delà de ce premier résultat et d'évaluer l'impact de la température sur la croissance en l'intégrant à des conditions de culture utilisant un milieu plus proche d'un milieu fromager. Une autre approche axée sur la température en lien avec la production fromagère serait l'impact d'un choc thermique. En effet, pour des appellations, comme le Gorgonzola ou le Roquefort, le caillage, qui a lieu après inoculation des ferments dont *P. roqueforti*, se produit à une température comprise en 30°C et 34°C (Cantor *et al*., 2004), ce qui correspond pour *P. roqueforti* à sa limite de croissance et induit probablement un stress (Nguyen van long *et al*., 2021, Crequer *et al*., 2023). La plus forte tolérance au sel et à l'acide lactique pourrait expliquer, pour partie, la meilleure colonisation des fromages par la population "non-Roquefort" par rapport aux populations « ensilage » et « bois/contaminant alimentaire » qui a été mise en évidence dans des études précédentes (Dumas *et al*., 2020 ; Caron *et al*., 2021). Cependant, si l'étude de Caron *et al*. (2021), montrait une plus forte colonisation des fromages de type Roquefort par la population "Roquefort" que par la population "non-Roquefort", nous n'avons pas mis en évidence pour cette population de phénotypes pouvant expliquer cette observation. Les conditions d'adaptation des deux populations à un milieu similaire (fromage) semblent donc avoir eu lieu via des adaptations différentes. Par la suite, il serait intéressant de s'attarder, soit à étudier de l'effet d'une covariation de facteurs environnementaux, soit de se concentrer sur les spécificités de la production de fromage de l'appellation Roquefort pour déterminer les caractères de la population "Roquefort" responsables de son adaptation à ce type de fromage. Aussi, il serait intéressant de comparer les profils d'expressions génétiques de chacune des cinq populations, notamment en condition fromagère, par une approche transcriptomique ; cela afin d'identifier des gènes dont l'expression pourrait être liée à l'adaptation des populations "Roquefort" et "non-Roquefort" au milieu fromager.

Un autre résultat important de cette étude est la plus forte croissance des populations "ensilage" et "bois/contaminants" par rapport aux populations domestiquées "Roquefort" et "non-Roquefort" avec divers carbohydrates, c.à.d. saccharose, xylose, lactose, pectine comme seule source de carbone. Cette plus forte croissance de la part des populations non-fromagères pourrait être liée à une adaptation à un milieu riche en carbohydrates comme peuvent l'être des milieux d'origine végétale tels que les ensilages, le bois ou certains aliments contaminés (pain, farine, pomme, compote de fruit…). Il serait maintenant intéressant d'investiguer les gènes de « Carbohydrate Active enZymes » (CAZymes) ou des transporteurs de glucides afin de vérifier s'il existe des expansions au niveau de ces familles, des pseudogénisations ou des différences d'expression de ces gènes. Ce caractère pourrait également être lié à l'adaptation de la population ancestrale à l'ensemble de l'espèce *P. roqueforti* et être dégénéré chez les populations "Roquefort" et "non-Roquefort". Une contraction du nombre de CAZymes a notamment été montrée dans les espèces du genre *Mucor* associées au fromages et pourrait être un marqueur lié au mode de vie en milieu fromager (Lebreton *et al*., 2020). En effet, l'utilisation des sucres chez les populations "Roquefort" et "non-Roquefort" pourrait être

soumise à une faible pression de sélection dans un milieu fromager dans lequel les carbohydrates sont rapidement consommés par les bactéries lactiques. Une telle dégénérescence d'un caractère a été observée chez *P. roqueforti* pour la reproduction sexuée chez les populations associées au fromage (Ropars *et al*., 2016). Cette observation est également appuyée par l'étude du chapitre IV par l'observation de forts biais de ségrégation en défaveur d'allèles des parents "Roquefort" et "non-Roquefort" dans certaines régions du génome de la première génération des croisements. Ces biais de ségrégation révèlent une diminution de la "fitness" ou une inviabilité post-zygotique dont l'étude pourrait permettre d'améliorer la compréhension de la reproduction sexuée chez les *Penicillium* dont la forme sexuée est rarement déterminée. Dans cette optique, il pourrait être intéressant de renforcer l'étude des gènes de la région dont des gènes qui n'ont pas de fonction prédite et d'étudier leurs expression dans le contexte de la reproduction (ascospore, dicarion...)

La première étude réalisée au cours de cette thèse a, aussi, cherché à tester l'effet de fongicides utilisés dans le traitement de cultures (tébuconazole), ou en additif alimentaire (natamycine ou sorbate de potassium). Cette étude n'a pas montré de résistance plus grande de la part de certaines populations face à ces antifongiques. Cela peut s'expliquer par une exposition trop récente et/ou trop faible des populations à ces antifongiques pour participer à une adaptation chez ces populations. Cependant, Punt *et al.* (2022) ont montré que certaines souches de *P. roqueforti* possèdent dans leur génome une région, nommée SORBUS, permettant une résistance au sorbate ; cependant, celle-ci n'est pas directement liée à une population en particulier. La présence de régions favorables à une adaptation locale pourrait devenir un facteur structurant. Dans notre étude, la souche montrant la plus forte résistance au sorbate est la seule souche phénotypée possédant la région SORBUS. Pour continuer à explorer les phénotypes résultant d'une adaptation locale des populations de *P. roqueforti* d'autres tests phénotypiques en lien avec les biotopes d'origine des populations pourraient être explorés. Parmi ceux-ci, la capacité à capter ou à tolérer des ions, tels que le fer, le calcium ou le magnésium, la production de sidérophores ou bien l'impact de la composition de l'atmosphère sur la croissance des différentes populations pourraient être explorés. Pour le moment les études s'intéressant à l'adaptation des populations de *P. roqueforti*, dont celles réalisées pour cette thèse, se sont principalement intéressées à l'adaptation au milieu fromager. Des expériences cherchant à comparer la croissance, l'expression des gènes et/ou la production de métabolites des populations en milieu se rapprochant des biotopes de populations non-fromagères, comme les ensilages, le bois ou les aliments les plus fréquemment contaminés, pourraient être envisagées.

Pour l'étude du chapitre III, nous nous sommes intéressés à un autre marqueur pouvant être en lien avec une adaptation locale des populations, à savoir la production de métabolites, y compris des mycotoxines. Les métabolites secondaires, parfois appelés métabolites spécialisés, peuvent avoir un rôle, notamment, dans la compétition et la coopération intra- ou inter-spécifique, la structure cellulaire ou la résistance à différentes conditions abiotiques (Hautbergue *et al*., 2018). Dans ces travaux de

thèse, nous avons mis en évidence des différences de profil de production de métabolites entre populations, notamment, à travers la comparaison de la production de sept métabolites ciblés et de 40 métabolites déterminés *in silico* sur la base de spectres MS/MS. Ces différences se caractérisent, notamment, par une plus grande diversité de métabolites (p.ex. terpènes et acide gras azotés) produits par les populations non-domestiquées. Parmi les 40 métabolites, 14 métabolites ont pu être identifiés. Ils comprennent des métabolites auparavant mis en évidence comme étant produits par *P. roqueforti* tel que des dérivés de l'acide mycophénolique, l'érémofortine C, des alcaloïdes tels que l'agroclavine, la festuclavine et la roquefortine D, ou encore les tétrapeptides D-Phe-L-Val-D-Val-L-Phe et D-Phe-L-Val-D-Val-L-Tyr. Les 26 autres métabolites n'ont pu être identifiés qu'au niveau de la formule brute et de la classe de molécule. Il serait ici intéressant pour la suite d'améliorer l'identification de ces métabolites soit par des approches de spectrométrie de masse plus fine permettant de différencier des isomères, ou par une approche complémentaire de spectrométrie par résonance magnétique nucléaire (RMN). L'isolement de ces métabolites, via des approches préparatives, pour tester leur activité, et ainsi permettre de comprendre un potentiel rôle écologique ou pour déterminer d'éventuels potentiels biotechnologiques est également une piste à explorer. En effet, des métabolites produits par *P. roqueforti* sont d'intérêt pour leur potentiel biotechnologique comme l'acide mycophénolique pour son activité immunosuppressante ou encore l'andrastine A pour sa potentielle activité anticancéreuse (Matas *et al*., 2013 ; Ge *et al*., 2009 ; Matsuda *et al*., 2013). D'autre part, 38 des 47 métabolites présentent des niveaux de production différents entre populations ce qui suggère un rôle de ces métabolites dans l'adaptation des populations à leurs conditions environnementales. Parmi les rôles probables des métabolites spécialisés, on retrouve un rôle dans l'interaction microbienne que ce soit dans la compétition, par des activités antibiotiques, ou dans la communication microbienne. Dans cette optique, il serait d'intérêt de déterminer l'effet des populations sur la production de ces métabolites en confrontation avec d'autres microorganismes présents dans leurs niches écologiques respectives, et/ou de tester leur activité antimicrobienne ou sur des tissus végétaux.

Pour la suite de l'étude, plusieurs axes sont à envisager comme par exemple la détermination des conditions favorables à la production des métabolites (composition et condition du milieu, présence de compétiteurs…) et déterminer les gènes impliqués dans leur production. Une piste de recherche pour déterminer les gènes impliqués dans la biosynthèse des métabolites supplémentaires identifiés ou partiellement identifiés pourrait être d'étudier en premier lieu les clusters de gènes de biosynthèse de métabolites secondaires identifiés *in silico* par des outils tels qu'Antismash (Blin *et al*. 2019). En effet, environ 34 clusters de gènes de biosynthèse ont pu être déterminés par ce type d'approche dont moins de dix sont actuellement décrits (Coton *et al*, 2020 ; Chavez *et al*., 2023 ; Metin, 2023). Pour déterminer des clusters plus probablement impliqués dans la production des métabolites, la classe de la molécule ciblée déterminée *in silico* (terpène, polycétide, alcaloïde, amide

d'acide gras...) et le type de cluster de biosynthèse identifié sont à mettre en parallèle. Pour certains de ces métabolites, les pistes sont plus évidentes comme pour la production de l'agroclavine qui pourrait partager une partie de sa voie de production avec celle de l'isofumigaclavine A (Gerhards & Li., 2017). Ainsi, ce sont principalement les gènes présents dans le cluster A de l'isofumigaclavine chez *P. roqueforti* qui sont communs à la voie de production comprenant l'agroclavine décrite chez *Claviceps purpurea* (Gerhards & Li., 2017 ; Martin *et al*., 2017). Cependant, l'implication des gènes de ce cluster dans la production d'agroclavine n'a pas encore été démontrée chez *P. roqueforti.* Une piste pour la production des tétrapeptides "D-Phe-L-Val-D-Val-L-Phe", "D-Phe-L-Val-D-Val-L-Tyr" et "cyclo-D-Phe-L-Val-D-Val-L-Phe" est probablement à chercher du côté des gènes homologues aux gènes du cluster de production de la nidulanine qui a été prédit chez *Aspergillus nidulans* et dont chacun de ces métabolites sont des intermédiaires (Andersen *et al*., 2013). L'étude de génomes de *P. roqueforti* permet d'identifier un cluster incomplet similaire à celui de la nidulanine (Ye *et al.*, 2024).

