THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Mme SELMA SNINI

le mercredi 17 décembre 2014

Titre :

ELUCIDATION DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE D'UNE MYCOTOXINE, LA PATULINE: CARACTERISATION DU CLUSTER DE GENE ET ETUDE DE LA REGULATION

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

INRA Toxalim UMR 1331, Equipe biosynthèse et Toxicité des Mycotoxines

Directeur(s) de Thèse :

MME ISABELLE OSWALD

M. JEAN-DENIS BAILLY

Rapporteurs :

M. BRUNO LE CAM, INRA ANGERS

M. PHILIPPE SILAR, UNIVERSITE PARIS 7

Membre(s) du jury :

Mme FLORENCE MATHIEU, INP TOULOUSE, Président

M. CHRISTIAN BARREAU, INRA BORDEAUX, Membre

M. JEAN-DENIS BAILLY, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Membre

M. OLIVIER PUEL, INRA TOULOUSE, Membre

Remerciements

Le travail présenté dans ce manuscrit été réalisé au sein de l'équipe Biosynthèse et Toxicité des Mycotoxines, de l'unité Toxalim à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Toulouse.

Je tiens tout d'abord à remercier mes encadrants de thèse :

Isabelle Oswald pour m'avoir accueillie au sein de son équipe dès mon année de master et pour m'avoir fait confiance dans la réalisation de cette thèse. Je la remercie pour ses conseils toujours pertinents et justes et son implication malgré ses nombreuses occupations.

Jean-Denis Bailly, co-directeur de cette thèse, pour avoir accepté de le devenir au pied levé et pour s'être très investi lors de mon comité de thèse et lors de la correction de ce manuscrit.

Je ne sais comment exprimer ma gratitude à **Olivier Puel** pour avoir encadré tous les travaux présentés dans cette thèse. Je lui suis très reconnaissante de m'avoir fait confiance dès le départ malgré mes connaissances légères en mycotoxines. Je le remercie pour m'avoir guidée, encouragée, conseillée, tout en me laissant une grande liberté dans l'organisation de mes travaux. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail.

J'adresse mes remerciements aux membres du jury :

Florence Mathieu pour avoir accepté de présider le jury.

Philippe Silar et **Bruno Le Cam** qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de cette thèse et d'avoir pris le temps de l'examiner.

Tous mes remerciements vont également à l'ensemble des membres de l'équipe de Biosynthèse et Toxicité des Mycotoxines pour leur gentillesse, leur aide et leurs conseils tout au long de cette thèse.

Je remercie de tout cœur **Philippe** et **Joëlle** pour leur soutien, leur aide et leur réconfort durant ces dernières années. Leur soutien quasi quotidien lors de mon séjour en Allemagne a été

une grande aide lors des petites baisses de moral. J'espère un jour pouvoir de nouveau travailler avec des personnes comme vous.

Un grand merci à **Sylviane**, tes compétences et ton œil avisé ont été d'une grande aide dans la réalisation de ces travaux.

Je souhaite remercier l'ensemble des étudiants avec qui j'ai partagé le bureau, la paillasse et les cafés. Un grand merci à **Patricia**, pour son amitié et son soutien constant même de l'autre bout du monde.

Joanna et **Rhoda**, mes collègues mais surtout amies de la *patulin team.* J'espère pouvoir vous rendre visite au Liban et assister à vos soutenances.

Isaura, ça a été un plaisir de partager le bureau avec toi lors des derniers mois de la thèse. Ton apprentissage du français nous aura parfois conduites à des situations cocasses.

J'ai eu plaisir à encadrer **Pauline** et **Joanne**, vous m'avez apporté beaucoup tant sur le plan professionnel que personnel.

Je souhaite également remercier les autres membres de Toxalim que j'ai côtoyé durant ces dernières années. Chacun d'entre vous m'avait apporté à un moment de ma thèse ou tout le long de celle-ci, son aide, son soutien ou encore son amitié.

Plus particulièrement,

Mélanie, avec qui je partage tout depuis maintenant cinq ans. Ta présence à mes cotés depuis le M1 est un vrai bonheur. Je pense que le soutien respectif que nous avons l'une pour l'autre nous amène à faire de grandes choses ... (ou pas!)

Alice, pour ces discussions à rallonge autour d'un café. Je peux t'assurer que tu auras été d'une présence précieuse durant ces derniers mois.

Hervé, **Alex**, **Edwin**, **Arnaud**, **Fred** et **Nicolas** pour toute leur gentillesse, leurs encouragements et pour toutes les discussions et les moments passés à vos côtés.

Vincent, l'informatique restera toujours un grand mystère pour moi mais ton soutien très professionnel et amical durant la grande étape de la rédaction a été d'une grande aide.

Yannick et **Claire** pour votre implication et votre aide dans chacun de mes projets mais aussi pour le bon temps passé à discuter.

Jeannette, pour ta bonne humeur constante et nos discussions matinales autour d'un (ou deux) café.

Isabelle, pour sa gentillesse, sa disponibilité et sa capacité à s'adapter à notre rythme de travail.

Je remercie également toutes les personnes qui ont participé à l'élaboration de ces travaux de façon plus ponctuelle ou en m'accueillant au sein de leur équipe et laboratoire.

Olivier Dubois et **Vessela Atanasova-Penichon** pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse et de l'intérêt porté à ces travaux.

Christian Barreau pour avoir participé à mes comités de thèse et pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe MycSA pour me dévoiler les secrets de la transformation des protoplastes de champignon.

Enric Zehraoui, grâce à toi les Southern blot ne sont plus une torture pour moi. Un grand merci à toi et **Aude** pour m'avoir hébergée lors de mon séjour sur Bordeaux. C'est quand même plus sympa que l'hôtel au bord du périf'.

L'ensemble des membres de l'équipe "Food Mycology" de **Rolf Geisen** pour leur accueil, leur gentillesse et leur aide lors de mon séjour à Karlsruhe. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec vous

Pour finir mes remerciements, les plus sincères vont à ma famille et mes amis. Votre soutien et vos encouragements ont été le moteur de cette dernière année qui fut plus que mouvementée, tant du coté personnel que professionnel.

Enfin, merci à toi, pour ton soutien et ton amour qui m'ont tant aidée au cours de ces derniers mois. Malgré un travail très prenant tu as réussi, à ta manière, à rendre cette fin de thèse la moins dure possible. Une page se tourne, une nouvelle aventure commence.

TABLE DES MATIERES

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES _____ *i*

TABLE DES ILLUSTRATIONS _____ *ii*

LISTE DES ABREVIATIONS _____ *iv*

INTRODUCTION _____ **1**

CONTEXTE DE L'ETUDE _____ 2

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE _____ 4

I. Moisissures, Métabolites secondaires et Mycotoxines _____ 5

1. Les moisissures : données générales _____ 5
2. Les mycotoxines : données générales _____ 8

II. Voie de biosynthèse, Cluster de gènes et Régulation _____ 16

1. Voie de biosynthèse et organisation des gènes en cluster _____ 16
2. Les facteurs de transcription spécifiques _____ 20
3. Les autres facteurs de transcription _____ 22

III. La régulation par la lumière et le complexe velvet chez les champignons filamenteux _____ 25

1. Le système de perception de la lumière et l'horloge circadienne _____ 25
2. La régulation par VeA _____ 28
3. Le complexe Velvet _____ 31

IV. La patuline _____ 33

1. Généralités _____ 33
2. Propriétés physiques et chimiques _____ 33
3. Espèces fongiques productrices et conditions de synthèse _____ 33
4. Voie de biosynthèse de la patuline _____ 35
5. Cluster de gènes de la voie de biosynthèse de la patuline _____ 38
6. Occurrence de la patuline dans les aliments _____ 40
7. Exposition de la population française à la patuline _____ 41
8. Propriétés toxicologiques de la patuline _____ 41
9. Valeurs toxicologiques de référence _____ 42
10. Règlementation _____ 42

OBJECTIFS DE LA THESE _____ 44

TRAVAIL EXPERIMENTAL _____ **46**

Chapitre 1 **Etude de la voie de biosynthèse de la patuline** _____ **47**

1. Caractérisation du cluster de gènes impliqué dans la voie de biosynthèse de la patuline chez *Penicillium expansum (ARTICLE 1)* _____ 48
2. Caractérisation de la seconde étape de la voie de biosynthèse de la patuline chez *Aspergillus clavatus (ARTICLE 2)* _____ 68

Chapitre 2 **Régulation de la voie de biosynthèse de la patuline chez *Penicillium expansum*** **76**

La mutation du gène *patL*, facteur de transcription spécifique de la voie de biosynthèse de la patuline, affecte la virulence de *Penicillium expansum in vivo*. *(ARTICLE 3)* _____ 77

Chapitre 3 **Impact de la lumière sur la voie de biosynthèse de la patuline et sa production chez *Penicillium expansum*** _____ **116**

DISCUSSION GÉNÉRALE et PERSPECTIVES _____ **140**

CONCLUSION _____ **168**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES _____ *171*

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

ARTICLES

The gene PatG involved in the biosynthesis pathway of patulin, a food-borne mycotoxin, encodes a 6-methylsalicylic acid decarboxylase. SP SNINI; S TADRIST; J LAFFITTE; EL JAMIN; IP OSWALD and O PUEL.
International Journal of Food Microbiology, Volume 171, 3 Février 2014, Pages 77-83.

Sequencing, physical organization and kinetic expression of the patulin biosynthetic gene cluster from Penicillium expansum. J. TANNOUS, R. El KHOURY, SP. SNINI, Y. LIPPI, A. EL KHOURY, A. ATOUI, R. LTEIFF, IP. OSWALD, O. PUEL.
International Journal of Food Microbiology, Volume 189, 17 Octobre 2014, Pages 51-60.

The disruption of *patL*, the patulin specific transcription factor affects *Penicillium expansum* virulence on apples. SP. SNINI, J. TANNOUS, P. HEUILLARD, S. BAILLY, E. ZEHRAOUI, C. BARREAU, IP. OSWALD O. PUEL. *Manuscrit en préparation*

COMMUNICATIONS ORALES

Bases moléculaires, caractérisation du cluster de gènes et régulation de la voie de biosynthèse de la patuline. Microbiotoul, 21 & 22 octobre 2013, Toulouse, France.

PATL, a Cys6 zinc finger transcription factor is involved in the regulation of the patulin biosynthesis in *Penicillium expansum.* 36th Mycotoxin Workshop16 - 18 Juin 2014, Göttingen, Allemagne.

La patuline, mycotoxine contaminant les pommes, est impliquée dans la virulence de *Penicillium expansum*. Demi-journée des doctorants TOXALIM, 27 juin 2014, Toulouse, France.

POSTERS

Molecular cloning and functional characterization of 6-methylsalicylic acid decarboxylase involved in biosynthesis of patulin. MycoRed & International Society for Mycotoxicology (ISM) conference, 15-18 November 2011, Mendoza, Argentine.