Un second résultat important présenté dans le chapitre III est la faible production de la PR toxine par les populations "Roquefort" et "non-Roquefort". Pour la population " Roquefort", celle-ci n'est pas associée à une modification de la séquence nucléotidique du cluster de biosynthèse. L'hypothèse que l'on propose est donc celle d'une régulation en trans. L'hypothèse de la régulation pourrait être à creuser notamment par une comparaison de l'expression des gènes du cluster entre les populations. D'autre part, l'étude du chapitre III identifie la présence d'un codon STOP prématuré dans le gène ORF 11 (codant une cytochrome P450) du cluster de biosynthèse de la PR toxine dans la population non-Roquefort. Notre hypothèse est que cette mutation explique à la fois la faible production de la PR toxine et l'accumulation des intermédiaires réactionnels que sont les érémofortines A et B par la population "non-Roquefort". D'autre part, le terpène 10, pourrait être l'érémofortine C (même formule brute et classe de molécule). Ce terpène n'est pas plus faiblement produit par la population "non-Roquefort", ce qui placerait l'intervention de l'ORF11 entre la production de l'érémofortine C et la production des érémofortine A et B. Ceci modifie la vision précédente plaçant l'intervention de l'ORF5, qui code aussi pour un cytochrome P450, à cette position (Hidalgo *et al*., 2017). D'autant plus que les résultats de l'étude Hidalgo *et al* (2017) sont cohérents avec une intervention plus tôt dans la voie de l'ORF5 dont le "silencing" entraîne une accumulation d'érémofortine B et une diminution significative de la production érémofortine A et de la PR toxine. Pour tester cette hypothèse, une étude utilisant soit la technologie CRISPR-Cas9, pour faire du "knock-out" de cet ORF dans une souche productrice de PR toxine, soit de la complémentation de gènes, par transformation avec un plasmide porteur du gène ORF 11 complet chez une souche "non-Roquefort", pourrait être envisagée. La technologie CRISPR-Cas9 a déjà été utilisée avec succès chez *P. roqueforti*, notamment pour obtenir des mutants ne produisant pas de mélanine ou dans l'étude du rôle de la région SORBUS (Seekles *et al.*, 2021; Punt *et al*., 2022). Le même type d'approche pourra être envisagé pour d'autres clusters de biosynthèse dont les candidats pour la production des

nouveaux métabolites mis en évidence dans le chapitre III. La faible production de la PR toxine par les deux populations “Roquefort” et “non-Roquefort”, et l’absence de production d’acide mycophénolique chez la population “non-Roquefort” due à une délétion dans le gène *mpaC* auparavant associée à la présence des régions *CheesyTer* et *Wallaby* (Gillot *et al*., 2017a) tend à montrer une sélection vers un caractère hypotoxinogène ou une dégénérescence du caractère toxinogène chez les populations domestiquées.

Lors de la première partie de ce travail (Cf. Chapitre II), correspondant à l’étude de l’impact de facteurs abiotiques sur la croissance, la population “Termignon” a montré un phénotype intermédiaire entre les populations domestiquées “Roquefort” et “non-Roquefort”, et les populations non-domestiquées “ensilage” et “bois / aliments contaminés”. De plus, la population « Bleu de Termignon » partage avec les populations non-domestiquées une production de métabolites plus diversifiée que celle des autres populations fromagères, avec notamment une production plus importante de dérivés de l’acide mycophénolique (Cf. chapitre III). D’autre part la population “Termignon” possède en commun avec la population “non-Roquefort” les région CheesyTer (pour les quatre souches) et Wallaby (pour deux souches). Ces caractéristiques intermédiaires entre les populations domestiquées et les populations non-domestiquées appuient l’idée d’une domestication progressive de souches locales pour une production fromagère. L’effet de la domestication a ensuite pu être accentué par des changements de pratiques introduisant une inoculation de la moisissure par les producteurs pour les lignées des populations « Roquefort » et « non-Roquefort ». Ces observations peuvent induire une question : la population Termignon est-elle une population domestiquée ? Une hypothèse de travail peut être que la population Termignon serait descendante d’une population ancestrale commune avec la population “non-Roquefort” présentant les premiers stades de la domestication. Cette prémisse à la domestication serait renforcée, pour la population “non-Roquefort”, par une sélection forte, d’un clone unique, aboutissant à la population actuelle alors que la population “Termignon” aurait conservé des caractéristiques plus proches de la population ancestrale. Cependant, suivant la définition de domestication prise en introduction, la population Termignon peut être considérée comme fournissant un service écologique à l’être humain, mais ne pas être une population domestiquée, au sens que l’on n’a pas mis en évidence une pratique assurant un contrôle de la survie et de la reproduction de cette population par l’être humain, mais cela à pu être le cas par le passé. Cette population a uniquement été retrouvée en contexte fromager et n’est représentée à ce jour que par un faible nombre de souches ce qui tend à garder la question ouverte en attente d’isolats et d’études supplémentaires.

Dans le cadre de l’étude QTL (cf. chapitre IV), et avant que je ne commence cette thèse, des assemblages des génomes de chaque parent utilisé ont été réalisés. Ces assemblages nous ont notamment permis d’identifier des translocations de larges régions chez trois des six parents utilisés pour les croisements. Ces réarrangements ont induit une perte de viabilité pour certaines combinaisons

alléliques qui ne se retrouvent pas chez les descendants. Ces cas correspondent, d'une part, à une absence des régions aux deux sites d'insertion identifiés pour toutes les régions transloquées et, d'autre part, à une présence de la région quel que soit le site d'insertion considéré pour toutes les régions transloquées, à l'exception de la région qui concerne le parent de la population « Roquefort ». Deux translocations, concernant pour l'une la souche LCP06037 et pour l'autre la souche LCP06039 de la population « bois/contaminant », montrent des signes d'un intermédiaire circulaire qui pourrait être un nouveau type de transposon, permettant la mobilité de larges régions comme les "*Starships*" récemment décrits chez les champignons (Gluck-Thaler *et al*., 2022). Toutefois, aucune de ces régions ne possède de gènes "Captain" DUF3435 caractéristiques des "*Starships*" ou ne présente de signature d'éléments transposables au sein des régions flanquantes. Par ailleurs la présence de "*Starships*" a déjà été mise en évidence chez *P. roqueforti* notamment pour l'acquisition de la région *Wallaby* (Gluck-Thaler *et al*., 2022 ; Urquhart *et al.*, 2023). Une analyse comparative des génomes de *P. roqueforti* séquencés jusqu'à présent pourrait notamment permettre de déterminer la fréquence et la distribution de ce type de translocations, pour le moment observées uniquement chez des souches des populations « Roquefort » et « bois/contaminant », en plus de l'acquisition de nouveaux matériels génétiques par transferts horizontaux. Ce résultat renforce l'idée que les génomes fongiques sont particulièrement dynamiques avec des mouvements de gènes fréquents, liés à des translocations au sein du génome ou à des transferts horizontaux, qui contribuent aux dynamiques adaptatives (Bucknell & McDonald, 2023).

Outre la comparaison des génomes parentaux, l'étude a permis d'identifier, à travers les cinq croisements, des QTLs liés à tous les phénotypes testés à l'exception de la croissance, à savoir, la couleur, l'activité lipolytique, l'activité protéolytique et la production de métabolite secondaire (MPA, andrastine A, roquefortine C, iso-fumigaclavine, PR toxine et érémofortines A et B). Trois régions concentrent à la fois des QTLs pour la lipolyse, la protéolyse, la pigmentation et la production de métabolites secondaires (effet pléiotrope). Deux de ces trois régions, sur le chromosome 1 et 2, sont liées au croisement faisant intervenir le parent de la population "Roquefort", la troisième région, sur le chromosome 3, est présente pour les croisements faisant intervenir le parent de la population "non-Roquefort". Ces régions sont liées à une même tendance sur les phénotypes du parent de population domestiquée concerné, à savoir une couleur tirant plus fortement vers le bleu, une lipolyse accentuée et une plus faible protéolyse. Ceci suggère soit une clusterisation ou un rapprochement de gènes effecteurs des phénotypes d'intérêt à des loci différents pour les deux populations, soit que la domestication des deux populations a impliqué une sélection sur des régulateurs majeurs (régulateur agissant sur plusieurs phénotypes) permettant l'obtention de phénotypes similaires. Un contrôle des caractères d'intérêt faisant intervenir un faible nombre de QTL à effet pléiotrope, via des régulateurs majeurs, a déjà été rapporté chez des plantes et animaux domestiqués (Martinez-Ainsworth & Tenaillon, 2016). Le fait que ce ne soit pas les mêmes régions, donc pas les mêmes régulateurs,

indique que la régulation des phénotypes pourrait ne pas répondre aux mêmes stimuli. Dans la région du chromosome 2, qui concerne le parent "Roquefort", se trouve le régulateur *pcz1*, impliqué dans la croissance, la conidation et la germination des spores, et la production de métabolites secondaires (Gil-Durán *et al*., 2015 ; Rojas-Aedo *et al*., 2018). Son impact démontré sur la conidiation et la production de métabolites secondaires est à mettre en lien avec l'impact de la région QTL sur la couleur, et la production d'andrastine A et d'iso-fumigaclavine A. Il serait intéressant de déterminer, via une approche ciblée, si *pcz1* impacte également la lipolyse et la protéolyse en lien avec la région QTL. D'autre part, il serait intéressant de déterminer si les régions pléiotropes présentent des signes de sélection positive, par une approche de génomique des populations.

Parmi les QTLs décrits, certains comprennent des clusters de biosynthèse déjà mis en évidence. C'est le cas pour la production de métabolites secondaires des clusters de biosynthèse de la PR toxine et de l'acide mycophénolique. Dans le premier cas, nous avons observé une perte de production de la PR toxine et une augmentation de la production de ses intermédiaires réactionnels, érémofortines A et B. Dans le second cas, nous avons relevé une absence de production de MPA associée à la présence de l'allèle "non-Roquefort". Ces résultats sont à mettre en lien avec les résultats du chapitre III, montrant une substitution introduisant un codon STOP dans le cluster de la PR toxine et une délétion dans le gène *mpaC* du cluster de biosynthèse uniquement dans la population "non-Roquefort". Ceci confirme l'implication directe des clusters dans les différences de phénotypes observées précédemment. Un QTL associé à la production de Roquefortine C au niveau de son cluster de biosynthèse et un QTL associé à la couleur dans le cluster de production de la mélanine ont également été identifiés. Contrairement au cluster de la PR toxine et du MPA, nous n'avons pas observé de variation majeure des clusters de biosynthèse, mais des substitutions nucléotidiques existent. Il serait intéressant d'évaluer l'effet des substitutions sur la conformation tridimensionnelle des protéines produites et sur les niveaux d'expression des gènes du cluster afin d'approfondir la compréhension des déterminants génétiques responsables de la variation phénotypique de ces caractères entre les deux parents. D'autre part, les données de spectrométrie de masse obtenues pour l'analyse des QTLs pourraient être utilisées pour analyser des QTLs associés à la production des métabolites supplémentaires déterminés dans le chapitre III. Ces résultats pourraient alors être associés à une comparaison des séquences des clusters de biosynthèse putatifs présents dans la région des parents des croisements concernés pour déterminer des clusters cibles. Ce travail est envisagé pour la suite et pourrait permettre d'identifier des cibles pour une étude fonctionnelle de la production de ces métabolites.

Globalement, nous avons observé une grande diversité phénotypique pour les caractères testés à travers la descendance des croisements avec de la transgression par rapport aux valeurs phénotypiques parentales. Cette diversité est d'autant plus grande si l'on considère l'ensemble des croisements, ce qui est prometteur dans un objectif d'obtention de souches permettant la production de

nouveaux types de produits. De plus, nous avons identifié des QTLs pour l'ensemble des phénotypes testés, à l'exception de la croissance, qui permettent d'envisager des approches de sélection assistée par marqueur. En outre, la présence de fort biais de ségrégation dans les croisements suggère la présence d'allèles délétères dans les populations domestiquées "Roquefort" et "non-Roquefort", les croisements entre ces populations et/ou avec d'autres populations pourraient permettre de purger ces allèles délétères des lignées fromagères. La détection de QTLs pour la production de métabolites permet d'envisager l'obtention de souches ne produisant pas ou peu de toxines afin de renforcer la protection contre des risques d'exposition à des molécules indésirables. La détection de QTLs pour la couleur, la dégradation de protéines et de lipides pourrait être d'intérêt dans l'optique d'amélioration variétale pour la production fromagère. La pigmentation des souches a un impact sur l'aspect visuel des fromages produits et est importante pour les choix des consommateurs. D'autre part, la lipolyse et la protéolyse ont un impact sur la texture, le goût et la production des arômes présents dans les produits finaux (Cantor *et al*., 2004). Ce type d'approche par croisement peut permettre d'introduire une nouvelle diversité de saveurs et d'arômes dans les fromages produits qui pourrait être d'intérêt dans une logique de segmentation du marché. Dans cette optique, il serait intéressant de comparer les profils aromatiques de souches obtenues par ces croisements, pour vérifier si les différences d'activités lipolytique et protéolytique observées se traduisent bien dans la diversité et l'abondance de molécules aromatiques produites.

Malgré un faible nombre de souches, la population "Termignon" a montré une diversité génétique plus grande que celles des populations "Roquefort" et "non-Roquefort", la présence des deux types de gènes de compatibilité sexuelle (MAT1-1 et MAT-1-2) et des signes de recombinaisons. Ceci tend à indiquer que la population "Termignon" pourrait également être utilisée par la suite pour introduire, par croisements, de la diversité dans les souches utilisées en production fromagère. Il serait intéressant dans cette optique de tester la fertilité intra- et interpopulations des souches de la population "Termignon".