PATL : Facteur de régulation de la voie de biosynthèse de la patuline. Journée Mycotoxines. Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Écologie Microbienne (LUBEM EA3882, Université de Brest. 1er Février 2012, Brest, France.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Introduction

Figure 1 : Structures des mycotoxines majeures 6
Figure 2 : Origines métaboliques des différentes mycotoxines 16
Figure 3 : Voie de biosynthèse des aflatoxines 17
Figure 4 : Cluster de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des aflatoxines chez Aspergillus flavus 20
Figure 5 : Signaux environnementaux et éléments régulateurs impliqués dans les mécanismes de régulation du métabolisme secondaire dans différentes espèces fongiques 24
Figure 6 : L'horloge circadienne chez Neurospora crassa 26
Figure 7 : Représentation schématique des différents domaines des protéines FphA, LreA et LreB d'Aspergillus nidulans. 27
Figure 8 : Modèle de liaison du complexe velvet aux récepteurs de lumière chez Aspergillus nidulans. 28
Figure 9 : Modèle de fonctionnement du complexe velvet chez Aspergillus nidulans 32
Figure 10 : Structure moléculaire de la patuline 33
Figure 11 : Pommes contaminées par Penicillium expansum 34
Figure 12 : Voie de biosynthèse de la patuline et des composés apparentés 36
Figure 13 : Cluster de gènes impliqués dans le voie de biosynthèse de la patuline chez Aspergillus clavatus. 39

Chapitre 2
The disruption of patL, the specifictranscription factor affects Penicillium expansum virulence on apples

Figure 1: Construction of PeΔpatL mutant. 90
Figure 2: Southern blot analysis of genomic DNA of the wild-type, the PeΔpatL1 transformant and the complemented transformant PeΔpatL:patL 90
Figure 3: Morphological aspect of NRRL 35695, PeΔpatL1 and complemented strains after 7 days of culture at 25°C on PDA and MEA. 92
Figure 4: Patulin production on APAM medium and on Golden Delicious. 95
Figure 5: Growth curves of the rotten spot and growth rate. 95
Figure 6: Volume of the rot on Golden Delicious apples. 95
Figure 7: HPLC analysis of the wild type strain NRRL 35695 and the mutant strain PeΔpatL1 extracts from Czapek agar medium 96
Figure 8: Kinetic of the patulin production in apples. 97
Figure 9: Expressions of the patulin biosynthesis genes in the wild-type strain NRRL 35695, the mutated strain PeΔpatL1 and the complemented strain PeΔpatL:patL 98

Complément à l'étude

Figure 10 : pH des différentes variétés de pommes. 109
Figure 11 : Suivis du développement des lésion brunes, vitesse de développement de ces lésions et volume de pourriture pour différentes variétés de pommes infectées par la souche sauvage Penicillium expansum NRRL 35695 et la souche mutante PeΔpatL1. 110
Figure 12 : Lésions brunes observées chez les différentes variétés de pommes infectées avec la souche Penicillium expansum NRRL 35695 et la souche mutante PeΔpatL1. 111
Figure 13 : Analyse de la production de patuline in vivo dans différentes variétés de pomme. 112

Chapitre 3
Impact de la lumière sur la voie de biosynthèse de la patuline et sa production

Figure 1 : Photo de la boite à lumière utilisée dans cette étude. 122
Figure 2 : Croissance radiale, sporulation et aspect macroscopique de la souche NRRL 35695 sur PDA incubée 5 jours à 25°C dans les différentes conditions lumineuses. 126
Figure 3 : Analyse de la production de patuline sur PDA par chromatographie sur couche mince (CCM). 127
Figure 4 : Analyse de la production de citrinine sur PDA par chromatographie sur couche mince (CCM). 127
Figure 5 : Niveaux d'expression des gènes du cluster de la voie de biosynthèse de la patuline chez la souche Penicillium expansum NRRL 35695 incubée sous différentes conditions lumineuses. 129
Figure 6 : Suivis de la morphologie de la souche NRRL 35695 lors de l'expérience de shift. 132

Figure 7 : Suivis de la croissance radiale de la souche NRRL 35695 sur PDA durant la durée de l'expérience de shift. 132
Figure 8 : Suivis de la production de patuline lors de l'expérience de shift. 133
Figure 9 : Suivis de l'apparition des lésions brunes sur les pommes Golden Delicious infectées avec la souche de Penicillium expansum NRRL 35695 sous les différentes conditions lumineuses. 134
Figure 10 : Vitesse de développement des lésions brunes sur des pommes de la variété Golden Delicious infectées avec la souche de Penicillium expansum NRRL 35695. 134
Figure 11 : Aspect des pommes Golden Delicious infectées avec la souche de Penicillium expansum NRRL 35695 sous les différentes conditions lumineuses. 135
Figure 12 : Volume de pourriture sur des pommes de la variété Golden Delicious infectées avec la souche de Penicillium expansum NRRL 35695 et incubées sous différentes conditions lumineuses. 136

Discussion générale et perspectives

Figure 1 : Représentation schématique du cluster de la voie de biosynthèse de la patuline chez Penicillium expansum et comparaison de l'organisation des gènes avec d'autres espèces fongiques. 146
Figure 2 : Analyse de l'expression des gènes aux bornes du cluster de la voie de biosynthèse de la patuline chez Aspergillus clavatus 151
Figure 3 : Alignement de la partie N-terminale de la néopatuline synthase de Penicillium griseofulvum avec l'enzyme codée par le gène patF chez Penicillium expansum. 155
Figure 4 : Schéma hypothétique de l'organisation spatiale de la voie de biosynthèse de la patuline au sein de la cellule fongique. 156
Figure 5 : Schéma hypothétique du mécanisme induit durant l'infection des pommes 162

TABLEAUX

Introduction

Tableau 1 : Les mycotoxines majeures 9
Tableau 2 : Catégories moléculaires des mycotoxines majeures 18
Tableau 3 : Analyse SMURF des génomes de divers champignons filamenteux 19
Tableau 4 : Teneurs maximale de patuline dans les denrées alimentaires. 43

Chapitre 3
Impact de la lumière sur la voie de biosynthèse de la patuline et sa production

Tableau 1 : Analyse de la production de patuline dans les pommes infectées par la souche NRRL 35693 de Penicillium expansum et incubées sous les différentes conditions lumineuses. 136

Discussion générale et perspectives

Tableau 1 : Exemples de transfert horizontaux de gènes, d'après Fitzpatrick (2012). 147
Tableau 2 : Analyse BLAST des séquences des gènes du cluster de la voie de biosynthèse de la patuline 149

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AFB_1 : Aflatoxine B_1

AFB_2 : Aflatoxine B_2

AFG_1 : Aflatoxine G_1

AFG_2 : Aflatoxine G_2

AFM_1 : Aflatoxine M_1

AFM_2 : Aflatoxine M_2

ARN : Acide Ribonucléique

Aw : Activity water

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

Da : dalton

DJTP : Dose Journalière Tolérable Provisoire

DL 50 : Dose létale 50 %

DMJTP : Dose Journalière Maximale Tolérable Provisoire

DON : Déoxynivalénol

FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations

FB_1 : Fumonisine B_1

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

IARC : International Agency for Research on Cancer

JECFA : Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

LOV : Light Oxygen Volt : domaine retrouvé chez les protéines sensible à la lumière, l'oxygène ou le voltage qui interagissent avec une molécule de flavine

NIV : Nivalénol

NRPS : Non-Ribosomal Peptide Synthase

OTA : Ochratoxine A

PAS ou Per-Arnt-Sim : **P**er – period circadian protein, **A**rnt – aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein, **S**im – single-minded protein

pb : paire de bases

p.c. : poids corporel

PDA : Potato Dextrose Agar

PCR : Polymerase Chain Reaction

SEM : Standard Error Mean

U. A. : Unité Arbitraire

UE/EU : Union européenne / European union

WC-1 : White Collar- 1

WC-2 : White Collar- 2

WCC : White Collar Complex

ZEA : Zéaralénone

INTRODUCTION

CONTEXTE DE L'ETUDE

Depuis des millénaires, l'Homme est conscient de l'importance mais surtout de la nécessité de contrôler la qualité des aliments afin de protéger au mieux les consommateurs. L'accès à une alimentation saine est une priorité et un combat qu'il mène depuis toujours. Encore plus aujourd'hui, la sécurité sanitaire des aliments est devenue une priorité en santé publique. En effet, chaque année des millions de personnes tombent malades après avoir ingéré des aliments impropres à la consommation. A chaque risque identifié, l'Homme essaye de développer des outils qu'ils lui permettront de se protéger du danger encouru et d'accéder à des aliments sains. L'amélioration des pratiques culturales ainsi que celle des procédés utilisés lors des chaines de productions alimentaires participent à cet objectif. Aussi, la mise en place de réglementations constitue une de ces réponses et survient généralement suite à des épisodes graves d'intoxication. C'est le cas pour les aflatoxines découvertes dans les années 1960 suite à l'hécatombe de plusieurs élevages de dindes en Angleterre provoquée par des tourteaux d'arachides provenant du Brésil fortement contaminés. C'est à partir de cette époque que de nombreuses toxines produites par des moisissures dans les aliments, ainsi que les troubles qu'elles engendrent, ont largement été étudiés. A ce jour, plus de 2000 métabolites secondaires d'origine fongique ont été identifiés et parmi ces derniers une trentaine présentent des propriétés toxiques avérées et sont qualifiées de "mycotoxines".

Les mycotoxines sont produites au champ ou lors du stockage et contaminent facilement les matières agricoles. De part leur grande stabilité aux différents traitements chimiques ou physiques, les mycotoxines peuvent perdurer le long des chaines de productions et se retrouver à l'état de contaminant dans les denrées alimentaires finales destinées à la consommation humaine ou animale. Les mycotoxines entrainent des préjudices économiques considérables pour les agriculteurs puisqu'elles sont responsables d'une baisse de la qualité des matières premières (qualité nutritionnelle des grains), d 'une baisse des rendements (baisse de la quantité de grains commercialisables, diminution des performances zootechniques des animaux et parfois mortalité accrue des animaux de rente) et d'une diminution de la valeur économique des récoltes (déclassement des lots). Selon les estimations de la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), les pertes totales des denrées alimentaires dues aux mycotoxines sont de l'ordre de 1 milliard de tonnes par an. Il existe des procédés de détoxification mais souvent trop onéreux et jusqu'à présent exclusivement réservés aux denrées alimentaires destinées à la consommation animale. Ils ne peuvent donc pas se substituer aux bonnes pratiques culturales. Afin de mettre en place des réglementations, il est nécessaire de connaître les conditions favorables à la production de mycotoxines ainsi que les mécanismes mis

en place par le champignon pour enclencher cette production. Pour cela un travail fondamental pour chaque mycotoxine doit être préalablement réalisé.

Actuellement seulement 6 familles de mycotoxines sont soumises à une réglementation : les aflatoxines, la zéaralénone, le déoxynivalénol, les fumonisines, l'ochratoxine A et la patuline. Parmi ces mycotoxines, la patuline reste avec l'ochratoxine A, la seule mycotoxine dont la voie de biosynthèse n'a pas été entièrement élucidée, tant sur le plan chimique que sur le plan génétique.

Une partie du travail de thèse a donc consisté à étudier la voie de biosynthèse de la patuline. La caractérisation complète du cluster de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la patuline a été entreprise chez *Penicillium expansum.* La mise à disposition des séquences des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse de patuline permettra la caractérisation moléculaire des différentes étape de cette cascade de réaction. En parallèle de ces travaux, la caractérisation de la seconde étape de cette voie de biosynthèse réalisée chez *Aspergillus clavatus*, organisme modèle producteur de patuline.

Dans une seconde partie de cette thèse, l'aspect régulation de la voie de biosynthèse de la patuline a été étudié. Par la mutation du gène *patL,* se trouvant dans le cluster, la voie de biosynthèse de la patuline a pu être complètement éteinte, conduisant ainsi à une absence de production de patuline. L'implication de la patuline dans la pathogénicité et la virulence de *Penicillium expansum* vis-à-vis des pommes de différentes variétés a donc pu être étudiée.

Dans la dernière partie de cette thèse, l'impact de la lumière de différentes longueurs d'ondes a été évalué. En effet, les conditions actuelles de stockage des pommes se déroulent à l'obscurité. L'obscurité étant favorable au développement et à la propagation des espèces fongiques, l'hypothèse de travail a été de tester différentes conditions lumineuses sur la croissance et la production de patuline par *Penicillium expansum*, *in vitro* et *in vivo.*

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

L'étude bibliographique qui suit est composée de quatre parties. Dans une première partie sont exposées les données générales concernant les moisissures et les mycotoxines. Dans une seconde partie une attention particulière est portée aux voies de biosynthèse des mycotoxines et à l'organisation des gènes codant pour les enzymes impliquées sous forme de cluster. Dans la troisième partie de cette étude bibliographique sont présentés la régulation des voies de biosynthèses des mycotoxines par des facteurs de transcriptions spécifiques ou par des facteurs de transcriptions globaux répondant à des stimuli abiotiques tels que la lumière, le pH ou encore le stress oxydatif. Enfin, dans une quatrième et dernière partie, sont exposées les données générales se rapportant à la patuline, mycotoxine sur laquelle les travaux de cette thèse portent.

I. Moisissures, Métabolites secondaires et Mycotoxines

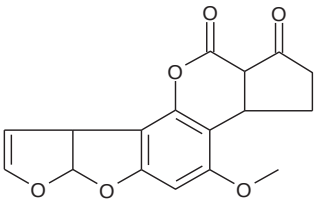
1. Les moisissures : données générales

Les moisissures sont des champignons filamenteux qui font parti du règne des *Fungi* (du latin littéraire *fungus*, le champignon). Le terme moisissure n'a pas de sens phylogénique puisque sous cette appellation sont regroupées des espèces particulières du phylum des ascomycètes, telles que les *Aspergillus*, les *Fusarium* et les *Penicillium* mais aussi des zygomycètes telles que les Mucorales.

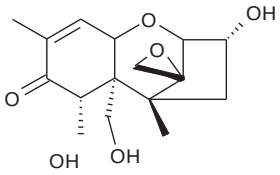
La plupart des ascomycètes sont haploïdes et ont une croissance végétative conduisant à la formation d'un mycélium. Les champignons filamenteux peuvent présenter deux types de cycles de reproduction : la reproduction asexuée ou sexuée. Dans le cas de la reproduction asexuée, les moisissures produisent des spores (ou conidies) qui vont ensuite germer pour former à nouveau un mycélium. Dans le cas de la reproduction sexuée, des mycéliums de types sexuels opposés vont s'entrelacer et former un ascogone. Cet ascogone forme un ensemble d'hyphes, un ascocarpe. Les extrémités des hyphes sont séparées en asques dans lesquels se forment des ascospores qui, une fois arrivés à maturité, sont libérées et germent afin de former un nouveau mycélium.

Les moisissures sont des organismes eucaryotes pluricellulaires capables de se développer sur divers substrats. Elles sont hétérotrophes vis-à-vis du carbone et dégradent les matières organiques en les transformant en matières minérales qu'elles assimilent par absorption. Les moisissures ont un rôle capital dans le cycle de la matière. En effet en dégradant les matières organiques elles participent à la formation de l'humus, la couche supérieure du sol. Elles sont omniprésentes dans notre environnement (sol, eau, plantes...) et sont véhiculées par l'air, les matières premières, les Hommes et les animaux. A ce jour, environ 99 000 espèces fongiques ont été décrites mais on estime que leur nombre total pourrait atteindre 5 millions (Kupferschmidt 2012).

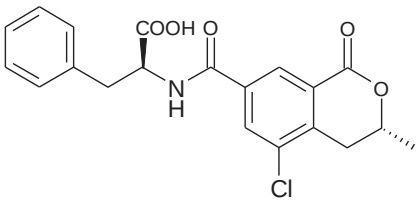
Bien qu'elles soient relativement peu exigeantes, un certain nombre de facteurs nutritifs et environnementaux doivent être réunis afin qu'elles puissent se développer. Parmi les éléments nutritifs, les plus importants sont le carbone et l'azote utilisés sous forme de composés organiques ainsi que des ions minéraux tels que le potassium, phosphore et magnésium sous forme de traces. Les facteurs environnementaux comme le pH, la lumière et la température conditionnent aussi le développement des moisissures. Cependant, la disponibilité en eau reste le facteur le plus important. En effet, en dessous d'une a_w de 0,65 aucune moisissure ne peut se développer.



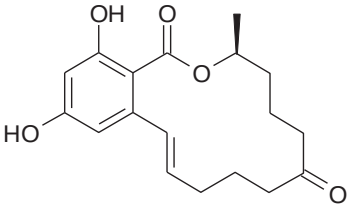
Aflatoxine B1



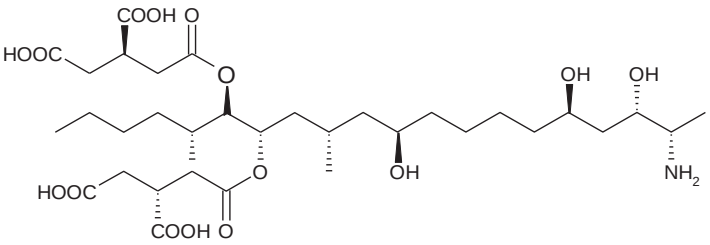
Déoxynivalénol



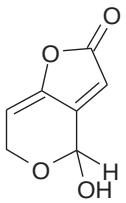
Ochratoxine A



Zéaralénone



Fumonisine B1



Patuline

Figure 1 : Structures des mycotoxines majeures

Leur grande faculté d'adaptation, leur potentiel enzymatique important et leur forte activité de synthèse biochimique, font des moisissures de formidables usines à production de métabolites. Cette capacité est d'ailleurs largement utilisée en industrie pharmaceutique (production d'antibiotiques) ou alimentaire (fromagerie, charcuterie ...). Lorsqu'elles évoluent dans des conditions optimales de croissance, les moisissures sont capables de produire des métabolites secondaires qui, à l'inverse des métabolites primaires, ne sont pas indispensables au développement et à la survie du champignon filamenteux. Actuellement plus de 2000 métabolites secondaires d'origine fongique ont été identifiés, mais ce chiffre en constante croissance, est largement sous-estimé car la majorité des études réalisées portent sur un petit nombre d'espèces fongiques en regard du nombre total existant. Néanmoins, il semblerait que la sécrétion de ces composés puisse, entre autre, faciliter la colonisation des substrats par le champignon filamenteux en lui conférant un avantage par rapport à d'autres microorganismes avec lesquels il serait en compétition. Cependant, à l'opposé de ces aspects bénéfiques, les moisissures peuvent devenir nuisibles non seulement en altérant les qualités organoleptiques et nutritionnelles des denrées alimentaires, mais aussi en synthétisant des composés toxiques pour l'Homme et l'animal. Ces composés de structures chimiques très variées et de toxicité différentes sont communément appelés mycotoxines et sont responsables de mycotoxicoses. La Figure 1 présente la diversité structurale des mycotoxines de majeure importance.

Les moisissures toxinogènes peuvent se développer sous tous les climats, sur tous les supports solides ou liquides dès l'instant où les conditions nécessaires à la croissance décrites précédemment sont réunies (Paterson 2006). Elles peuvent donc contaminer une grande variété de substrats alimentaires. Parmi les produits et aliments d'origine végétale, les céréales et leurs produits dérivés (y compris les produits de fermentation tels que les bières) présentent un facteur de risque élevé compte tenu à la fois de la fréquence de contamination mais aussi de leur consommation importante en Europe quel que soit le régime alimentaire. Les autres produits d'origine végétale sont les fruits (y compris leur jus et leurs produits de fermentation tels que les vins, cidres et leurs dérivés). Les produits et aliments d'origine animale tels que le lait, la viande les abats et tout ce qui en dérive, doivent retenir l'attention, du fait qu'ils peuvent aussi contenir des traces de ces composés toxiques ou de métabolites issues de leur transformation. (Yiannikouris and Jouany 2002).

2. Les mycotoxines : données générales

a. Définition et importance

Les mycotoxines sont des composés de faible poids moléculaire (<1000 Daltons) produites principalement par les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. La production de mycotoxines par ces champignons dans les cultures peut se dérouler à différentes étapes de la chaine de production : avant la récolte, durant la récolte, le séchage ou encore lors du stockage. Les conditions climatiques, les mauvaises pratiques culturales ou de stockage peuvent permettre le développement de ces champignons filamenteux et augmentent ainsi le risque de présence de mycotoxines. Elles contaminent les matières premières, pénètrent la chaine alimentaire et grâce à leur forte stabilité aux différents traitements appliqués (cuisson, stérilisation...) elles perdurent tout le long de celle-ci même après élimination des organismes producteurs. Actuellement, on considère que plus de 50 % des denrées alimentaires produites sont contaminées par des mycotoxines mais ce chiffre peut être largement revu à la hausse compte tenu de la très forte occurrence des moisissures. En 2013, une étude réalisée sur 17 316 échantillons de céréales (maïs, blé, orge et riz) et leurs produits dérivé provenant de différentes régions du globe (Amérique du Nord et du Sud, Afrique, Europe, Océanie et Asie) démontre que la problématique des mycotoxines est mondiale (Streit et al. 2013). Néanmoins, la répartition des mycotoxines diffère selon les régions témoignant ainsi des différences de culture, de conditions climatiques et de pratiques agricoles.

b. Toxicité des mycotoxines

Lorsque les mycotoxines sont ingérées par le consommateur, elles provoquent des effets toxiques de nature variée qui dépendent de la structure de la toxine mais aussi de la dose et de la durée d'exposition. Elles peuvent induire une toxicité au niveau de différents organes et présentent des mécanismes d'actions cellulaires et moléculaires divers. Le Tableau 1 présente les principales mycotoxines, les principales espèces productrices, les aliments les plus souvent contaminés ainsi que les principaux effets délétères qu'elles provoquent.

Tableau 1 : Les mycotoxines majeures

Mycotoxine	Principaux producteurs	Produits touchés	Effets délétères
Aflatoxines	*A. flavus / A. parasiticus*	Maïs, blé, noix, amandes, figues, dattes	Cancérogénicité, Génotoxicité, Hépatotoxicité
Trichothécènes (DON)	*F. graminearum*	Blé, maïs, orge, riz	Immunotoxique
Ochratoxine A	*A. ochraceus P. verrucosum*	Raisin, céréales, noix, fruits sec	Génotoxicité, Néphrotoxicité
Zéaralénone	*F. graminearum*	Maïs, blé	Ostrogénique
Fumonisines	*F. verticillioides*	Maïs	Hépatotoxicité, Génotoxicité,
Patuline	*P. expansum B. nivea*	Pommes, ensilages	Neurotoxicité

La toxicité des mycotoxines peut être aigüe ou chronique vis-à-vis des organismes consommant des denrées alimentaires contaminées. Les mycotoxines provoquant des mycotoxicoses aigües sont très rares en Europe où l'on retrouve plutôt des cas de toxicité chronique. Les effets chroniques sont les plus redoutés en raison des habitudes alimentaires des consommateurs et du pouvoir de rémanence des mycotoxines. Le problème des mycotoxines est d'autant plus complexe qu'un champignon peut produire simultanément plusieurs mycotoxines, qu'une matière première peut être contaminée par plusieurs champignons filamenteux et qu'une denrée alimentaire est composée de plusieurs matières premières. En conséquence, l'Homme et l'animal ne sont pas exposés à une seule mycotoxine à la fois mais, dans la quasi-totalité des cas, à un mélange de mycotoxines. Toujours d'après l'étude de Streit et al., parmi les 17 316 échantillons testés, 38 % étaient contaminés par plusieurs mycotoxines simultanément (Streit et al. 2013). Cette situation pose des interrogations sur les interactions toxiques qui peuvent exister entre les différentes mycotoxines présentes. De plus, les recommandations et les réglementations actuelles fixent des seuils pour une seule mycotoxine et ne tiennent donc pas compte des situations de multi-contaminations. Aussi, les textes existants ne concernent qu'un nombre limité de molécules car sur les 2000 composés d'origine fongique identifiés, une trentaine présente des effets toxiques avérés. Les mycotoxines constituent un problème très actuel de santé publique, de qualité et de sécurité alimentaire des aliments. Actuellement, des réglementations sont en place pour les aflatoxines en alimentation humaine et animale. Il existe des réglementations pour l'ochratoxine A, la patuline, le déoxynivalénol, la zéaralénone et les fumonisines pour l'alimentation humaine. Les teneurs maximales pour les aflatoxines, l'ochratoxine A, la patuline, le déoxynivalénol, la zéaralénone et les fumonisines sont fixées par le règlement CE N°1881/2006. Des recommandations proposant des teneurs maximales de toxines dans les denrées destinées à l'alimentation animale sont en vigueur depuis 2007 pour l'ochratoxine A, le déoxynivalénol, la zéaralénone et les fumonisines.

c. Les mycotoxines majeures

Aflatoxines

Cette famille de mycotoxines a été découverte lors d'investigations menées au moment de l'épisode de la "maladie X du dindon" (the Turkey X disease) qui a sévi en 1960 en Angleterre. L'analyse des matières premières constituant la nourriture de ces volailles a révélé une contamination par *Aspergillus flavus* et mettant en évidence la présence d'une toxine dans les tourteaux d'arachides : l'aflatoxine, pour ***A****spergillus* ***fla****vus* **toxine**.