# VI. Conclusion

Au global, cette thèse a permis d'explorer différents aspects, physiologique, métabolique et génomique chez les populations de *P. roqueforti* via l'utilisation d'approches méthodologiques variées (suivi de croissance par néphélométrie laser, modélisation, spectrométrie de masse ciblée et non ciblée, comparaison de clusters génétiques, cartographie QTL...) afin de mieux appréhender les ressorts de l'adaptation des populations de *P. roqueforti* à leur niche écologique. Elle a aussi ouvert de nouveaux questionnements scientifiques, notamment concernant la caractérisation phénotypique et l'histoire évolutive d'une nouvelle population fromagère, les causes génétiques de la tolérance à l'acide lactique de la population "non-Roquefort", ou de la métabolisation des sucres et de la production de métabolites secondaires des populations "ensilage", le rôle adaptatif de métabolites différentiellement produits par les populations, l'identification de l'architecture génétique de la domestication ou encore la mise en place de programme d'amélioration variétale pour la production fromagère. L'étude de ces aspects pourrait permettre, sur un plan fondamental, à la fois d'améliorer notre compréhension des mécanismes et des facteurs associés à l'adaptation chez *P. roqueforti* et de préciser et/ou d'aboutir à la caractérisation de nouveaux clusters métaboliques. Sur un plan appliqué, ces développements pourraient permettre d'ouvrir la possibilité d'amélioration variétale pour la production fromagère avec la sélection de souches permettant d'améliorer la qualité et la diversité des fromages bleus et/ou pour la production de métabolites d'intérêt biotechnologique à travers le développement de souches plus fortement productrices et en caractérisant l'activité de nouveaux composés.

# Valorisations

**Article publié:**

Crequer, E., Ropars, J., Jany, J.-L., Caron, T., Coton, M., Snirc, A., Vernadet, J.-P., Branca, A., Giraud, T. & Coton, E. (2023) A new cheese population in *Penicillium roqueforti* and adaptation of the five populations to their ecological niche. *Evolutionary Applications*, **16**, 1438–1457.

**Article soumis:**

Crequer, E., Coton, E., Cueff, G., Christiansen, J.V., Frisvad, J.C., Rodriguez de la Vega, R., Giraud, T. & Coton, M. Different metabolite profiles across *Penicillium roqueforti* populations associated with ecological niche specialisation and domestication. Submitted. Preprint Biorxiv/2024/575369. https://doi.org/10.1101/2024.01.12.575369

**Article en cours de finalisation:**

Caron, T., & Crequer, E., Le Piver, M., Le Prieur, S., Brunel, S., Snirc, A., Vernadet, J-P., Cueff, G., Roueyre, D., Place, M., Chassard, C., Simon, A., Rodriguez de la Vega, R., Coton, M., Coton, E., Foulongne-Oriol, M., Branca, A. & Giraud, T. Generation of diversity in the blue cheese mold *Penicillium roqueforti* and identification of pleiotropic QTL for key cheese-making phenotypes.

**Présentations orales :**

Crequer, E., Coton, M., Jany, J.-L., Ropars, J., Branca, A., Giraud, T. & Coton, E. Étude par néphélométrie laser de l'influence de facteurs abiotiques sur la croissance de différentes populations de *Penicillium roqueforti*. 9 novembre 2021. Institut Brestois Santé-Agro-Matière; France, Brest.

Crequer, E., Caron, T., Coton, M., Jany, J.-L., Ropars, J., Branca, A., Giraud, T. & Coton, E. Adaptive differences between *Penicillium roqueforti* cheese and non-cheese populations. 23 november 2021. Symposium fungal genetics Ile-de-France; France, Paris.

Crequer, E., Caron, T., Coton, M., Jany, J.-L., Ropars, J., Branca, A., Giraud, T. & Coton, E. Adaptive differences between *Penicillium roqueforti* "cheese" and "non-cheese" populations. 1 July 2022. Journées des doctorants de l'ED EGAAL; France, Rennes.

Crequer, E., Caron, T., Coton, M., J., Jany, J.-L., Ropars, J., Branca, A., Giraud, T. & Coton, E. Adaptive differences between *Penicillium roqueforti* cheese and "non-cheese" populations. 18 July 2022. ICFM/ICPA workshop: Food Mycology - Taxonomy, Spoilage and Mycotoxins; Netherlands, Utrecht.

Crequer, E., Caron, T., Jany, J.-L., Ropars, J., Branca, A., Giraud, T., Coton, E & Coton, M. Distinct extrolite profiles in the different *Penicillium roqueforti* populations. 22 septembre 2022. Journées mycotoxines de Marseille; France, Marseille.

Crequer, E., Caron, T., Coton, M., Jany, J.-L., Ropars, J., Branca, A., Giraud, T. & Coton, E. Phenotypic differences between "cheese" and “non-cheese” populations of *Penicillium roqueforti*, the blue cheese fungus. 16 november 2022. Réunion du réseau E3GP3 (Ecology, Evolution, Epidemiology and Population Genetics of Plant Pathogenic Microorganisms); France, Paris.

Crequer, E., Jany, J.-L., Cueff, G., Caron, T., Ropars, J., Frisvad, J., Christiansen, J., Branca, A., Giraud, T., Coton, E & Coton, M. Linking distinct extrolite profiles to the different genetic populations within Penicillium roqueforti.June 05-07 2023. 44th Mycotoxin Workshop. Celle, Germany.

**Poster:**

Crequer, E., Caron, T., Jany, J.-L., Ropars, J., Branca, A., Giraud, T., Coton, E & Coton, M. Mycotoxin production among *Penicillium roqueforti* populations. 01 june 2022. Workshop mycotoxin 2022; France, Toulouse.

# Distinct extrolite profiles in the different *Penicillium roqueforti* populations

Ewen Crequer[a,b], Thibault Caron[b], Jean-Luc Jany[a], Jeanne Ropars[b], Tatiana Giraud[b], Antoine Branca[b], Emmanuel Coton[a] and **Monika Coton[a]**

a. Univ. Brest INRAE, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, F-29280 Plouzané, France
b. Université Paris-Saclay, CNRS, AgroParisTech, Laboratoire Ecologie Systématique et Evolution, UMR 8079

Email: ewen.crequer@univ-brest.fr

## Context

- *Penicillium roqueforti* : a fungus famous for its use in blue-veined cheese making and its potential for extrolite production (Gillot *et al*. 2017).
- Five differentiated populations associated with different environments: silage, food spoiler/lumber and three cheese populations, including a newly described one from Termignon blue cheeses.
- Cheese populations result from independent domestication events and present contrasted phenotypic traits (Dumas *et al*. 2020; Caron *et al*. 2021).

Do *Penicillium roqueforti* populations present different extrolite production profiles?

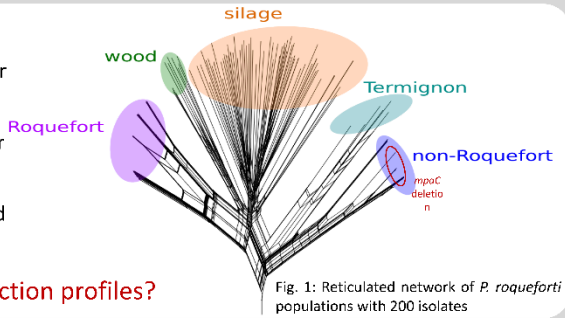
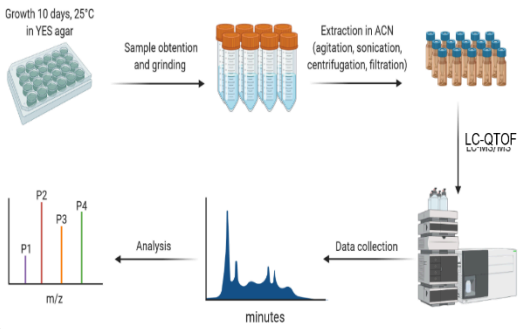



Fig. 1: Reticulated network of *P. roqueforti* populations with 200 isolates

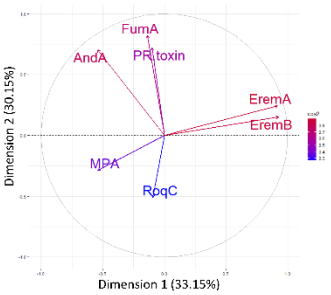
## Extrolites evaluated:

- Fumigaclavin A (FumA)
- Andrastin A (AndA)
- Roquefortin C (RoqC)
- Mycophenolic acid (MPA)
- PR toxin
- Eremofortin A (EremA)
- Remofortin B (Erem B)

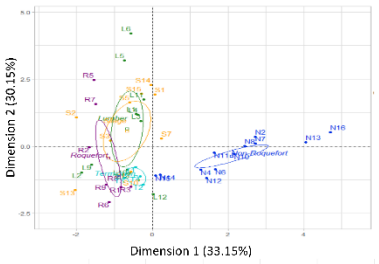
## Miniaturized screening method:

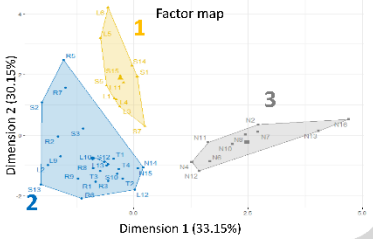



## Lower extrolite production in cheese populations




PCA results for mycotoxin production profiles of individual strains expressed in ng/g of biomass

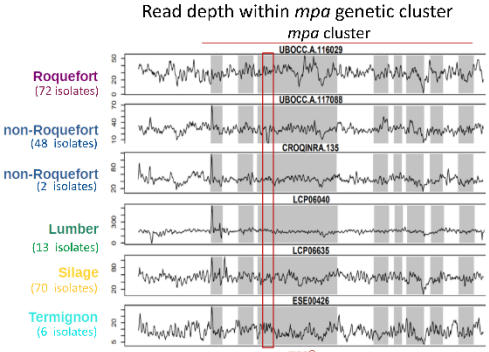


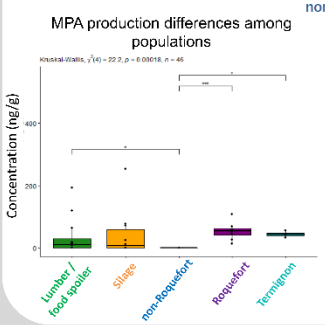




- 1: High extrolite productions Wild (Silage – Lumber/ food spoiler ½)
- 2: Low extrolite productions except MPA and RoqC Roquefort – Termignon – wild (½)
- 3: Low extrolite productions (hypotoxigenic profil) but high eremofortin productions Non-Roquefort

## Absence of MPA production generalized in the non-Roquefort cheese population

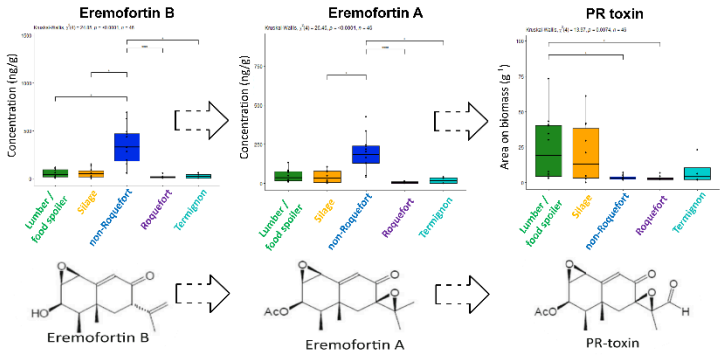
Deletion in *mpaC* for "non-Roquefort cheese" population except for two early divergent strains (Fig. 1)




- No MPA produced among "non-Roquefort cheese" population strains
- Variable production for "silage" and "lumber/ food spoiler" strains with some not producing MPA despite a complete *mpaC* gene

## Lower PR-toxin production by "cheese" populations




- High eremofortin and low PR-toxin productions Non-Roquefort
- Low PR-toxin and intermediates productions Roquefort
  Down expression of the PR-toxin cluster?

## Conclusions

- Three different extrolite production profiles within *Penicillium roqueforti*.
- No MPA production by "non-Roquefort" strains.
- Lower PR-toxin production in domesticated populations contributing to safety of blue cheeses

## Perspectives

- Determination of extrolite production by the two *mpaC*[+] strains for a better understanding of this population domestication history.
- Comparison of the PR-toxin cluster for insight about this observation.