Les aflatoxines sont principalement produites par des espèces d'*Aspergillus* telles que *Aspergillus flavus et Aspergillus parasiticus.* Ces deux espèces sont toutes deux productrices d'aflatoxines de type B mais l'espèce *Aspergillus parasiticus* produit également des aflatoxines de type G (Varga et al. 2011). La famille des aflatoxines comprend plusieurs molécules. Les plus abondantes dans la nature sont les aflatoxines AFB_1, AFB_2, AFG_1 et AFG_2 (Huffman et al. 2010). Les aflatoxines AFM_1 et AFM_2 sont les métabolites des aflatoxines AFB_1 et AFB_2, issus de leur hydroxylation dans le foie des animaux exposés. Ces métabolites représentent un danger en terme de santé publique car ils sont excrétés dans le lait, se fixent aux caséines et persistent dans les produits laitiers.

Le pouvoir toxique des aflatoxines est principalement associé à l'aflatoxine AFB_1 qui est considérée comme le principal métabolite génotoxique et possède le plus fort potentiel cancérogène de toutes les aflatoxines.

L'organe cible étant le foie, l'aflatoxine AFB_1 est responsable de l'apparition de cancers hépatiques mais aussi d'aflatoxicoses aigües. Cette dernière pathologie ressemble à une hépatite aigüe accompagnée de vomissements, de douleurs abdominales, d'ictères, d'œdèmes et pouvant parfois aller jusqu'au décès. Une des dernières épidémies d'intoxication aigüe par les aflatoxines a eu lieu en 2004 au Kenya. En 7 mois 317 cas ont été rapportés dont 125 décès par hépatite aigüe. L'épidémie a été attribuée à la consommation de maïs fortement contaminé par des aflatoxines (Azziz-Baumgartner et al. 2005; Lewis et al. 2005; Probst et al. 2007). Les effets immunomodulateurs et immunotoxiques des aflatoxines ont été étudiés *in vitro* et *in vivo* (Bondy and Pestka 2000; Meissonnier et al. 2008). Elles affectent la réponse inflammatoire en inhibant plusieurs fonctions des macrophages telles que la phagocytose, la production de radicaux oxygénés et la sécrétion de cytokines. L'aflatoxine AFB_1 affecte aussi la fonction de reproduction.

En 1993, le CIRC a classé l'aflatoxine AFB_1 dans le groupe 1 (agent cancérogène), l'aflatoxine AFM_1 dans le groupe 2B (agent peut-être cancérogène) et l'aflatoxine AFG_1 dans le groupe 3 (agent inclassable quant à sa cancérogénicité) (IARC 1997).

Fumonisines

Elles constituent une grande famille de mycotoxines largement produites par *Fusarium verticillioides, Fusarium proliferatum* et par d'autres espèces de *Fusarium* (Marasas 1996). Elles

contaminent les céréales et semblent être produites quasi exclusivement au champ sur maïs et sorgho et, dans une moindre mesure, lors du stockage. Le développement des espèces de *Fusarium* apparaît généralement avant la récolte ou très tôt lors du stockage lorsque les taux d'humidité sont encore élevés (a_w > 0,9) (Dutton 2009).

La famille des fumonisines regroupe 28 métabolites qui peuvent être classés en 4 groupes : A, B, C et P. Les fumonisines de type B sont naturellement plus abondantes dans les denrées contaminées, on retrouve principalement les fumonisines B_1, B_2, B_3 et B_4.

La toxicité des fumonisines a été mise en évidence pour la première fois pour la fumonisine B1 chez les chevaux. L'ingestion de fortes doses de fumonisines conduit à une leucoencéphalomalacie entraînant la mort de l'animal (Marasas 2001). Plus tard, des études ont démontré des effets hépatotoxiques, néphrotoxiques, carcinogèniques, immunotoxiques et reprotoxiques (Riley et al. 1994; Voss et al. 1996). Chez l'homme, l'exposition à la fumonisine B_1 pourrait jouer un rôle dans l'apparition de cancer de l'œsophage (Sun et al. 2007). La présence de fumonisine B1 dans les spores de *Fusarium verticillioides* (Tejada-Simon et al. 1995), exposition professionnelle pourrait être un problème, mais le manque de données sur les niveaux de fumonisines dans l'air lors des récoltes ou lors de la manipulation de maïs contaminé ne permet pas de l'affirmer.

Depuis 2002, la fumonisine B1 est classée dans le groupe 2B comme potentiel carcinogène pour l'homme (IARC 2002).

Ochratoxine A

L'ochratoxine A est produite par les espèces du genre *Aspergillus* et *Penicillium. Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus westerdijikiae* contaminent fréquemment les grains de café, de cacao, les épices et les fruits secs produits dans les régions tropicales de la planète (Urbano et al. 2001; Frisvad et al. 2004a; Iamanaka et al. 2005). *Aspergillus carbonarius* qui contamine les baies de raisin est responsable de la présence d'ochratoxine A dans le vin (Battilani and Pietri 2002). Parmi les espèces du genre *Penicillium*, *Penicillium verrucosum* contamine les céréales durant le stockage dans les régions tempérées du monde alors que *Penicillium nordicum* est plutôt détecté dans les fromages et les viandes fermentées (Reddy and Bhoola 2010).

L'ochratoxine A est connue pour sa néphrotoxicité. Historiquement, l'exposition à l'ochratoxine A a été associée à la Néphropathie Endémique des Balkans (NEB), maladie décrite pour la première fois en Bulgarie puis en Croatie, Serbie et Roumanie (Craciun and Rosculescu 1970). Elle se caractérise par des troubles rénaux sévères chez l'Homme. Néanmoins, l'origine de cette maladie est actuellement sujette à controverse et pourrait être la conséquence d'autres facteurs tels que la présence d'une toxine végétale : l'acide aristochique retrouvé dans les denrées incriminées (Bui-Klimke and Wu 2014a; Bui-Klimke and Wu 2014b).

L'ochratoxine A s'avère également immunotoxique, tératogène et neurotoxique mais à de plus fortes concentrations. Son pouvoir cancérogène est établi chez l'animal, mais les preuves sont encore insuffisantes chez l'Homme. L' ochratoxine A est classée dans le groupe 2 comme un potentiel carcinogène pour l'Homme (IARC 2002).

Trichothécènes

Les trichothécènes forment une famille qui comporte approximativement 170 molécules (Grove 1988; 1993) divisées en quatre types (A, B, C et D). Le type A est représenté par les toxines T-2 et HT-2 et le type B par le déoxynivalénol (DON), le nivalénol (NIV) et leurs dérivés acétylés. Le type C comporte des mycotoxines de moindre importance, tandis que les trichothécènes du type D, produits principalement par *Stachybotrys chartarum* présentent un macrocycle supplémentaire et sont qualifiés de trichothécènes macrocycliques. Les espèces du genre *Fusarium* sont les principales productrices de trichothécènes de type A et B. Les principaux producteurs des mycotoxines T-2 et HT-2 sont *Fusarium sporotrichioides, Fusarium langsethiae, Fusarium acuminatum* et *Fusarium poae.* Les principaux producteurs de déoxynivalénol sont *Fusarium graminearum* et *Fusarium culmorum*. Pathogènes des graminées (blé, orge, maïs), ces deux dernières sont considérées comme les principaux agents de la fusariose de l'épi (blé) ou la moisissure de la tige et de l'épi (maïs). Il a été démontré que la production de trichothécènes favorise le développement du champignon dans la plante mais qu'elle n'est pas essentielle à l'apparition des symptômes (Boenisch and Schäfer 2011).

Les trichothécènes sont toxiques pour l'Homme et pour toutes les espèces animales testées à ce jour. Ils sont responsables de divers effets d'inhibitions sur le métabolisme primaire des cellules eucaryotes et, en particulier, sur la synthèse des protéines en se liant à la sous unité 60S du ribosome (Rocha et al. 2005). La toxine T-2 est considérée comme étant la mycotoxine, produite par les *Fusarium*, la plus toxique de la famille des trichothécènes, même si elle n'est pas la plus répandue. Comme les autres trichothécènes, la toxine T-2 induit des pertes de poids, des vomissements, des blessures dans le foie et l'estomac et, à terme, la mort (Rocha et al. 2005). Le déoxynivalénol est aussi appelé vomitoxine en raison de son effet émétique chez l'Homme (épisode de contamination) et l'animal suite à des expositions aigues (Vesonder et al. 1976). Des expositions chroniques au déoxynivalénol cause un refus alimentaire chez les animaux (Maresca 2013). D'autres effets tels que la perte de poids, des irritations intestinales et des dérèglements du système immunitaire peuvent être observés. Depuis 1993, le déoxynivalénol est classé dans le groupe 3 où figurent les molécules pour lesquelles il est impossible de se prononcer quant à la cancérogénicité pour l'Homme.

Zéaralénone

La zéaralénone est principalement produite par des espèces de champignons filamenteux du genre *Fusarium* tels que, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium cerealis* et *Fusarium incarnatum*. Elle est produite par la plupart des *Fusarium* toxinogènes et en conséquence est isolée en présence d'autres mycotoxines de la famille des trichothécènes ou des fumonisines (Zinedine et al. 2007). Elle est principalement retrouvée dans les cultures céréalières, spécifiquement dans les grains de maïs mais aussi de blé et de soja. La production de zéaralénone survient généralement au champ mais aussi lors de mauvaises conditions de stockage.

La zéaralénone ainsi que ses métabolites sont des composés ostrogéniques se fixant sur les récepteurs à l'estrogène (Zinedine et al. 2007). Cette compétition conduit à une dérégulation de la fonction de reproduction via des effets sur la synthèse des ARNs et des protéines. L'ingestion de céréales contaminées est à l'origine d'une hyperœstrogénie chez le bétail, principalement chez le porc, qui se caractérise par une tuméfaction vulvaire et mammaire ainsi qu'une infertilité. L'exposition à la zéaralénone est aussi associée à la stimulation de l'apparition de cancer du sein chez l'Homme (Ahamed et al. 2001). D'autres symptômes tels que nausée, vomissements et diarrhée peuvent être observés. Des études *in vivo* chez le porc démontrent des effets immunosuppresseurs de la zéaralénone (Marin et al. 2013; Pistol et al. 2014).
La zéaralénone et ses métabolites sont classés dans le groupe 3 où figurent les produits pour lesquels il est impossible de se prononcer quant à la cancérogénicité pour l'Homme (IARC 1997).

Patuline

La patuline, faisant l'objet de cette thèse, sera décrite de manière plus complète que les mycotoxines précédentes dans la quatrième partie de cette introduction.

d. Rôle des mycotoxines chez le champignon

Le rôle des mycotoxines pour le champignon est encore peu connu. De nombreuses études ont démontré que les mycotoxines pouvaient avoir un rôle de facteur de pathogénicité et/ou de facteur de virulence pour le champignon. Il est important de distinguer la pathogénicité de la virulence. D'après Yoder (1980), la pathogénicité est la capacité à induire une maladie, c'est donc un terme qualitatif, alors que la virulence correspond au degré de la maladie causée, c'est donc un terme quantitatif. La fonction principale des facteurs de pathogénicité est d'endommager l'hôte en gênant son état physiologique. Par contre, les facteurs de virulence facilitent la croissance et la propagation du champignon au sein de l'organisme hôte (Hof 2008).