**Rerefences:**

- Dumas E, Fourtey A, Rodriguez de la Vega R, Le Prieur S, Snirc A, **Coton M**, Thierry A, Coton E, Le Piver M, Roueyre, D, Ropars J, Branca A, Giraud T. (2020). Independent domestication events in the blue cheese fungus *Penicillium roqueforti*. Molecular Ecology doi: 10.1111/mec.15359.
- Gillot G, Jany J L, Poirier E, Maillard MB., Debaets S, Thierry A, Coton E, **Coton M** (2017). Functional diversity within the *Penicillium roqueforti* species. Int J Food Microbiol, 241, 141 150.
- Caron T, Le Piver M, Péron A-C, Lieben P, Lavigne R, Brunel S, Roueyre D, Place M, Bonnarme P, Giraud T, Branca A, Landaud S, Chassard C (2021) Strong effect of Penicillium roqueforti populations on volatile and metabolic compounds responsible for aromas, flavor and texture in blue cheeses. Int J Food Microbiol. 354, 109174

**Financial support:**

Projet PRC FUNGADAPT
ANR-19-CE20-0002-01

# Références bibliographiques

## A

Ahmad, H.I., Ahmad, M.J., Jabbir, F., Ahmar, S., Ahmad, N., Elokil, A.A. & Chen, J. (2020) The domestication makeup: evolution, survival, and challenges. *Frontiers in Ecology and Evolution*, **8**.

Albertin, W., Chasseriaud, L., Comte, G., Panfili, A., Delcamp, A., Salin, F., Marullo, P. & Bely, M. (2014) Winemaking and bioprocesses strongly shaped the genetic diversity of the ubiquitous yeast *Torulaspora delbrueckii*. *PLOS ONE*, **9**, e94246.

Alonso, V.A., Pereyra, C.M., Keller, L. a. M., Dalcero, A.M., Rosa, C. a. R., Chiacchiera, S.M. & Cavaglieri, L.R. (2013) Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *Journal of Applied Microbiology*, **115**, 637–643.

Alves, Z., Melo, A., Figueiredo, A.R., Coimbra, M.A., Gomes, A.C. & Rocha, S.M. (2015) Exploring the *Saccharomyces cerevisiae* volatile metabolome: indigenous versus commercial strains. *PLoS ONE*, **10**, e0143641.

Andersson, J.O. (2009) Gene transfer and diversification of microbial eukaryotes. *Annual Review of Microbiology*, 177–193.

Andersen, M.R., Nielsen, J.B., Klitgaard, A., Petersen, L.M., Zachariasen, M., Hansen, T.J., Blicher, L.H., Gotfredsen, C.H., Larsen, T.O., Nielsen, K.F. & Mortensen, U.H. (2013) Accurate prediction of secondary metabolite gene clusters in filamentous fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, E99–E107.

Auerbach, H., Oldenburg, E. & Weissbach, F. (1998) Incidence of *Penicillium roqueforti* and roquefortine C in silages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **76**, 565–572.

Avilés-Robles, M., Gómez-Ponce, C., Reséndiz-Sánchez, J., Rodríguez-Tovar, A.V., Ceballos-Bocanegra, A. & Martínez-Rivera, Á. (2016) Disseminated penicilliosis due to *Penicillium chrysogenum* in a pediatric patient with Henoch–Schönlein syndrome. *International Journal of Infectious Diseases*, **51**, 78–80.

Avramova, M., Cibrario, A., Peltier, E., Coton, M., Coton, E., Schacherer, J., Spano, G., Capozzi, V., Blaiotta, G., Salin, F., Dols-Lafargue, M., Grbin, P., Curtin, C., Albertin, W. & Masneuf-Pomarede, I. (2018) *Brettanomyces bruxellensis* population survey reveals a diploid-triploid complex structured according to substrate of isolation and geographical distribution. *Scientific Reports*, **8**, 4136.

## B

Bai, F.-Y., Han, D.-Y., Duan, S.-F. & Wang, Q.-M. (2022) The ecology and evolution of the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes*, **13**, 230.

Bartle, L., Peltier, E., Sundstrom, J.F., Sumby, K., Mitchell, J.G., Jiranek, V. & Marullo, P. (2021) QTL mapping: an innovative method for investigating the genetic determinism of yeast-bacteria interactions in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **105**, 5053–5066.

Balloux, F., Lehmann, L. & Meeûs, T. de. (2003) The population genetics of clonal and partially clonal diploids. *Genetics*, **164**, 1635–1644.

Bánki, O., Roskov, Y., Döring, M., Ower, G., Hernández Robles, D. R., Plata Corredor, C. A., Stjernegaard Jeppesen, T., Örn, A., Vandepitte, L., Hobern, D., Schalk, P., DeWalt, R. E., Ma, K., Miller, J., Orrell, T., Aalbu, R., Abbott, J., Adlard, R., Adriaenssens, E. M., et al. (2023). *Catalogue of Life Checklist* (Version 2023-10-16). Catalogue of Life. https://doi.org/10.48580/df7lv

Bayry, J., Beaussart, A., Dufrêne, Y.F., Sharma, M., Bansal, K., Kniemeyer, O., Aimanianda, V., Brakhage, A.A., Kaveri, S.V., Kwon-Chung, K.J., Latgé, J.-P. & Beauvais, A. (2014) Surface structure characterization of *Aspergillus fumigatus* conidia mutated in the melanin synthesis pathway and their human cellular immune response. *Infection and Immunity*, **82**, 3141.

Bazzicalupo, A. (2022) Local adaptation in fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, **46**, 1–11.

Belloch, C., Querol, A. & Barrio, E. (2011) Yeasts and molds | *Kluyveromyces* spp. In *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)* (ed. by Fuquay, J.W.). Academic Press, San Diego, pp. 754–764.

Bennetot, B., Vernadet, J.-P., Perkins, V., Hautefeuille, S., Rodríguez de la Vega, R.C., O'Donnell, S., Snirc, A., Grondin, C., Lessard, M.-H., Peron, A.-C., Labrie, S., Landaud, S., Giraud, T. & Ropars, J. (2023) Domestication of different varieties in the cheese-making fungus *Geotrichum candidum*. *Peer Community Journal*, **3**.

Bevilacqua, A.E. & Califano, A.N. (1989) Determination of organic acids in dairy products by high performance liquid chromatography. *Journal of Food Science*, **54**, 1076–1076.

Biedermann, P.H.W. & Vega, F.E. (2020) Ecology and evolution of insect–fungus mutualisms. *Annuals Review of Entomology*, **65**, 431–455.

Bigey, F., Segond, D., Friedrich, A., Guezenec, S., Bourgais, A., Huyghe, L., Agier, N., Nidelet, T. & Sicard, D. (2021) Evidence for two main domestication trajectories in *Saccharomyces cerevisiae* linked to distinct bread-making processes. *Current biology: CB*, **31**, 722-732.e5.

Blin, K., Kim, H.U., Medema, M.H. & Weber, T. (2019) Recent development of antiSMASH and other computational approaches to mine secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Briefings in Bioinformatics*, **20**, 1103–1113.

Roncal, T. & Ugalde, U. (2003) Conidiation induction in *Penicillium*. *Research in Microbiology*, **154**, 539–546.

Burki, F., Roger, A.J., Brown, M.W. & Simpson, A.G.B. (2020) The New Tree of Eukaryotes. *Trends in Ecology & Evolution*, **35**, 43–55.

Boysen M, Skouboe P, Frisvad J, Rossen L. Reclassification of the *Penicillium roqueforti* group into three species on the basis of molecular genetic and biochemical profiles. Microbiology (Reading). 1996 Mar;142 ( Pt 3):541-549. doi: 10.1099/13500872-142-3-541.

## C

Caccioni, D.R., Guizzardi, M., Biondi, D.M., Renda, A. & Ruberto, G. (1998) Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on Penicillium digitatum and penicillium italicum. *International Journal of Food Microbiology*, **43**, 73–79.

Cao, C., Xi, L. & Chaturvedi, V. (2019) Talaromycosis (Penicilliosis) Due to *Talaromyces* (*Penicillium*) *marneffei*: insights into the clinical trends of a major fungal disease 60 years after the discovery of the pathogen. Mycopathologia, **184**, 709–720.

Cantor, M.D., Tempel, T. van den, Hansen, T.K. & Ardö, Y. (2004) Blue cheese. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Major Cheese Groups (ed. by Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M. & Guinee, T.P.). Academic Press, pp. 175–198.

Caron, T., Piver, M.L., Péron, A.-C., Lieben, P., Lavigne, R., Brunel, S., Roueyre, D., Place, M., Bonnarme, P., Giraud, T., Branca, A., Landaud, S. & Chassard, C. (2021) Strong effect of *Penicillium roqueforti* populations on volatile and metabolic compounds responsible for aromas, flavor and texture in blue cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, **354**, 109174.

Cerning, J., Gripon, J.C., Lamberet, G. & Lenoir, J. (1987) Les activités biochimiques des *Penicillium* utilisés en fromagerie. *LeLait*, **67**, 3–39.

Chang, S.C., Lu, K.L. & Yeh, S.F. (1993) Secondary metabolites resulting from degradation of PR toxin by Penicillium roqueforti. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 981–986.

Chang, S.-C., Cheng, M.-K. & Wei, Y.-H. (2004) Isolation, Purification, and Characterization of the PR-amide Synthetase from Penicillium roqueforti. *Fungal Science*, **19**, 117–123.

Chang, S.-C., Cheng, M.-K. & Wei, Y.-H. (2004) Production of PR-imine, PR-acid, and PR-amide relative to the metabolism of PR toxin by *Penicillium roqueforti*. *Fungal Science*, **19**, 39–46.

Chang, P.-K. & Hua, S.S.T. (2023) Are current *Aspergillus sojae* strains originated from a native aflatoxigenic *Aspergillus* species population also present in California? *Mycobiology*, **51**, 139–147.

Chávez, R., Vaca, I. & García-Estrada, C. (2023) Secondary Metabolites Produced by the Blue-Cheese Ripening Mold Penicillium roqueforti; Biosynthesis and Regulation Mechanisms. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, **9**, 459.

Cheeseman, K., Ropars, J., Renault, P., Dupont, J., Gouzy, J., Branca, A., Abraham, A.-L., Ceppi, M., Conseiller, E., Debuchy, R., Malagnac, F., Goarin, A., Silar, P., Lacoste, S., Sallet, E.,

Bensimon, A., Giraud, T. & Brygoo, Y. (2014) Multiple recent horizontal transfers of a large genomic region in cheese making fungi. *Nature Communications*, **5**, 2876.

Christians, J.K., Cheema, M.S., Vergara, I.A., Watt, C.A., Pinto, L.J., Chen, N. & Moore, M.M. (2011) Quantitative trait locus (QTL) mapping reveals a role for unstudied genes in *Aspergillus virulence*. *PloS One*, **6**, e19325.

Clauw, P., Kerdaffrec, E., Gunis, J., Reichardt-Gomez, I., Nizhynska, V., Koemeda, S., Jez, J. & Nordborg, M. (2022) Locally adaptive temperature response of vegetative growth in *Arabidopsis thaliana*. *eLife*, **11**, e77913.

Cleere, M. (2017) Pigment biosynthesis genes in the blue cheese fungus *Penicillium roqueforti* (Thesis (University of Nottingham only)).

Cleere, M.M., Novodvorska, M., Geib, E., Whittaker, J., Dalton, H., Salih, N., Hewitt, S., Kokolski, M., Brock, M. & Dyer, P.S. (2024) New colours for old in the blue-cheese fungus *Penicillium roqueforti*. *npj Science of Food*, **8**, 3.

Crequer, E., Ropars, J., Jany, J.-L., Caron, T., Coton, M., Snirc, A., Vernadet, J.-P., Branca, A., Giraud, T. & Coton, E. (2023) A new cheese population in *Penicillium roqueforti* and adaptation of the five populations to their ecological niche. *Evolutionary Applications*, **16**, 1438–1457.

Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H. & Wilkinson, M.G. (2003) Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*, **13**, 841–866.

Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H. & Wilkinson, M.G. (2004) Lipolysis and catabolism of fatty acids in cheese. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier, pp. 373–389.

Coton, E., Coton, M., Hymery, N., Mounier, J. & Jany, J.-L. (2020) *Penicillium roqueforti*: an overview of its genetics, physiology, metabolism and biotechnological applications. *Fungal Biology Reviews*, **34**, 59–73.

## D

Darwin, C.R. (1859) On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. *London : John Murray*.

Darwin, C.R. (1868) The variation of animals and plants under domestication. *London: John Murray*.

De Guidi, I., Legras, J.-L., Galeote, V. & Sicard, D. (2023) Yeast domestication in fermented food and beverages: past research and new avenues. *Current Opinion in Food Science*, **51**, 101032.

De Vos, L., Nest, M.A. van der, Merwe, N.A. van der, Myburg, A.A., Wingfield, M.J. & Wingfield, B.D. (2011) Genetic analysis of growth, morphology and pathogenicity in the F(1) progeny of an interspecific cross between Fusarium circinatum and Fusarium subglutinans. *Fungal Biology*, **115**, 902–908.

Del-Cid, A., Gil-Durán, C., Vaca, I., Rojas-Aedo, J.F., García-Rico, R.O., Levicán, G. & Chávez, R. (2016) Identification and functional analysis of the mycophenolic acid gene cluster of *Penicillium roqueforti*. *PLOS ONE*, **11**, e0147047.

Diezhandino, I., Fernández, D., González, L., McSweeney, P.L.H. & Fresno, J.M. (2015) Microbiological, physico-chemical and proteolytic changes in a Spanish blue cheese during ripening (Valdeón cheese). *Food Chemistry*, **168**, 134–141.

Doebley, J.F., Gaut, B.S. & Smith, B.D. (2006) The molecular genetics of crop domestication. *Cell*, **127**, 1309–1321.

Douglas, G.L. & Klaenhammer, T.R. (2010) Genomic evolution of domesticated microorganisms. *Annual Review of Food Science and Technology*, **1**, 397–414.

Driscoll, C.A., Macdonald, D.W. & O'Brien, S.J. (2009) From wild animals to domestic pets, an evolutionary view of domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 9971–9978.

Duan, S.-F., Han, P.-J., Wang, Q.-M., Liu, W.-Q., Shi, J.-Y., Li, K., Zhang, X.-L. & Bai, F.-Y. (2018) The origin and adaptive evolution of domesticated populations of yeast from far east Asia. *Nature Communications*, **9**, 2690.

Dumas, E., Feurtey, A., Rodríguez de la Vega, R.C., Le Prieur, S., Snirc, A., Coton, M., Thierry, A., Coton, E., Le Piver, M., Roueyre, D., Ropars, J., Branca, A. & Giraud, T. (2020) Independent domestication events in the blue‐cheese fungus *Penicillium roqueforti*. *Molecular Ecology*, **29**, 2639–2660.

## E

Ellison, C.E., Hall, C., Kowbel, D., Welch, J., Brem, R.B., Glass, N.L. & Taylor, J.W. (2011) Population genomics and local adaptation in wild isolates of a model microbial eukaryote. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 2831.

Engel, G. & Teuber, M. (1978) Simple aid for the identification of *Penicillium roqueforti* Thom. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, **6**, 107–111.

## F

Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J.K. (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, **164**, 1567–1587.

Fay, J.C. & Benavides, J.A. (2005) Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genetics*, **1**.

Fernández-Bodega, Á., Álvarez-Álvarez, R., Liras, P. & Martín, J.F. (2017) Silencing of a second dimethylallyltryptophan synthase of *Penicillium roqueforti* reveals a novel clavine alkaloid gene cluster. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **101**, 6111–6121.

Fontaine, K., Hymery, N., Lacroix, M.Z., Puel, S., Puel, O., Rigalma, K., Gaydou, V., Coton, E. & Mounier, J. (2015) Influence of intraspecific variability and abiotic factors on mycotoxin production in *Penicillium roqueforti*. *International Journal of Food Microbiology*, 7.

Fontaine, K., Passeró, E., Vallone, L., Hymery, N., Coton, M., Jany, J.-L., Mounier, J. & Coton, E. (2015) Occurrence of roquefortine C, mycophenolic acid and aflatoxin M1 mycotoxins in blue-veined cheeses. *Food Control*, **47**, 634–640.

Foulongne-Oriol, M., Rodier, A., Rousseau, T. & Savoie, J.-M. (2012b) Quantitative trait locus mapping of yield-related components and oligogenic control of the cap color of the button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**, 2422–2434.

Foulongne-Oriol, M. (2012a) Genetic linkage mapping in fungi: current state, applications, and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **95**, 891–904.

Foulongne-Oriol, M., Navarro, P., Spataro, C., Ferrer, N. & Savoie, J.-M. (2014) Deciphering the ability of *Agaricus bisporus* var. burnettii to produce mushrooms at high temperature (25 °C). *Fungal genetics and biology: FG & B*, **73**, 1–11.

Foulongne-Oriol, M., Rocha de Brito, M., Cabannes, D., Clément, A., Spataro, C., Moinard, M., Dias, E.S., Callac, P. & Savoie, J.-M. (2016) The genetic linkage map of the medicinal mushroom *Agaricus subrufescens* reveals highly conserved macrosynteny with the congeneric species *Agaricus bisporus*. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, **6**, 1217–1226.

Frisvad, J.C. & Filtenborg, O. (1983) Classification of terverticillate penicillia based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*, **46**, 1301–1310.

Frisvad, J.C. & Samson, R.A. (2004) Polyphasic taxonomy of Penicillium subgenus Penicillium A guide to identification of food and air-borne terverticillate Penicillia and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, **49**, 1–174.

Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Larsen, T.O. & Samson, R.A. (2004) Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, **49**, 201–241.

Frisvad, J.C., Hubka, V., Ezekiel, C.N., Hong, S.-B., Nováková, A., Chen, A.J., Arzanlou, M., Larsen, T.O., Sklenář, F., Mahakarnchanakul, W., Samson, R.A. & Houbraken, J. (2019) Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in Mycology*, **93**, 1–63.

## G

Galindo, L.J., López-García, P., Torruella, G., Karpov, S. & Moreira, D. (2021) Phylogenomics of a new fungal phylum reveals multiple waves of reductive evolution across *Holomycota*. *Nature Communications*, **12**, 4973.

Gallone, B., Steensels, J., Prahl, T., Soriaga, L., Saels, V., Herrera-Malaver, B., Merlevede, A., Roncoroni, M., Voordeckers, K., Miraglia, L., Teiling, C., Steffy, B., Taylor, M., Schwartz, A., Richardson, T., White, C., Baele, G., Maere, S. & Verstrepen, K.J. (2016) Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts. *Cell*, **166**, 1397-1410.e16.

Gallone, B., Mertens, S., Gordon, J.L., Maere, S., Verstrepen, K.J. & Steensels, J. (2018) Origins, evolution, domestication and diversity of *Saccharomyces* beer yeasts. *Current Opinion in Biotechnology*, Food biotechnology • Plant biotechnology, **49**, 148–155.

Gallone, B., Steensels, J., Mertens, S., Dzialo, M.C., Gordon, J.L., Wauters, R., Theßeling, F.A., Bellinazzo, F., Saels, V., Herrera-Malaver, B., Prahl, T., White, C., Hutzler, M., Meußdoerffer, F., Malcorps, P., Souffriau, B., Daenen, L., Baele, G., Maere, S. & Verstrepen, K.J. (2019) Interspecific hybridization facilitates niche adaptation in beer yeast. *Nature Ecology & Evolution*, **3**, 1562–1575.

García-Estrada, C. & Martín, J.-F. (2016) Biosynthetic gene clusters for relevant secondary metabolites produced by *Penicillium roqueforti* in blue cheeses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **100**, 8303–8313.

Ge, H.M., Yu, Z.G., Zhang, J., Wu, J.H. & Tan, R.X. (2009) Bioactive alkaloids from endophytic *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Natural Products*, **72**, 753–755.

Gerhards, N. & Li, S.-M. (2017) A bifunctional old yellow enzyme from *Penicillium roqueforti* is involved in ergot alkaloid biosynthesis. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **15**, 8059–8071.

Gibbons, J.G., Salichos, L., Slot, J.C., Rinker, D.C., McGary, K.L., King, J.G., Klich, M.A., Tabb, D.L., McDonald, W.H. & Rokas, A. (2012) The evolutionary imprint of domestication on genome variation and function of the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Current Biology*, **22**, 1403–1409.

Gibbons, J.G. & Rinker, D.C. (2015) The genomics of microbial domestication in the fermented food environment. *Current opinion in genetics & development*, **35**, 1–8.

Gillot, G., Jany, J.-L., Coton, M., Le Floch, G., Debaets, S., Ropars, J., López-Villavicencio, M., Dupont, J., Branca, A., Giraud, T. & Coton, E. (2015) Insights into *Penicillium roqueforti* morphological and genetic diversity. *PLOS ONE*, **10**, e0129849.

Gillot, G., Jany, J.-L., Dominguez-Santos, R., Poirier, E., Debaets, S., Hidalgo, P.I., Ullán, R.V., Coton, E. & Coton, M. (2017a) Genetic basis for mycophenolic acid production and strain-dependent production variability in *Penicillium roqueforti*. *Food Microbiology*, **62**, 239–250.

Gillot, G., Jany, J.-L., Poirier, E., Maillard, M.-B., Debaets, S., Thierry, A., Coton, E. & Coton, M. (2017b) Functional diversity within the *Penicillium roqueforti* species. *International Journal of Food Microbiology*, **241**, 141–150.

Gladieux, P., Ropars, J., Badouin, H., Branca, A., Aguileta, G., Vienne, D.M. de, Rodríguez de la Vega, R.C., Branco, S. & Giraud, T. (2014) Fungal evolutionary genomics provides insight into the mechanisms of adaptive divergence in eukaryotes. *Molecular Ecology*, **23**, 753–773.

Gluck-Thaler, E., Ralston, T., Konkel, Z., Ocampos, C.G., Ganeshan, V.D., Dorrance, A.E., Niblack, T.L., Wood, C.W., Slot, J.C., Lopez-Nicora, H.D. & Vogan, A.A. (2022) Giant *starship* elements mobilize accessory genes in fungal genomes. *Molecular Biology and Evolution*, **39**, msac109.

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. & Oliver, S.G. (1996) Life with 6000 genes. *Science (New York, N.Y.)*, **274**, 546, 563–567.

Gonçalves, P. & Gonçalves, C. (2022) Horizontal gene transfer in yeasts. *Current Opinion in Genetics & Development*, **76**, 101950.

Gock, M.A., Hocking, A.D., Pitt, J.I. & Poulos, P.G. (2003) Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. *International Journal of Food Microbiology*, **81**, 11–19.

Gregory, T.R. (2009) Understanding natural selection: essential concepts and common misconceptions. *Evolution: Education and Outreach*, **2**, 156–175.

Guevara-Suarez M, García D, Cano-Lira JF, Guarro J, Gené J. Species diversity in *Penicillium* and *Talaromyces* from herbivore dung, and the proposal of two new genera of penicillium-like fungi in Aspergillaceae. Fungal Syst Evol. 2020 Jun;5:39-75. doi: 10.3114/fuse.2020.05.03.

## H

Harrouard, J., Eberlein, C., Ballestra, P., Dols-Lafargue, M., Masneuf-Pomarede, I., Miot-Sertier, C., Schacherer, J. & Albertin, W. (2023) *Brettanomyces bruxellensis*: overview of the genetic and phenotypic diversity of an anthropized yeast. *Molecular Ecology*, **32**, 2374–2395.

Hautbergue T, Jamin El, Debrauwer L, Puel O, & Oswald Ip. (2018) From genomics to metabolomics, moving toward an integrated strategy for the discovery of fungal secondary metabolites. *Natural product reports*, **35**.

Hidalgo, P.I., Poirier, E., Ullán, R.V., Piqueras, J., Meslet-Cladière, L., Coton, E. & Coton, M. (2017) *Penicillium roqueforti* PR toxin gene cluster characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **101**, 2043–2056.

Hidalgo, P.I., Ullán, R.V., Albillos, S.M., Montero, O., Fernández-Bodega, M.Á., García-Estrada, C., Fernández-Aguado, M. & Martín, J.-F. (2014) Molecular characterization of the PR-toxin gene cluster in *Penicillium roqueforti* and *Penicillium chrysogenum*: Cross talk of secondary metabolite pathways. *Fungal Genetics and Biology*, **62**, 11–24.

Ho, P.-W., Piampongsant, S., Gallone, B., Del Cortona, A., Peeters, P.-J., Reijbroek, F., Verbaet, J., Herrera, B., Cortebeeck, J., Nolmans, R., Saels, V., Steensels, J., Jarosz, D.F. & Verstrepen, K.J. (2021) Massive QTL analysis identifies pleiotropic genetic determinants for stress resistance, aroma formation, and ethanol, glycerol and isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, **14**, 211.

Houbraken J, Frisvad JC, Samson RA. (2010) Sex in *Penicillium* series Roqueforti. *IMA Fungus*. 1(2):171-80. doi: 10.5598/imafungus.2010.01.02.10.