L'exemple du déoxynivalénol (DON), une mycotoxine de la famille des trichothécènes, a largement été étudié. Proctor et al. (1995) ont généré une souche mutante de *Fusarium*

graminearum ne produisant plus de trichothécènes et ont étudié la capacité de cette souche à infecter et à coloniser des épis de blé. Les analyses ont été réalisées sous serre mais aussi directement au champ et, dans les deux cas, en comparaison à la souche mutante, la souche sauvage productrice de DON provoquait significativement plus de symptômes et diminuait plus sévèrement les rendements. La production de DON par *Fusarium graminearum* semble donc impliquée dans le développement de la fusariose du blé. Une étude plus récente a démontré que la production de DON joue un rôle dans la propagation de la maladie mais que cette production n'était pas nécessaire pour l'infection initiale des épis de blé par le champignon (Bai et al. 2001).

Un autre exemple très étudié est celui des fumonisines. Le rôle potentiel de la production de fumonisines sur le développement de la maladie chez le maïs a donné lieu à de nombreuses études avec des résultats très variés (Desjardins et al. 1995; Desjardins et al. 1998; Desjardins et al. 2002). Finalement, plusieurs études s'accordent sur la nécessité de la production de fumonisines pour le déclanchement de la maladie. En effet, les souches non productrices de fumonisines ne causent pas de lésions sur les feuilles et ont beaucoup moins d'impact sur le développement des racines et sur la hauteur des tiges. A l'inverse, les souches productrices de fumonisines causent de manière dose dépendante une réduction du développement des racines et des tiges et induisent des lésions sur les feuilles (Williams et al. 2007; Glenn et al. 2008).

Depuis une dizaine d'année, un autre rôle est attribué aux mycotoxines et aux métabolites secondaires. D'après plusieurs études, les métabolites secondaires sont un moyen de défense des espèces fongiques face aux autres organismes afin d'augmenter leur chance de survie dans les niches écologiques. Dans le sol, les champignons filamenteux sont confrontés à de nombreuses attaques provenant des protozoaires, des nématodes et des insectes. Ces organismes compétiteurs, voir fongivores, peuvent sérieusement affecter la croissance des espèces fongiques (Rohlfs 2005; McGonigle 2007). Comme exemple, nous pouvons citer l'étude de Rohlfs et al. (2007) dans laquelle l'équipe a démontré que le métabolisme secondaire d'*Aspergillus nidulans* jouait un rôle de protection contre les prédateurs. Afin de démontrer cela, les chercheurs ont généré une souche *d'Aspergillus nidulans* mutante pour le gène *LaeA,* impliqué dans la régulation globale du métabolisme secondaire. La souche sauvage et la souche mutante ont été mises en présence d'un arthropode fongivore largement répandu dans les sols du monde entier, *Folsomia candida*. Dans plus de 88 % des essais réalisés, l'arthropode va se nourrir de la souche mutée pour le gène *LaeA* démontrant ainsi qu'il est capable de discriminer deux souches sur la base des composés produits par ces dernières. Une autre étude décrit les effets de la mutation du gène *LaeA* sur les interactions entre *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus* ou *Aspergillus flavus* avec des larves de *Drosophila melanogaster*. En présence des souches mutantes, la mortalité des larves est largement réduite en comparaison avec les souches

sauvages du genre *Aspergillus*. La présence des larves de *Drosophila melanogaster* retarde la croissance fongique, néanmoins les souches sauvages d'*Aspergillus nidulans* et d'*Aspergillus flavus* se développent plus rapidement que celles mutantes pour le gène *LaeA* (Trienens et al. 2010). En conclusion, ces deux études démontrent, non seulement, que l'absence d'un ou plusieurs métabolites secondaire rend les espèces fongiques plus attractives pour les fongivores mais aussi que ces mêmes métabolites secondaires sont importants dans les situations de compétition entre les organismes.

II. Voie de biosynthèse, Cluster de gènes et Régulation

1. Voie de biosynthèse et organisation des gènes en cluster

Les mycotoxines appartiennent à différentes catégories biosynthétiques et dérivent de précurseurs issus du métabolisme primaire tels que l'acétyl-CoA (aflatoxines, fumonisines, stérigmatocystine, zéaralénone, patuline, ochratoxine A), les acides aminés (alcaloïde de l'ergot, ohratoxine A) ou les terpènes (trichothécènes, PR-toxine). Elles impliquent respectivement l'activation de polycétide synthase (PKS), de non-ribosomal peptide synthétase (NRPS) et de terpènes cyclase (TC). La diversité structurelle des mycotoxines résulte de la variété des réactions chimiques (cyclisation, aromatisation, glycosylation, hydroxylation et époxidation) impliquées dans leur biosynthèse (Boettger and Hertweck 2013). La fusion des voies de biosynthèses des polycétoacides et des peptides cycliques non-ribosomiques, conduit à l'obtention d'hybrides polycétoacides / peptides cycliques non-ribosomiques, tels que l'ochratoxine A et l'acide cyclopiazonique (Boettger and Hertweck 2013). En conséquence, les mycotoxines peuvent être classées en quatre grandes catégories : les polycétoacides, les peptides cycliques non-ribosomiques, les terpènes et les hybrides.

Les espèces fongiques étant productrices de divers métabolites secondaires présentent les différentes voies de biosynthèses dans leur métabolisme. La Figure 2 et Tableau 2 présentent les différentes origines métaboliques des différentes mycotoxines.

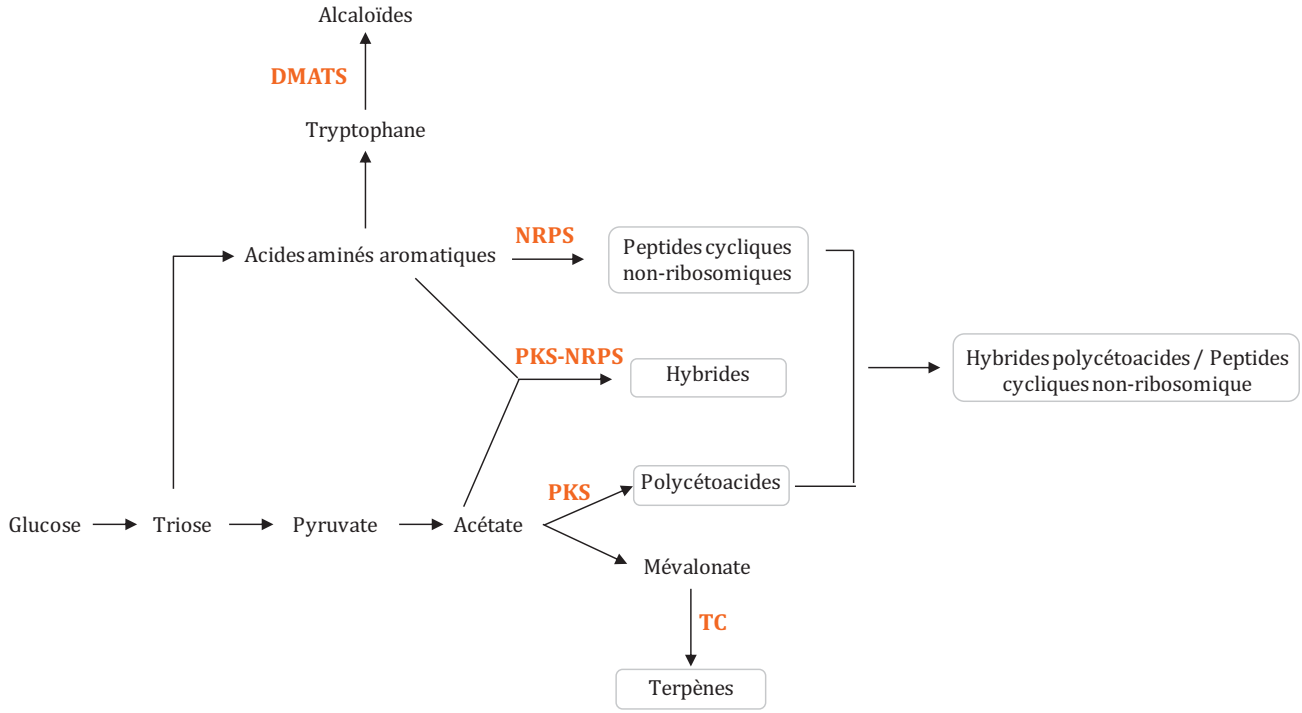


Figure 2 : Origines métaboliques des différentes mycotoxines
Les mycotoxines peuvent être classées en quatre catégories (peptides cycliques non-ribosomiques, polycétoacides, terpènes et hybrides) qui sont toutes métabolisées à partir du glucose. Abréviations : NRPS, non-ribosomal peptide synthétase ; PKS, polycétide synthase ; TC, terpènes cyclase ; DMAST, diméthyl ally transférase.

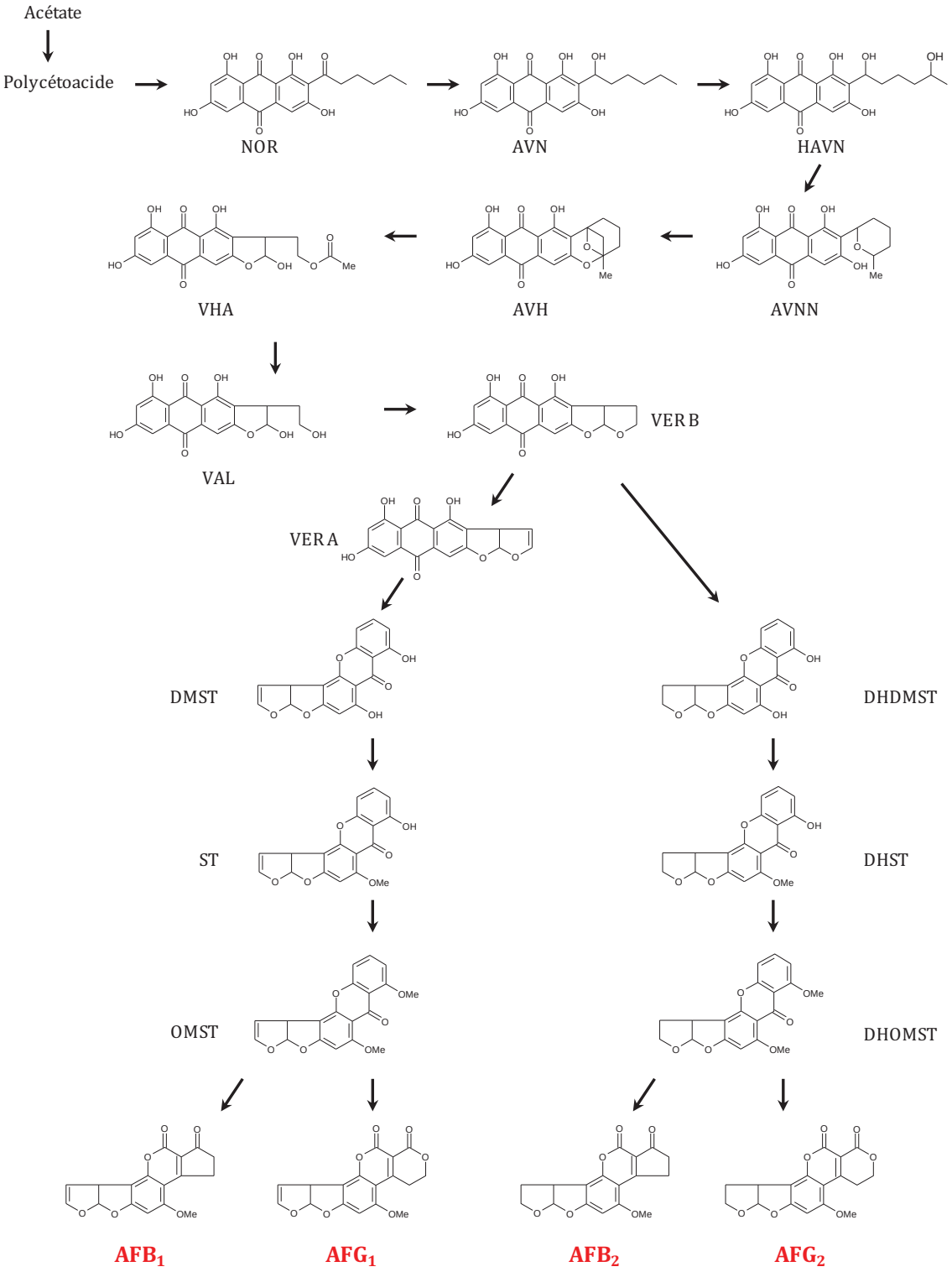


Figure 3 : Voie de biosynthèse des aflatoxines

Abréviations : NOR, acide norsolorinique ; AVN, averantine ; HAVN, 5'-hydroxy-averantine ; AVNN, averufanine ; AVF, averufine ; VHA, versiconal hémiacétal acétate ; VAL, versiconal ; VER B, versicolorine B ; VER A, versicolorine A ; DMST, déméthylstérigmatocystine ; DHDMST, dihydro déméthylstérigmatocystine ; ST, stérigmatocystine ; DHST, dihydrostérigmatocystine ; OMST, O-méthyl stérigmatocystine ; DHOMST, dihydro-O-méthyl stérigmatocystine ; AFB_1, aflatoxine B_1 ; AFB_2, aflatoxine B_2 ; AFG_1, aflatoxine G_1 ; AFG_2, aflatoxine G_2.