Houbraken, J., Kocsubé, S., Visagie, C.M., Yilmaz, N., Wang, X.-C., Meijer, M., Kraak, B., Hubka, V., Bensch, K., Samson, R.A. & Frisvad, J.C. (2020) Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in Mycology*, **95**, 5–169.

Hu, X.H., Wang, M.H., Tan, T., Li, J.R., Yang, H., Leach, L., Zhang, R.M. & Luo, Z.W. (2007) Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **175**, 1479–1487.

Hubisz, M.J., Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J.K. (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, **9**, 1322–1332.

Hymery, N., Vasseur, V., Coton, M., Mounier, J., Jany, J.-L., Barbier, G. & Coton, E. (2014) Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **13**, 437–456.

Hymery, N., Puel, O., Tadrist, S., Canlet, C., Le Scouarnec, H., Coton, E. & Coton, M. (2017) Effect of PR toxin on THP1 and Caco-2 cells: an *in vitro* study. *World Mycotoxin Journal*, **10**, 375–386.

## I

Izco, J.M., Tormo, M. & Jiménez-Flores, R. (2002) Rapid simultaneous determination of organic acids, free amino acids, and lactose in cheese by capillary electrophoresis. *Journal of Dairy Science*, **85**, 2122–2129.

## J

James, T.Y., Stajich, J.E., Hittinger, C.T. & Rokas, A. (2020) Toward a fully resolved fungal tree of life. *Annual Review of Microbiology*.

## K

Kawecki, T.J. & Ebert, D. (2004) Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters*, **7**, 1225–1241.

Keller, N.P. (2019) Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nature reviews. Microbiology*, **17**, 167–180.

Kendrick, B. (2017) *The Fifth Kingdom*. Hackett Publishing.

Kosalková, K., García-Estrada, C., Ullán, R.V., Godio, R.P., Feltrer, R., Teijeira, F., Mauriz, E. & Martín, J.F. (2009) The global regulator LaeA controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine C synthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Biochimie*, **91**, 214–225.

Kosalková, K., Domínguez-Santos, R., Coton, M., Coton, E., García-Estrada, C., Liras, P. & Martín, J.F. (2015) A natural short pathway synthesizes roquefortine C but not meleagrin in three different *Penicillium roqueforti* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **99**, 7601–7612.

Kung, L., Shaver, R.D., Grant, R.J. & Schmidt, R.J. (2018) Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *Journal of Dairy Science*, **101**, 4020–4033.

Kurtzman, C.P., Smiley, M.J., Robnett, C.J. & Wicklow, D.T. (1986) DNA relatedness among wild and domesticated species in the *Aspergillus flavus* group. *Mycologia*, **78**, 955–959.

## L

Lamarck, J.B. (1809*)* Philosophie zoologique*, Dentu*, 1809

Lamberet, G. & Menassa, A. (1983) Purification and properties of an acid lipase from *Penicillium roqueforti*. *Journal of Dairy Research*, **50**, 459–468.

Larraya, L.M., Idareta, E., Arana, D., Ritter, E., Pisabarro, A.G. & Ramírez, L. (2002) Quantitative trait loci controlling vegetative growth rate in the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 1109–1114.

Larraya, L.M., Alfonso, M., Pisabarro, A.G. & Ramírez, L. (2003) Mapping of genomic regions (Quantitative Trait Loci) controlling production and quality in industrial cultures of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 3617–3625.

Larson, G. & Burger, J. (2013) A population genetics view of animal domestication. *Trends in Genetics*, **29**, 197–205.

Larson, G., Piperno, D.R., Allaby, R.G., Purugganan, M.D., Andersson, L., Arroyo-Kalin, M., Barton, L., Climer Vigueira, C., Denham, T., Dobney, K., Doust, A.N., Gepts, P., Gilbert, M.T.P., Gremillion, K.J., Lucas, L., Lukens, L., Marshall, F.B., Olsen, K.M., Pires, J.C., Richerson, P.J., Rubio de Casas, R., Sanjur, O.I., Thomas, M.G. & Fuller, D.Q. (2014) Current perspectives and the future of domestication studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**, 6139–6146.

Lebreton, A., Corre, E., Jany, J.-L., Brillet-Guéguen, L., Pèrez-Arques, C., Garre, V., Monsoor, M., Debuchy, R., Le Meur, C., Coton, E., Barbier, G. & Meslet-Cladière, L. (2020) Comparative genomics applied to *Mucor species* with different lifestyles. *BMC genomics*, **21**, 135.

Lecocq, T. (2018) Insects: the disregarded domestication histories. In *Animal Domestication*. IntechOpen.

Legras, J.-L., Galeote, V., Bigey, F., Camarasa, C., Marsit, S., Nidelet, T., Sanchez, I., Couloux, A., Guy, J., Franco-Duarte, R., Marcet-Houben, M., Gabaldon, T., Schuller, D., Sampaio, J.P. & Dequin, S. (2018) Adaptation of *S. cerevisiae* to fermented food environments reveals remarkable genome plasticity and the footprints of domestication. *Molecular Biology and Evolution*, **35**, 1712–1727.

Leitão, A.L. (2009) Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **6**, 1393–1417.

Lendenmann, M.H., Croll, D., Stewart, E.L. & McDonald, B.A. (2014) Quantitative trait locus mapping of melanization in the plant pathogenic fungus *Zymoseptoria tritici*. *G3 (Bethesda, Md.)*, **4**, 2519–2533.

Li, Y., Steenwyk, J.L., Chang, Y., Wang, Y., James, T.Y., Stajich, J.E., Spatafora, J.W., Groenewald, M., Dunn, C.W., Hittinger, C.T., Shen, X.-X. & Rokas, A. (2021) A genome-scale phylogeny of the kingdom *Fungi*. *Current Biology*, **31**, 1653-1665.e5.

Lin, X., Huang, J.C., Mitchell, T.G. & Heitman, J. (2006) Virulence attributes and hyphal growth of *C. neoformans* are quantitative traits and the MATalpha allele enhances filamentation. *PLoS genetics*, **2**, e187.

Lo, Y.-C., Bruxaux, J., Rodríguez de la Vega, R.C., O'Donnell, S., Snirc, A., Coton, M., Le Piver, M., Le Prieur, S., Roueyre, D., Dupont, J., Houbraken, J., Debuchy, R., Ropars, J., Giraud, T. & Branca, A. (2023) Domestication in dry-cured meat *Penicillium* fungi: Convergent specific phenotypes and horizontal gene transfers without strong genetic subdivision. *Evolutionary Applications*, **00**, 1–24.

López-Díaz, T.M., Santos, J., Otero, A., García, M.L. & Moreno, B. (1996) Some technological properties of *Penicillium roqueforti* strains isolated from a home-made blue cheese. *Letters in Applied Microbiology*, **23**, 5–8.

López-García, P. & Moreira, D. (2023) The symbiotic origin of the eukaryotic cell. *Comptes Rendus. Biologies*, **346**, 55–73.

Lu, J., Tang, T., Tang, H., Huang, J., Shi, S. & Wu, C.-I. (2006) The accumulation of deleterious mutations in rice genomes: a hypothesis on the cost of domestication. *Trends in Genetics*, **22**, 126–131.

Liu, L., Wang, J., Rosenberg, D., Zhao, H., Lengyel, G. & Nadel, D. (2018) Fermented beverage and food storage in 13,000 y-old stone mortars at Raqefet Cave, Israel: Investigating Natufian ritual feasting. *Journal of Archaeological Science: Reports*, **21**, 783–793.

Lübbehüsen, T.L., Nielsen, J. & McIntyre, M. (2003) Morphology and physiology of the dimorphic fungus *Mucor circinelloides* (syn. *M. racemosus*) during anaerobic growth. *Mycological Research*, **107**, 223–230.

## M

Maixner, F., Sarhan, M.S., Huang, K.D., Tett, A., Schoenafinger, A., Zingale, S., Blanco-Míguez, A., Manghi, P., Cemper-Kiesslich, J., Rosendahl, W., Kusebauch, U., Morrone, S.R., Hoopmann, M.R., Rota-Stabelli, O., Rattei, T., Moritz, R.L., Oeggl, K., Segata, N., Zink, A., Reschreiter, H. & Kowarik, K. (2021) Hallstatt miners consumed blue cheese and beer during the iron age and retained a non-westernized gut microbiome until the Baroque period. *Current Biology*, **31**, 5149-5162.e6.

Mansfield, M.A., Jones, A.D. & Kuldau, G.A. (2008) Contamination of fresh and ensiled maize by multiple *Penicillium* mycotoxins. *Phytopathology*, **98**, 330–336.

Marcet-Houben, M., Ballester, A.-R., González-Candelas, L. & Gabaldón, T. (2012) Genome sequence of the necrotrophic fungus *Penicillium digitatum*, the main postharvest pathogen of citrus.

Martín, J.F. & Coton, M. (2017) Chapter 12 - Blue Cheese: Microbiota and Fungal Metabolites. In *Fermented Foods in Health and Disease Prevention* (ed. by Frias, J., Martinez-Villaluenga, C. & Peñas, E.). Academic Press, Boston, pp. 275–303.

Martin, J.F., Álvarez-Álvarez, R. & Liras, P. (2017) Clavine alkaloids gene clusters of *Penicillium* and related Fungi: evolutionary combination of prenyltransferases, monooxygenases and dioxygenases. *Genes*, **8**, 342.

Matsuda, Y., Awakawa, T. & Abe, I. (2013) Reconstituted biosynthesis of fungal meroterpenoid andrastin A. *Tetrahedron*, **69**, 8199–8204.

Matsuda, Y. & Abe, I. (2016) Biosynthesis of fungal meroterpenoids. *Natural Product Reports*, **33**, 26–53.

Mase, T., Matsumiya, Y. & Matsuura, A. (1995) Purification and characterization of *Penicillium roqueforti* IAM 7268 lipase. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, **59**, 329–330.

McIntyre, M., Breum, J., Arnau, J. & Nielsen, J. (2002) Growth physiology and dimorphism of *Mucor circinelloides* (syn. *racemosus*) during submerged batch cultivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **58**, 495–502.

McSweeney, P.L.H. & Fox, P.F. (2004) Metabolism of Residual Lactose and of Lactate and Citrate. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier, pp. 361–371.

McSweeney, P.L.H. (Ed.). (2007) Blue cheese. In *Cheese Problems Solved*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing, pp. 284–288.

Menassa, A. & Lamberet, G. (1982) Contribution à l'étude du système lipolytique de *Penicillium roqueforti*. Caractères comparés de deux activités exocellulaires. *Le Lait*, **62**, 32–43.

Metin, B. (2023) *Penicillium roqueforti* secondary metabolites: biosynthetic pathways, gene clusters, and bioactivities. *Fermentation*, **9**, 836.

Meyer, R.S., DuVal, A.E. & Jensen, H.R. (2012) Patterns and processes in crop domestication: an historical review and quantitative analysis of 203 global food crops. *New Phytologist*, **196**, 29–48.

Milgroom, M.G. & Fry, W.E. (1997) Contributions of population genetics to plant disease epidemiology and management. In *Advances in Botanical Research*. Academic Press, pp. 1–30.

Mo, S., Huang, Z., Ye, Z., Yin, J., Zhang, S., Yao, J., Zhang, Y., Huang, Z., Zeng, H., Hu, Z., Wang, J. & Zhang, Y. (2023) Ten undescribed eremophilane and guaiane sesquiterpenes from *Penicillium roqueforti*. *Phytochemistry*, **212**, 113722.

Moreau, C. (1980) Le *Penicillium roqueforti*, morphologie, physiologie, intérêt en industrie fromagère, mycotoxines. *Le Lait*, **60**, 254–271.

Moyers, B.T., Morrell, P.L. & McKay, J.K. (2018) Genetic costs of domestication and improvement. *Journal of Heredity*, **109**, 103–116.

Monerawela, C. & Bond, U. (2018) The hybrid genomes of *Saccharomyces pastorianus*: A current perspective. *Yeast (Chichester, England)*, **35**, 39–50.

Moreau, C. (1980) Le *Penicillium roqueforti*, morphologie, physiologie, intérêt en industrie fromagère, mycotoxines. (Révision bibliographique). *Le Lait*, **60**, 254–271.

Mueller, U.G., Gerardo, N.M., Aanen, D.K., Six, D.L. & Schultz, T.R. (2005) The evolution of agricultures in insects. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **36**, 563–595.

Mueller, U.G. & Gerardo, N. (2002) Fungus-farming insects: multiple origins and diverse evolutionary histories. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, 15247–15249.

## N

Naranjo-Ortiz, M.A. & Gabaldón, T. (2019) Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*, **94**, 2101–2137.

Nguyen Van Long, N. & Dantigny, P. (2016) Chapter 4 - Fungal Contamination in Packaged Foods. In *Antimicrobial Food Packaging* (ed. by Barros-Velázquez, J.). Academic Press, San Diego, pp. 45–63.

Nguyen Van Long, N., Vasseur, V., Couvert, O., Coroller, L., Burlot, M., Rigalma, K. & Mounier, J. (2017) Modeling the effect of modified atmospheres on conidial germination of *Fungi* from dairy foods. *Frontiers in Microbiology*, **8**.

Nguyen Van Long, N., Rigalma, K., Jany, J.-L., Mounier, J. & Vasseur, V. (2021) Intraspecific variability in cardinal growth temperatures and water activities within a large diversity of *Penicillium roqueforti* strains. *Food Research International*, **148**, 110610.

Nielsen, K.F., Dalsgaard, P.W., Smedsgaard, J. & Larsen, T.O. (2005) Andrastins A-D, *Penicillium roqueforti* metabolites consistently produced in blue-mold-ripened cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 2908–2913.

Nielsen, K.F., Sumarah, M.W., Frisvad, J.C. & Miller, J.D. (2006) Production of metabolites from the *Penicillium roqueforti* complex. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 3756–3763.

Nielsen, J.C., Grijseels, S., Prigent, S., Ji, B., Dainat, J., Nielsen, K.F., Frisvad, J.C., Workman, M. & Nielsen, J. (2017) Global analysis of biosynthetic gene clusters reveals vast potential of secondary metabolite production in *Penicillium* species. *Nature Microbiology*, **2**, 1–9.

## O

O'Brien, M., Nielsen, K.F., O'Kiely, P., Forristal, P.D., Fuller, H.T. & Frisvad, J.C. (2006) Mycotoxins and other secondary metabolites produced in vitro by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 9268–9276.

O'Brien, N.M., O'Connor, T.P., O'Callaghan, J. & Dobson, A.D.W. (2004) Toxins in Cheese. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier, pp. 561–571.

Ohmomo, S., Sato, T., Utagawa, T. & Abe, M. (1975) Isolation of festuclavine and three new indole alkaloids, roquefortine A, B and C from the cultures of *Penicillium roqueforti*. *Agricultural and Biological Chemistry*, **39**, 1333–1334.

Olson, A. (2006) Genetic linkage between growth rate and the intersterility genes S and P in the basidiomycete *Heterobasidion annosum* s.lat. *Mycological Research*, **110**, 979–984.

Omura, S., Inokoshi, J., Uchida, R., Shiomi, K., Masuma, R., Kawakubo, T., Tanaka, H., Iwai, Y., Kosemura, S. & Yamamura, S. (1996) Andrastins A-C, new protein farnesyltransferase inhibitors produced by *Penicillium* sp. FO-3929. I. Producing strain, fermentation, isolation, and biological activities. *The Journal of Antibiotics*, **49**, 414–417.

## P

Peltier, E., Sharma, V., Martí Raga, M., Roncoroni, M., Bernard, M., Jiranek, V., Gibon, Y. & Marullo, P. (2018) Dissection of the molecular bases of genotype x environment interactions: a study of phenotypic plasticity of *Saccharomyces cerevisiae* in grape juices. *BMC genomics*, **19**, 772.

Peltier, E., Bibi-Triki, S., Dutreux, F., Caradec, C., Friedrich, A., Llorente, B. & Schacherer, J. (2021) Dissection of quantitative trait loci in the *Lachancea waltii* yeast species highlights major hotspots. *G3 (Bethesda, Md.)*, **11**, jkab242.

Perri, A.R., Feuerborn, T.R., Frantz, L.A.F., Larson, G., Malhi, R.S., Meltzer, D.J. & Witt, K.E. (2021) Dog domestication and the dual dispersal of people and dogs into the Americas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **118**, e2010083118.

Peter, J., De Chiara, M., Friedrich, A., Yue, J.-X., Pflieger, D., Bergström, A., Sigwalt, A., Barre, B., Freel, K., Llored, A., Cruaud, C., Labadie, K., Aury, J.-M., Istace, B., Lebrigand, K., Barbry, P., Engelen, S., Lemainque, A., Wincker, P., Liti, G. & Schacherer, J. (2018) Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Nature*, **556**, 339–344.

Pitt, J.I. & Hocking, A.D. (1997) *Fungi and Food Spoilage*. Springer US, Boston, MA.

Pontes, A., Hutzler, M., Brito, P.H. & Sampaio, J.P. (2020) Revisiting the taxonomic synonyms and populations of *Saccharomyces cerevisiae*-phylogeny, phenotypes, ecology and domestication. *Microorganisms*, **8**, 903.

Prieto, B., Franco, I., Fresno, M., Bernardo, A. & Carballo, J. (2000) Picon Bejes-Tresviso blue cheese: an overall biochemical survey throughout the ripening process. *International Dairy Journal*, 9.

Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945–959.

Pujato, S.A., Guglielmotti, D.M., Ackermann, H.-W., Patrignani, F., Lanciotti, R., Reinheimer, J.A. & Quiberoni, A. (2014) *Leuconostoc* bacteriophages from blue cheese manufacture: long-term survival, resistance to thermal treatments, high pressure homogenization and chemical biocides of industrial application. *International Journal of Food Microbiology*, **177**, 81–88.

Punt, M., Brule, T. van den, Teertstra, W.R., Dijksterhuis, J., Besten, H.M.W. den, Ohm, R.A. & Wösten, H.A.B. (2020) Impact of maturation and growth temperature on cell-size distribution, heat-resistance, compatible solute composition and transcription profiles of *Penicillium roqueforti* conidia. *Food Research International*, **136**, 109287.

Purugganan, M.D. (2022) What is domestication? *Trends in Ecology & Evolution*, **37**, 663–671.

## R

Ranere, A.J., Piperno, D.R., Holst, I., Dickau, R. & Iriarte, J. (2009) The cultural and chronological context of early Holocene maize and squash domestication in the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 5014–5018.

Regueira, T.B., Kildegaard, K.R., Hansen, B.G., Mortensen, U.H., Hertweck, C. & Nielsen, J. (2011) Molecular basis for mycophenolic acid biosynthesis in *Penicillium brevicompactum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**, 3035.

Richards, T.A. & Talbot, N.J. (2013) Horizontal gene transfer in osmotrophs: playing with public goods. *Nature Reviews Microbiology*, **11**, 720–727.

Richards, T.A. & Talbot, N.J. (2018) Osmotrophy. *Current Biology*, **28**, R1179–R1180.

Riclea, R. & Dickschat, J.S. (2015) Identification of intermediates in the biosynthesis of PR toxin by *Penicillium roqueforti*. *Angewandte Chemie International Edition*, **54**, 12167–12170.

Rogers, D.W. & Greig, D. (2009) Experimental evolution of a sexually selected display in yeast. *Proceedings. Biological Sciences*, **276**, 543–549.

Rojas-Aedo, J.F., Gil-Durán, C., Del-Cid, A., Valdés, N., Álamos, P., Vaca, I., García-Rico, R.O., Levicán, G., Tello, M. & Chávez, R. (2017) The biosynthetic gene cluster for andrastin A in *Penicillium roqueforti*. *Frontiers in Microbiology*, **8**, 813.

Rojas-Aedo, J.F., Gil-Durán, C., Goity, A., Vaca, I., Levicán, G., Larrondo, L.F. & Chávez, R. (2018) The developmental regulator Pcz1 affects the production of secondary metabolites in the filamentous fungus *Penicillium roqueforti*. *Microbiological Research*, **212–213**, 67–74.

Ropars, J., Cruaud, C., Lacoste, S. & Dupont, J. (2012) A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. *International Journal of Food Microbiology*, **155**, 199–210.

Ropars, J., Aguileta, G., Vienne, D.M. de & Giraud, T. (2014a) Massive gene swamping among cheese-making *Penicillium* fungi. *Microbial Cell*, **1**, 107–109.

Ropars, J., López‐Villavicencio, M., Dupont, J., Snirc, A., Gillot, G., Coton, M., Jany, J.-L., Coton, E. & Giraud, T. (2014b) Induction of sexual reproduction and genetic diversity in the cheese fungus *Penicillium roqueforti*. *Evolutionary Applications*, **7**, 433–441.

Ropars, J., Rodríguez de la Vega, R.C., López-Villavicencio, M., Gouzy, J., Sallet, E., Dumas, É., Lacoste, S., Debuchy, R., Dupont, J., Branca, A. & Giraud, T. (2015) Adaptive horizontal gene transfers between multiple cheese-associated fungi. *Current Biology*, **25**, 2562–2569.

Ropars, J., Lo, Y.-C., Dumas, E., Snirc, A., Begerow, D., Rollnik, T., Lacoste, S., Dupont, J., Giraud, T. & López-Villavicencio, M. (2016) Fertility depression among cheese-making *Penicillium roqueforti* strains suggests degeneration during domestication. *Evolution*, **70**, 2099–2109.

Ropars, J., López-Villavicencio, M., Snirc, A., Lacoste, S. & Giraud, T. (2017) Blue cheese-making has shaped the population genetic structure of the mould *Penicillium roqueforti*. *PLOS ONE*, **12**, e0171387.

Ropars, J., Caron, T., Lo, Y.-C., Bennetot, B. & Giraud, T. (2020a) La domestication des champignons *Penicillium* du fromage. *Comptes Rendus. Biologies*, **343**, 155–176.

Ropars, J., Didiot, E., Rodríguez de la Vega, R.C., Bennetot, B., Coton, M., Poirier, E., Coton, E., Snirc, A., Le Prieur, S. & Giraud, T. (2020b) Domestication of the emblematic white cheese-making fungus *Penicillium camemberti* and its diversification into two varieties. *Current Biology*, S0960982220312720.

Ropars, J. & Giraud, T. (2022) Convergence in domesticated fungi used for cheese and dry-cured meat maturation: beneficial traits, genomic mechanisms, and degeneration. *Current Opinion in Microbiology*, **70**, 102236.

## S

Samson, R.A., Seifert, K.A., Kuijpers, A.F.A., Houbraken, J.A.M.P., Frisvad, J.C. (2004) Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial β-tubulin sequences. Stud. Mycol. 49, 175–200.

Samson, R.A. and Frisvad, J.C. (2004) *Penicillium* Subgenus *Penicillium*: New taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. *Studies in Mycology*, **49**, 1-251.

Samson, R.A., Yilmaz, N., Houbraken, J., Spierenburg, H., Seifert, K.A., Peterson, S.W., Varga, J. & Frisvad, J.C. (2011) Phylogeny and nomenclature of the genus Talaromyces and taxa accommodated in Penicillium subgenus Biverticillium. *Studies in Mycology*, **70**, 159–183.

Seekles, S.J., Teunisse, P.P.P., Punt, M., Brule, T. van den, Dijksterhuis, J., Houbraken, J., Wösten, H.A.B. & Ram, A.F.J. (2021) Preservation stress resistance of melanin deficient conidia from *Paecilomyces variotii* and *Penicillium roqueforti* mutants generated via CRISPR/Cas9 genome editing. *Fungal Biology and Biotechnology*, **8**.

Siezen, R.J., Renckens, B., Swam, I. van, Peters, S., Kranenburg, R. van, Kleerebezem, M. & Vos, W.M. de. (2005) Complete sequences of four plasmids of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 reveal extensive adaptation to the dairy environment. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 8371–8382.

Silva, M., Pontes, A., Franco‐Duarte, R., Soares, P., Sampaio, J.P., Sousa, M.J. & Brito, P.H. (2022) A glimpse at an early stage of microbe domestication revealed in the variable genome of *Torulaspora delbrueckii* , an emergent industrial yeast. *Molecular Ecology*, mec.16428.

Skotte, L., Korneliussen, T. S., & Albrechtsen, A. (2013). Estimating individual admixture proportions from next generation sequencing data. Genetics, **195**(3), 693–702.

Smýkal, P., Nelson, M.N., Berger, J.D. & Von Wettberg, E.J.B. (2018) The impact of genetic changes during crop domestication. *Agronomy*, **8**, 119.

Sniegowski, P.D., Dombrowski, P.G. & Fingerman, E. (2002) *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. *FEMS yeast research*, **1**, 299–306.