Tableau 2 : Catégories moléculaires des mycotoxines majeures
Adapté et modifié de Bu'Lock (1980)

Catégorie moléculaire	Mycotoxines
Polycétides	
Di-	moniliformine
Tétra-	patuline, acide pénicillique
Penta-	citrinine, ochratoxines
Hexa-	maltoryzine
Hepta-	rugulosine, viriditoxine
Octa-	ergochromes
Nona-	fumonisines, zearalénone
Déca-	aflatoxines
Terpènes	
Mono-	viridicatumtoxine
Sesqui-	trichothécènes
Di-	aflatrème, lolitrème, pénitrèmes
Peptides	ergotamine, tryptoquivalines, gliotoxine, verruculogene
Hybrides	Ochratoxine A, acide cyclopiazonique

A la différence des toxines bactériennes majoritairement de nature protéique, les mycotoxines sont le produit final d'une cascade de réactions enzymatiques. Les voies de biosynthèse sont longues et complexes et d'un point de vue moléculaire, toutes les enzymes impliquées fonctionnent au même moment de façon à ce que les nouveaux intermédiaires synthétisés soient pris en charge tour à tour par l'enzyme suivante jusqu'à la synthèse d'un métabolite qui ne sera plus transformé : la mycotoxine. L'exemple de la voie de biosynthèse des aflatoxines est présenté en Figure 3.

Ce phénomène est rendu possible car les gènes codant pour ces enzymes sont soumis à une co-activation due à l'organisation même de ces gènes en cluster au sein du génome de l'organisme producteur. Ces clusters de gènes sont généralement positionnés dans les régions sub-télomériques des chromosomes qui présentent un haut degré d'hétérochromatine (Keller and Hohn 1997; Palmer and Keller 2010).

Les champignons filamenteux produisent un grand nombre de métabolites secondaires, tels que les mycotoxines et les antibiotiques. La recherche de clusters par l'utilisation d'outils informatiques dans les génomes actuellement séquencés témoigne de la richesse du métabolisme secondaire des champignons filamenteux. En 2010, Khaldi et al. ont développé un logiciel informatique permettant de prédire la présence de clusters de gènes dans les génomes entièrement séquencés (Khaldi et al. 2010). Le SMURF, Secondary Metabolite Unknown Region Finder, permet actuellement de rechercher la présence de clusters de gènes dans 27 génomes de champignons filamenteux.

La présence d'un cluster de gènes ne signifie pas systématiquement que l'espèce fongique est capable de synthétiser le métabolite secondaire correspondant. En effet, certains clusters peuvent être détectés mais se trouver à l'état de "squelette", c'est à dire sans la totalité des gènes codant pour toutes les enzymes d'une voie de biosynthèse, et ne permettent donc pas la synthèse. L'analyse par bioinformatique ne permet donc pas de prédire de façon certaine le nombre de familles de métabolites secondaires produits par une espèce fongique, elle doit être accompagnée d'analyses de génétique et de métabolomique. Le Tableau 3 présente les résultats d'analyses réalisées grâce au logiciel SMURF sur 11 génomes de champignons filamenteux. Ce tableau, illustre bien la diversité des métabolites secondaires potentiellement produits par les différences espèces fongiques analysées.

Tableau 3 : Analyse SMURF des génomes de divers champignons filamenteux
La première colonne correspond au nombre de cluster détectés par SMURF (Khaldi et al. 2010), les colonnes suivantes correspondent aux différents types de cluster retrouvés. PKS, polycétide synthase ; NRPS, non-ribosomal peptide synthétase ; DMATS, dimethyl ally transferase.

	Nombre de cluster	**PKS**	**NRPS**	**Hybride PKS-NRPS**	**DMATS**
Aspergillus fumigatus	33	13	13	1	6
Neosartorya fisheri	45	17	19	0	9
Aspergillus clavatus	33	15	11	4	3
Aspergillus flavus	53	25	18	2	8
Aspergillus terreus	58	28	19	1	10
Aspergillus nidulans	43	24	10	1	6
Aspergillus niger	67	38	17	4	2
Penicillium chrysogenum	42	21	8	2	1
Fusarium graminearum	26	15	10	1	0
Fusarium verticillioides	29	11	5	1	1
Fusarium oxysporum	28	9	7	2	2

Un grand nombre de clusters de gènes associés au métabolisme secondaire sont identifiés. Le plus célèbre d'entre eux est celui de la voie de biosynthèse des aflatoxines (Figure 4) où les 30 gènes le composant ont été caractérisés chez *Aspergillus flavus* et chez *Aspergillus* parasiticus (Yu et al. 1995; Yu et al. 2004; Yu 2012). Le cluster de la voie de biosynthèse de la stérigmatocystine, un intermédiaire de la production d'aflatoxines, chez *Aspergillus nidulans* partage 16 gènes avec celui de la voie de biosynthèse des aflatoxines mais organisés différemment (Brown et al. 1996). Le cluster de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des trichothécènes est lui aussi entièrement caractérisé (Kimura et al. 2007). Une partie du cluster de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'ochratoxine A a été caractérisée chez *Penicillium nordicum* (Karolewiez and Geisen 2005) et le cluster de gènes de la voie de biosynthèse des fumonisines a été identifié chez *Fusarium verticillioides* (Seo et al. 2001; Proctor et al. 2003; Bojja et al. 2004; Proctor et al. 2013).

2. Les facteurs de transcription spécifiques

Généralement, à l'intérieur du cluster se trouvent des gènes codant pour les enzymes responsables de réactions chimiques telles que des oxydoréductions, déshydrogénations, décarboxylations, un ou plusieurs gènes impliqués dans le transport des métabolites secondaires et un ou plusieurs gènes impliqués dans la régulation de la transcription des gènes du cluster.

Les gènes codant pour ces facteurs de transcription sont généralement des activateurs qui, en réponse à un stimulus, activeront tous les autres gènes du cluster et donc enclencheront la production de métabolites secondaires. La Figure 4 présente l'exemple du cluster de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des aflatoxines où le gène *aflR* code pour le facteur de transcription spécifique.



Figure 4 : Cluster de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des aflatoxines chez *Aspergillus flavus*
Le sens des flèches représente le sens de transcription pour chacun des gènes du cluster. Le gène *aflR* présenté en rouge code pour le facteur de régulation spécifique de la voie de biosynthèse des aflatoxines.

On notera que la présence d'un facteur de régulation dans un cluster de voie de biosynthèse n'est pas systématique puisqu'il existe des clusters ne contenant pas de facteur de régulation. De plus, il est possible que des facteurs de transcription régulent une voie de biosynthèse alors que le gène codant pour celui-ci est situé hors du cluster. C'est par exemple le cas pour la biosynthèse des fumonisines chez *Fusarium verticillioides* : lorsque le gène *ZFR1* codant pour un facteur de transcription à doigt de zinc Cys6 est délété le champignon présente une croissance normale mais une production de fumonisines réduite de 90 % (Flaherty and Woloshuk 2004). Une étude plus récente révèle la présence de clusters de gène "entremêlés", partageant ainsi le même facteur de transcription. Dans cette étude réalisée chez *Aspergillus fumigatus*, la mutation du gène *FapR,* codant pour une facteur de transcription à doigt de zinc de type Cys6, cause une extinction des voies de biosynthèse de la fumagilline et de la pseurotine (Wiemann et al. 2013).

Ces facteurs de transcription sont des protéines qui régulent l'expression des gènes en se liant de façon spécifique aux promoteurs des gènes concernés. Plusieurs études de comparaison de séquences ont révélé que la plupart des facteurs de transcription pouvaient être classés, dans différentes familles, sur la base de la similarité de leurs séquences protéiques dans un nombre restreint de familles protéiques : les protéines à doigt de zinc, les protéines dites hélice-tour-hélice et les leucines zippers. Néanmoins, chez les champignons filamenteux la classe de facteurs

de régulation la plus représentée au sein des clusters de gènes est celle des protéines à doigt de zinc (Todd and Andrianopoulos 1997).

Les doigts de zinc sont des domaines protéiques composés de 30 à 50 acides aminés selon leur type et qui fonctionnent toujours par paire. En effet, il existe trois types de doigt de zinc dit Cys_2His_2, Cys_4 ou Cys_6 (où Cys représente un résidu cystéine et His un résidu histidine). Les différents résidus sont coordonnés entre eux par des atomes de zinc ionisés (Zn^{2+}) donnant ainsi la forme de doigt au domaine de fixation à l'ADN.

Le motif en doigt de zinc Cys_6 est un domaine de liaison à l'ADN retrouvé chez les facteurs de transcription des levures et des champignons filamenteux. Il présente comme séquence consensus : Cys-X_2-Cys-X_6-Cys-X_{5-9}-Cys-X_2-Cys-X_{6-7}-Cys (Coleman 1992). Les six résidus de cystéine s'organisent autour de deux ions Zn^{2+} en formant une structure en forme de feuille de trèfle. Ce motif peut être considéré comme une répétition de deux unités de Cys-X_2-Cys-X_6-Cys séparé en moyenne par six résidus (X_{5-9}). Chacune de ces unités forme une petite structure en hélice α séparée par une boucle de proline. La fixation à l'ADN par ce type de protéines se fait sur des séquences spécifiques et généralement sous forme de dimères (Todd and Andrianopoulos 1997). Ce motif Cys_6 a été identifié sur plus de 80 protéines retrouvées principalement chez les champignons. Ces protéines ont été identifiées chez un grand nombre d'ascomycètes, tels que : *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces carlsbergensis, Candida albicans, Neurospora crassa*, plusieurs espèces d'*Aspergillus* mais chez un seul basidiomycète, *Lentinus edodes* (Todd and Andrianopoulos 1997).
Ces protéines à doigt de zinc de type Cys_6 sont généralement des activateurs transcriptionnels, mais pas exclusivement, puisque chez *Saccharomyces cerevisiae,* les protéines à doigt de zinc ARGR2, LEU3 et UME6 jouent à la fois le rôle d'activateur et de répresseur (Bechet et al. 1970; Messenguy and Dubois 1988; Strich et al. 1994; Rubin-Bejerano et al. 1996).

Le facteur AFLR, impliqué dans la voie de biosynthèse des aflatoxines, est certainement un des facteurs de transcription le plus largement étudié.
La voie de biosynthèse des aflatoxines comporte au moins 17 étapes enzymatiques dont la plupart d'entre elles sont codées par des gènes se trouvant dans un cluster de 80 kb (Yu 2012). Plusieurs études ont démontré que le gène *aflR* est nécessaire pour la transcription des gènes se trouvant dans le cluster d'*Aspergillus parasiticus* (Chang et al. 1993; Payne et al. 1993; Woloshuk et al. 1994). Ce gène code pour une protéine Zn_2Cys_6, AFLR, qui possède un site de liaison à l'ADN et un site d'activation qui sont typiquement retrouvés dans la famille des facteurs de régulation positifs chez les levures et les champignons filamenteux. Ces protéines qui possèdent un domaine Zn_2Cys_6 représentent une classe importante des facteurs de transcriptions positifs

nécessaires pour l'expression de différents gènes dans un cluster (Todd and Andrianopoulos 1997). AFLR a été la première protéine à doigt de zinc identifiée comme impliquée dans la régulation d'une voie de biosynthèse et les premiers résultats ont montré que la protéine AFLR se fixait dans la région promotrice de plusieurs gènes du cluster de biosynthèse de l'aflatoxine chez *Aspergillus parasiticus*. De plus, il a aussi été démontré que la protéine AFLR se fixait aussi sur son propre promoteur suggérant que le gène *aflR* s'autorégule (Chang et al. 1993). Finalement, une région de 11 paires de bases, 5'-TCGN$_5$CGA-3', reconnue par la protéine AFLR a été identifiée chez *Aspergillus nidulans* (Fernandes et al. 1998). C'est dans une étude d'Ehrlich et al. (1999b), qu'il a été démontré que ce motif était présent dans les régions promotrices de 8 gènes impliqués dans la biosynthèse de l'aflatoxine sur les 11 étudiés chez *Aspergillus parasiticus* (Ehrlich et al. 1999b). La caractérisation plus précise du promoteur du gène *aflR* par l'utilisation du gène rapporteur de la ß-glucuronidase a mis en évidence la présence d'un régulateur positif de la transcription dans la région -100 à -118 pb. De plus, cette région comporte un palindrome de 10 paires de bases, riche en purine, qui pourrait correspondre au site de fixation de la protéine AFLR. Finalement, cette même étude a démontré que la protéine AFLR, ainsi que d'autres, pouvaient se fixer sur cette région. De même, Price et al. (2006) ont démontré que ce même facteur de transcription régule l'expression de trois gènes se situant à l'extérieur du cluster de gènes de la voie de biosynthèse de l'aflatoxine, ces trois gènes présentent un site de fixation pour la protéine AFLR. Ces trois gènes, *nadA*, *hlyC* et *niiA* sembleraient coder respectivement pour une NADH oxydase, une nitrite réductase et une hémolysine (Price et al. 2006).

3. Les autres facteurs de transcription

La production de métabolites secondaires est aussi contrôlée par d'autres facteurs de transcription dits facteurs de transcription globaux. Ces facteurs de transcription régulent non seulement la production de métabolites secondaires mais aussi les différents états physiologiques du champignon filamenteux en réponse à divers stimuli extérieurs tels que le pH, la température, la lumière ou encore la nature du substrat. Les signaux générés en réponse à ces stimuli sont relayés par des protéines de type doigt de zinc, telles que CreA en réponse au carbone (Dowzer and Kelly 1989), AreA en réponse à l'azote (Hynes 1975) et PacC en réponse aux variations de pH (Tilburn et al. 1995). Par exemple, la production de pénicilline est positivement régulée par CreA et négativement régulée par PacC chez *Penicillium chrysogenum* et chez *Aspergillus nidulans* (Martin 2000). Pour citer d'autres exemples, la production de trichothécènes par *Fusarium graminearum* est régulée négativement par PacC (Merhej et al. 2011), et AreA est indispensable pour la production de fumonisine B_1 chez *Fusarium verticillioides* (Kim and Woloshuk 2008).

A ce jour, la voie de biosynthèse des aflatoxines est certainement la plus documentée concernant l'implication de ces facteurs de transcription. Des sites de fixation pour AreA ont été trouvés dans les séquences intergéniques du cluster de gènes de la voie de biosynthèse des aflatoxines chez *Aspergillus parasiticus* (Chang et al. 2000). Cette même étude démontre que la simple fixation de AreA sur ces sites est suffisante pour activer la transcription des gènes cibles. Plusieurs études démontrent que PacC est un régulateur négatif de l'expression des gènes du cluster de la synthèse de stérigmatocystine, et que son expression constitutive réprime l'expression de ces mêmes gènes (Keller et al. 1997a). Enfin, la production d'aflatoxines et de stérigmatocystine est augmentée en présence de glucose faisant de CreA un régulateur positif (Dowzer and Kelly 1989; Dowzer and Kelly 1991).

De plus en plus d'études décrivent la modulation du métabolisme secondaire par le stress oxydatif témoignant ainsi de l'intérêt porté à l'étude de la régulation des voies de biosynthèses des métabolites secondaires chez les champignons filamenteux. Par exemple, la production d'aflatoxine chez *Aspergillus parasiticus* (Jayashree and Subramanyam 2000; Reverberi et al. 2008), d'ochratoxine A chez *Aspergillus ochraceus* (Reverberi et al. 2012) et des trichothécènes de type B chez *Fusarium graminearum* sont stimulées par le stress oxydatif (Ponts et al. 2006).

La régulation de la production des métabolites secondaires fongiques en réponse au stress oxydatif est associée à l'action de plusieurs facteurs de transcription. A titre d'exemple nous pouvons citer *msnA* qui est impliqué dans ce type de régulation chez des espèces du genre *Aspergillus.* Chez *Aspergillus flavus* et *Aspergillus nidulans*, le gène *msnA* semble être nécessaire pour le maintien d'un état rédox normal. Cette hypothèse est supportée par le fait que les gènes codant pour les enzymes impliquées dans la défense contre le stress oxydatif (superoxide dismutase, catalase, cytochrome C oxydase) sont surexprimés dans les souches mutante pour ce gène (Chang et al. 2011). Dans une souche d'*Aspergillus parasiticus* mutée pour le gène *msnA* la production d'aflatoxine est stimulée (Chang et al. 2011).

La Figure 5 présente les éventuelles connections entre les signaux environnementaux et les éléments régulateurs impliqués dans différents mécanismes de régulation du métabolisme secondaire.

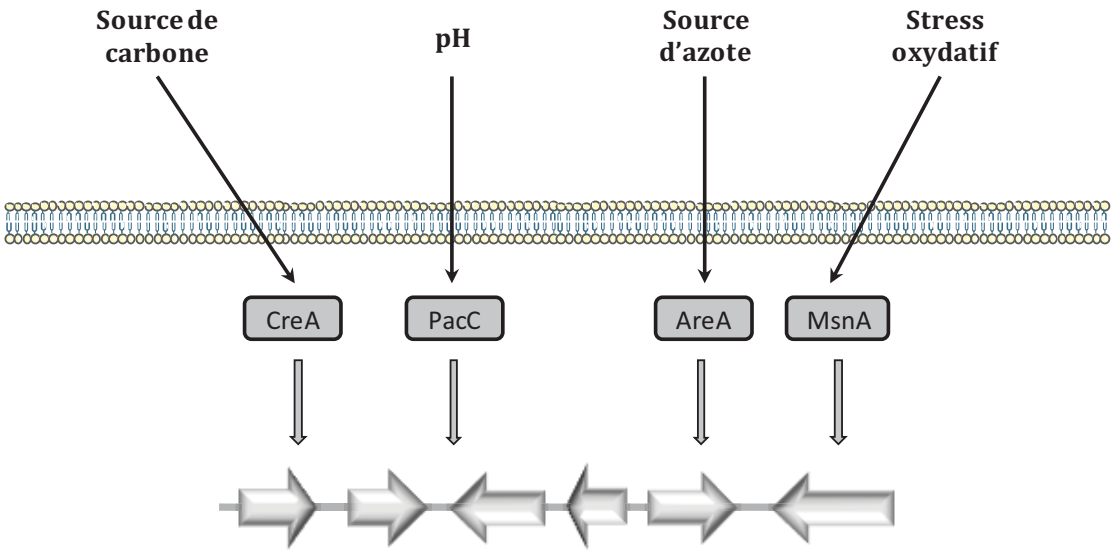


Figure 5 : Signaux environnementaux et éléments régulateurs impliqués dans les mécanismes de régulation du métabolisme secondaire dans différentes espèces fongiques
Les signaux environnementaux peuvent influencer la régulation des clusters de gènes de différents métabolites secondaires via des protéines régulatrices. Adaptée et modifiée de Brakhage (2013).

III. La régulation par la lumière et le complexe velvet chez les champignons filamenteux

Les champignons filamenteux, contrairement aux plantes, utilisent la lumière comme une source d'informations et non comme une source d'énergie. Une étude de Marsh et al. (1959) a montré qu'au moins une centaine d'espèces fongiques réagissait à la lumière. De nombreuses expériences sur différentes espèces de champignons ont démontré qu'ils étaient sensibles à un large spectre de lumière, en particulier aux lumières bleue et rouge qui provoquent des effets importants sur la croissance (Mooney and Yager 1990; Purschwitz et al. 2006). Les champignons possèdent un système de perception à la lumière via des molécules photoréceptrices qui sont capables d'induire une réponse transcriptionelle impactant les différents processus métaboliques de la cellule. Ce système est aussi capable de réguler la localisation du gène velvetA (veA), le composant principal du complexe velvet qui régule le developpement et le métabolisme secondaire chez les champignons.

Chez les ascomycètes, les deux organismes modèles *Neurospora crassa* et *Aspergillus nidulans* ne présentent pas les mêmes réponses aux différentes lumières du spectre. *Neurospora crassa* est plus sensible à la lumière bleue alors que *Aspergillus nidulans* répond principalement à la lumière rouge.

1. Le système de perception de la lumière et l'horloge circadienne

La réponse à la lumière bleue chez *Neurospora crassa* a largement été étudiée : la lumière bleue stimule la synthèse de caroténoïdes, la formation de protopérithèces et de macroconidies (photoconidiation), et impacte aussi le rythme circadien (Linden and Macino 1997). Ces différentes réponses dépendent toutes de la présence des protéines white collar-1 (WC-1) et white collar-2 (WC-2) qui sont des facteurs de transcription impliqués dans la régulation par la lumière. La protéine WC- 1 est le plus ancien et le premier photorécepteur fongique à avoir été décrit et présente plusieurs domaines caractéristiques (Ballario et al. 1996). Un domaine LOV (pour light-oxygen-voltage) qui interagit avec une molécule de flavine, deux domaines PAS (*Drosophila* period, **P**er – vertebrate aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, **A**rnt – *Drosophila* single minded, **S**im) et un domaine de fixation à l'ADN de type doigt de zinc. C'est en fixant une molécule de flavine (FAD, flavine-adenine dinucleotide) par le biais du domaine LOV que WC-1 agit comme un photorécepteur à la lumière bleue (Froehlich et al. 2002). Chez *Neurospora crassa* WC- 1 interagi avec WC-2 qui contient un domaine PAS et aussi un domaine de fixation à l'ADN de type doigt de zinc. Cette interaction se fait via les domaines PAS des deux molécules. A la lumière, le complexe formé par WC- 1 et WC-2, le White Collar Complex (WCC) se fixe aux promoteurs de plusieurs gènes inductibles à la lumière et active leur transcription.

Notamment, le WCC induit l'expression du gène *frq* qui code pour la protéine FREQUENCY, composante centrale du mouvement oscillatoire de l'horloge circadienne chez *Neurospora crassa* (Aronson et al. 1994; Crosthwaite et al. 1995). Le WCC active l'expression d'un certain nombre de gènes dépendant de l'horloge circadienne, les clock-circadian-genes (*ccgs*). Une fois perçue la lumière entraine l'horloge (Figure 6).