Sreewongchai, T., Sriprakhon, S., Wongsaprom, C., Vanavichit, A., Toojinda, T., Tharreau, D. & Sirithunya, P. (2009) Genetic mapping of *Magnaporthe grisea* avirulence gene corresponding to leaf and panicle blast resistant QTLs in Jao Hom Nin rice cultivar. *Journal of Phytopathology*, **157**, 338–343.

Stapley, J. & McDonald, B.A. (2023) Quantitative trait locus mapping of osmotic stress response in the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, **13**, jkad226.

Steensels, J., Gallone, B., Voordeckers, K. & Verstrepen, K.J. (2019) Domestication of industrial microbes. *Current Biology*, **29**, R381–R393.

Steensels, J. & Verstrepen, K.J. (2014) Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Annual Review of Microbiology*, **68**, 61–80.

Steinmetz, L.M., Sinha, H., Richards, D.R., Spiegelman, J.I., Oefner, P.J., McCusker, J.H. & Davis, R.W. (2002) Dissecting the architecture of a quantitative trait locus in yeast. *Nature*, **416**, 326–330.

Stetter, M.G., Gates, D.J., Mei, W. & Ross-Ibarra, J. (2017) How to make a domesticate. *Current Biology*, **27**, 896–900.

Stewart, E.L., Croll, D., Lendenmann, M.H., Sanchez-Vallet, A., Hartmann, F.E., Palma-Guerrero, J., Ma, X. & McDonald, B.A. (2018) Quantitative trait locus mapping reveals complex genetic architecture of quantitative virulence in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Molecular Plant Pathology*, **19**, 201–216.

Stroe, M.C., Gao, J., Pitz, M. & Fischer, R. (2023) Complexity of fungal polyketide biosynthesis and function. *Molecular Microbiology*.

Sudbery, P.E. (2011) Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature Reviews Microbiology*, **9**, 737–748.

Sweeney, M. & McCouch, S. (2007) The complex history of the domestication of rice. *Annals of Botany*, **100**, 951–957.

Swinnen, S., Thevelein, J.M. & Nevoigt, E. (2012) Genetic mapping of quantitative phenotypic traits in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*, **12**, 215–227.

Swinnen, S., Schaerlaekens, K., Pais, T., Claesen, J., Hubmann, G., Yang, Y., Demeke, M., Foulquié-Moreno, M.R., Goovaerts, A., Souvereyns, K., Clement, L., Dumortier, F. & Thevelein, J.M. (2012) Identification of novel causative genes determining the complex trait of high ethanol tolerance in yeast using pooled-segregant whole-genome sequence analysis. *Genome Research*, **22**, 975–984.

## T

Tamang, J.P., Cotter, P.D., Endo, A., Han, N.S., Kort, R., Liu, S.Q., Mayo, B., Westerik, N. & Hutkins, R. (2020) Fermented foods in a global age: East meets West. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **19**, 184–217.

Taniwaki, M.H., Hocking, A.D., Pitt, J.I. & Fleet, G.H. (2001) Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, **68**, 125–133.

Terefe, N.S. (2016) Food Fermentation. In *Reference Module in Food Science*. Elsevier.

Thom, C. (1906) *Fungi* in cheese ripening: Camembert and Roquefort. *US Department of Agriculture* Bur.Anim. Ind. 82, 1–39.

## U

Uchida,R., Shiomi, K., Inokoshi, J., Sunazuka, T., Tanaka, H., Iwai, Y., Takayanagi, H., Omura, S. (1996a) Andrastins A-C, new protein farnesyltransferase inbibitors produced by *Penicillium* sp. FO-3929. II. Structure elucidation and biosynthesis. *J. Antibiot.* (Tokyo) 49, 418–424. doi:10.7164/antibiotics.49.418

Uchida, R., Shiomi, K., Inokoshi, J., Tanaka, H., Iwai, Y., Omura, S. (1996b). Andrastin D, novel protein farnesyltransferase inhibitor produced by *Penicillium* sp. FO-3929. J. Antibiot. (Tokyo) 49, 1278–1280. doi:10.7164/antibiotics.49.1278

Upadhyay, V.K., McSweeney, P.L.H., Magboul, A.A.A. & Fox, P.F. (2004) Proteolysis in Cheese during Ripening. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier, pp. 391–VIII.

Urquhart, A.S., Vogan, A.A., Gardiner, D.M. & Idnurm, A. (2023) *Starships* are active eukaryotic transposable elements mobilized by a new family of tyrosine recombinases, **120**.

## V

Vion, C., Peltier, E., Bernard, M., Muro, M. & Marullo, P. (2021) Marker assisted selection of malic-consuming *Saccharomyces cerevisiae* strains for winemaking. efficiency and limits of a QTL's driven breeding program. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, **7**, 304.

Visagie, C.M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Hong, S.-B., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Varga, J., Yaguchi, T. & Samson, R.A. (2014) Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, **78**, 343–371.

Vogan, A.A., Khankhet, J., Samarasinghe, H. & Xu, J. (2016) Identification of QTLs associated with virulence related traits and drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. *G3 (Bethesda, Md.)*, **6**, 2745–2759.

## W

Wang, J.-P., Shu, Y., Hu, J.-T., Liu, R., Cai, X.-Y., Sun, C.-T., Gan, D., Zhou, D.-J., Mei, R.-F., Ding, H., Zhang, X.-R., Cai, L. & Ding, Z.-T. (2020) Roquefornine A, a sesterterpenoid with a 5/6/5/5/6-fused ring system from the fungus *Penicillium roqueforti* YJ-14. *Organic Chemistry Frontiers*, **7**, 1463–1468.

Wang, J.-P., Yu, J., Shu, Y., Shi, Y.-X., Luo, P., Cai, L. & Ding, Z.-T. (2018) Peniroquesines A-C: Sesterterpenoids possessing a 5-6-5-6-5-Fused pentacyclic ring system from *Penicillium roqueforti* YJ-14. *Organic Letters*, **20**, 5853–5856.

Wang, F., Han, R. & Chen, S. (2023) An overlooked and underrated endemic mycosis-talaromycosis and the pathogenic fungus *Talaromyces marneffei*. *Clinical Microbiology Reviews*, **36**, e0005122.

Watarai, N., Yamamoto, N., Sawada, K. & Yamada, T. (2019) Evolution of *Aspergillus oryzae* before and after domestication inferred by large-scale comparative genomic analysis. *DNA Research*, **26**, 465–472.

Wei, R.D., Still, P.E., Smalley, E.B., Schnoes, H.K. & Strong, F.M. (1973) Isolation and partial characterization of a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*. *Applied Microbiology*, **25**, 111–114.

Weissing, F.J., Edelaar, P. & Doorn, G.S. van. (2011) Adaptive speciation theory: a conceptual review. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **65**, 461–480.

Wilkening, S., Lin, G., Fritsch, E.S., Tekkedil, M.M., Anders, S., Kuehn, R., Nguyen, M., Aiyar, R.S., Proctor, M., Sakhanenko, N.A., Galas, D.J., Gagneur, J., Deutschbauer, A. & Steinmetz, L.M. (2014) An evaluation of high-throughput approaches to QTL mapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **196**, 853–865.

Wilkins, A.S., Wrangham, R.W. & Fitch, W.T. (2014) The "domestication syndrome" in mammals: a unified explanation based on neural crest cell behavior and genetics. *Genetics*, **197**, 795–808.

Woese, C.R., Kandler, O. & Wheelis, M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**, 4576–4579.

Wyatt, T.T., Wösten, H.A.B. & Dijksterhuis, J. (2013) Chapter Two - Fungal spores for dispersion in space and time. In *Advances in Applied Microbiology* (ed. by Sariaslani, S. & Gadd, G.M.). Academic Press, pp. 43–91.

## X

Xiang, P., Kemmerich, B., Yang, L. & Li, S.-M. (2022) Biosynthesis of annullatin D in *Penicillium roqueforti* implies oxidative lactonization between two hydroxyl groups catalyzed by a BBE-like enzyme. *Organic Letters*, **24**, 6072–6077.

## Y

Yang, Y., Foulquié-Moreno, M.R., Clement, L., Erdei, E., Tanghe, A., Schaerlaekens, K., Dumortier, F. & Thevelein, J.M. (2013) QTL analysis of high thermotolerance with superior and downgraded parental yeast strains reveals new minor QTLs and converges on novel causative alleles involved in RNA processing. *PLoS genetics*, **9**, e1003693.

Ye, R., Biango-Daniels, M., Steenwyk, J.L., Rokas, A., Louw, N., Nardella, R. & Wolfe, B.E. (2024) Genomic, transcriptomic, and ecological diversity of Penicillium species in cheese rind microbiomes. *Fungal Genetics and Biology*, 103862.

## Z

Zaongo, S.D., Zhang, F. & Chen, Y. (2023) An overview of diagnostic and management strategies for Talaromycosis, an underrated disease. *Journal of Fungi*, **9**, 647.

Zhang, W., Cao, S., Qiu, L., Qi, F., Li, Z., Yang, Y., Huang, S., Bai, F., Liu, C., Wan, X. & Li, S. (2015) Functional characterization of MpaG', the O-methyltransferase involved in the biosynthesis of mycophenolic acid. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, **16**, 565–569.

Zhang, Y., Gao, W., Sonnenberg, A., Chen, Q., Zhang, J. & Huang, C. (2021) Genetic linkage and physical mapping for an oyster mushroom (*Pleurotus cornucopiae*) and quantitative trait locus analysis for cap color. *Applied and Environmental Microbiology*, **87**, e0095321.

Zohary, D., Tchernov, E. & Horwitz, L.K. (1998) The role of unconscious selection in the domestication of sheep and goats. *Journal of Zoology*, **245**, 129–135.

COLLEGE ECOLOGIE
DOCTORAL GEOSCIENCES
BRETAGNE AGRONOMIE ALIMENTATION

UBO
Université de Bretagne Occidentale

**Titre :** Etude de l'adaptation chez *Penicillium roqueforti*: approches fonctionnelle et de génomique évolutive

**Mots clés :** Champignon, adaptation, populations, génomique, métabolites, QTL

**Résumé :** La domestication, qui implique une sélection forte et récente dans un environnement contrôlé, est un excellent modèle pour l'étude de l'adaptation locale. *Penicillium roqueforti* est un microorganisme dont deux des populations connues ont été domestiquées pour la production de fromages à pâte persillée.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons cherché à approfondir la caractérisation phénotypique des populations de *P. roqueforti* et à déterminer les causes génétiques de leurs différences. Pour ce faire, nous avons comparé les cinq populations, dont une associée à un fromage non-inoculé (Bleu de Termignon) mise en évidence dans ces travaux.

La population "Termignon" présente une forte diversité génétique et des phénotypes intermédiaires entre les populations domestiquées et non-domestiquées.

La comparaison phénotypique des populations a montré une différenciation des populations domestiquées cohérente avec une adaptation au milieu fromager et à une sélection pour une hypotoxigénicité. D'autre part, les populations non-domestiquées montrent un métabolisme plus diversifié que les populations non-fromagères, par une plus forte croissance sur des milieux variés et une production plus forte et diverse de métabolites.

La comparaison génétique des populations, et la cartographie QTL de cinq croisements révèlent des translocations et transferts horizontaux dans les génomes parentaux, des indices quant à l'architecture génétique de la domestication de *P. roqueforti,* ainsi que les causes possibles de la diminution de production de toxines dans la population « non-Roquefort ».

**Title :** Functional study and evolutionary genomics of adaptation in *Penicillium roqueforti*

**Keywords :** Fungi, adaptation, population, genomic, metabolites, QTL

**Abstract :** Domestication, which implies strong and recent selection in a controlled environment, is an excellent model for the study of local adaptation. *Penicillium roqueforti* is a filamentous fungus with four genetically and phenotypically differentiated populations, two of which have been domesticated for the production of blue-veined cheeses.

In this thesis, we aimed to further study the phenotypic differences between *P. roqueforti* populations and to determine the genetic determinants of the differences. To do so, we compared five populations, including one described in this work and associated with non-inoculated cheese (Bleu de Termignon).

Phenotypic differences of *P. roqueforti* populations were consistent with an adaptation to the cheese-making environment and selection for low toxicity. On the other hand, non-domesticated populations showed a more diverse metabolism than non-domesticated populations, characterized by better growth in various media and higher and more diverse metabolite production.

The genetic comparison of the populations, and the QTL cartography of five crosses revealed genomic translocation and horizontal transfer in parental strain lineages, clues to the genetic architecture of domestication of *P. roqueforti*, and the possible causes of the reduced toxin production in the "non-Roquefort" population.