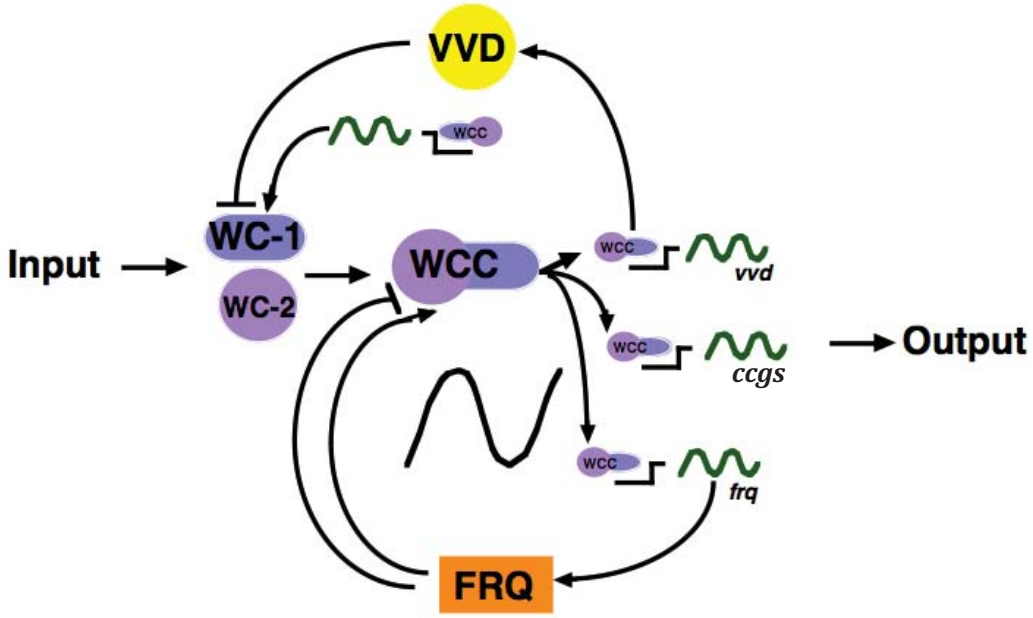


Figure 6 : L'horloge circadienne chez *Neurospora crassa*
La perception de la lumière induit la formation du complexe transcriptionel WC-1/WC-2. A son tour il induit l'expression de certains gènes comme *vvd* et *frq* qui sont des composantes centrales du mouvement oscillatoire de l'horloge circadienne. FRQ interagit directement avec WCC pour réprimer son activité et agit positivement en déclenchant l'expression de *wc-1* formant ainsi une boucle interconnectée de rétrocontrôle. VVD agit dans une autre boucle de rétrocontrôle qui régule négativement la voie de signalisation par la lumière au travers d'un contrôle négatif de WC-1 (Heintzen et al. 2001).

La capacité d'adaptation à l'intensité de la lumière a été étudiée chez quelques champignons. Chez *Neurospora crassa*, ce procédé est régulé par la protéine VIVID (VVD), un capteur de lumière bleue présentant un domaine LOV qui permet l'interaction avec une molécule de flavine. VVD est exprimée exclusivement en présence de lumière et sous le contrôle transcriptionel du WCC. A son tour, une fois activé, VVD régule l'activité transcriptionelle du WCC. C'est cette boucle de rétrocontrôle négatif qui est au centre de l'adaptation à l'intensité de la lumière (Heintzen et al. 2001; Schwerdtfeger and Linden 2003).

Très peu de protéines homologues de VVD ont été retrouvées chez d'autres champignons (Rodriguez-Romero et al. 2010). Toutefois, *Hypocrea jecorina* (autrefois appelé *Trichoderma reesei*) présente une protéine orthologue à VIVID de *Neurospora crassa*, la protéine

ENJOY. Cependant elle fonctionne d'une manière différente de VIVID et ne permet pas la complémentation d'un mutant du gène *vivid* chez *Neurospora crassa* (Schmoll et al. 2005). Le gène qui code pour ENJOY est un gène inductible à la cellulose mais qui peut aussi l'être par la lumière.

D'autres protéines photoréceptrices homologues aux proteines White Collar de *Neurospora crassa* ont été identifiées chez *Trichoderma atroviride* (Casas-Flores et al. 2006), *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei)* (Schmoll et al. 2005) et *Aspergillus nidulans* (Purschwitz et al. 2008).

Plusieurs gènes orthologues des photorécepteurs de *Neurospora crassa* ont été décrits chez *Aspergillus nidulans* (Bayram et al. 2010) : un phytochrome, FphA, récepteur à la lumière rouge est responsable de la répression de la formation des organes de fructification et de l'induction de la conidiation en présence de lumière rouge (Blumenstein et al. 2005), un homologue de WC-1, LreA et un homologue de WC-2, LreB (Purschwitz et al. 2008) (Figure 7).

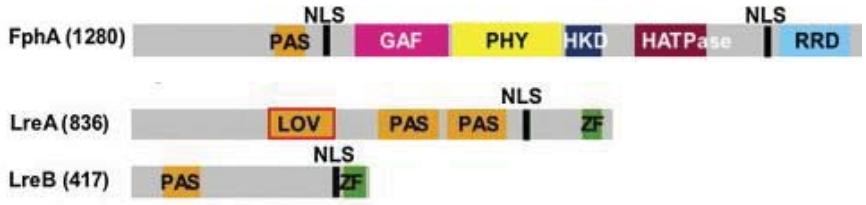


Figure 7 : Représentation schématique des différents domaines des protéines FphA, LreA et LreB d'*Aspergillus nidulans.*
Abréviations : PAS : Drosophila period, Per – vertebrate aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, Arnt – Drosophila single minded, Sim ; NLS : séquence de localisation nucléiare ; GAF : domaine de fixation de petit ligand ; PHY : domaine phytochrome ; HKD : domaine histidine kinase ; HATPase : domaine ATPase ; RRD : domaine régulateur de réponse ; LOV : domaine lumière, oxygène, voltage ; ZF : doigt de zinc, d'après Purschwitz et al. (2008).

Il a été démontré que le phytochrome FphA faisait partie d'un complexe composé aussi de LreA et LreB. Les travaux de Purschwitz et al. (2008 et 2009) ont montré que LreA et LreB interagissent ensemble, que FphA interagit directement avec LreB mais aussi avec VeA, un autre régulateur impliqué dans la régulation par la lumière et dans la production de mycotoxines. Malgré la présence de ces protéines dans le cytoplasme, ces interactions ne sont possibles que lorsque les protéines sont localisées dans le noyau (Blumenstein et al. 2005; Stinnett et al. 2007). L'interaction FphA-VeA est dépendante de la présence d'un chromophore tetrapyrrole lié à FphA alors que l'interaction FphA-LreB est indépendante de la présence d'un chromophore. Enfin, LreA et LreB n'interagissent pas directement avec VeA mais au travers de FphA qui joue le

rôle de pont (Figure 8). Ces mêmes travaux ont aussi démontré que FphA réprime la reproduction sexuée et la production de stérigmatocystine alors que LreA et LreB les stimulent.

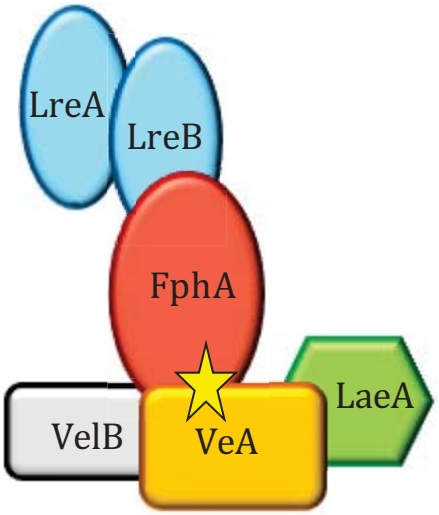


Figure 8 : Modèle de liaison du complexe velvet aux récepteurs de lumière chez *Aspergillus nidulans*.
LreA et LreB intéragissent ensemble via leurs domaines PAS. FphA interagit directement avec LreB et VeA. La région de liaison via le chromophore (représenté par l'étoile jaune) est essentielle pour le maintien de l'interaction entre FphA et VeA. L'interaction entre le complexe LreA/LreB (homologue au WCC de Neurospora crassa) et FphA est indépendante du chromophore. D'après Calvo (2008).

Globalement, les études de Purschwitz et al. (2008 et 2009) permettent d'affirmer que la perception des lumières bleue et rouge se déroule dans le même complexe protéique au niveau du noyau. L'étude de Stinnett et al. (2007) démontre que VeA est localisé dans le noyau en absence de lumière et que sa présence diminue en présence de lumière. A ce jour, aucun élément prouvant que VeA est capable de réagir à la lumière pat lui-même Purschwitz et al., (2008 et 2009) suggèrent que la localisation de VeA dépend de la présence de FphA. Par conséquent, les deux systèmes de perception aux lumières bleue et rouge sont nécessaires pour la localisation nucléaire de VeA.

2. La régulation par VeA

La caractérisation du gène *velvet, veA,* a débuté il y a 50 ans lorsque E. Käfer a obtenu le premier mutant chez *Aspergillus nidulans, veA1,* présentant un phénotype velouté (Käfer 1965). Ce mutant était affecté dans sa reproduction sexuée et présentait une sporulation excessive. Plus tard, il a été démontré que chez une souche sauvage, présentant un gène *veA* fonctionnel, la lumière rouge induisait la formation de conidiospores alors que ce n'était pas le cas chez le mutant *veA1* (Mooney and Yager 1990). En conséquence, le facteur VeA a été considéré comme étant un régulateur négatif de la reproduction asexuée d'une manière dépendante à la lumière

(Yager 1992). Finalement en 2002, le rôle de VeA dans le développement a été étudié par Kim et al. (2002) qui ont démontré que la délétion du gène *veA* empêchait la formation des organes de fructification même dans des conditions favorables au développement sexué. L'effet opposé est observé lorsque *veA* est surexprimé, il y a induction de la formation des organes de fructification accompagnée d'une réduction de la sporulation même dans des conditions favorables au développement asexué. En conclusion, *veA* est à la fois un régulateur positif de la reproduction sexuée et un régulateur négatif de la reproduction asexuée.

Une étude de Kato et al. (2003) a démontré que VeA jouait un rôle dans l'expression du gène *brlA* codant pour un facteur de transcription impliqué dans le développement asexué d'*Aspergillus nidulans*. Le facteur de transcription RosA (Vienken et al. 2005) et la protéine codée par le gène *lsdA* (Lee et al. 2011) impliqués dans le régulation du développement sexué chez *Aspergillus nidulans* sont également sous le contrôle de VeA. *esdC*, un autre gène dépendant de VeA est exprimé lors des premières étapes du développement sexué chez *Aspergillus nidulans* (Han et al. 2008). Enfin, VeA est nécessaire pour l'expression des gènes *ppo* codant pour des oxylipines endogènes nommés « facteurs psi » impliqués dans la balance entre le développement sexué et asexué (Tsitsigiannis et al. 2004).

Des gènes orthologues au gène *veA* ont été identifiés chez d'autres champignons filamenteux. Chez *Aspergillus flavus* la délétion de *veA* provoque une sporulation excessive (Duran et al. 2007) alors que chez *Aspergillus parasiticus* la sporulation est fortement réduite (Calvo et al. 2004). Par contre ces deux mutants sont affectés dans leur capacité à former des sclérotes. Chez *Fusarium verticillioides*, la délétion de *FvVE1* bloque le développement du mycélium aérien, diminue l'hydrophobicité des colonies en milieu solide et augmente le ratio macroconidies/microconidies (Li et al. 2006). Chez *Fusarium graminearum*, la délétion de *FgVe1* provoque la suppression du développement du mycélium aérien accompagné d'une diminution de l'hydrophobicité des colonies, cause un hyperbranchement du mycélium et réduit fortement la sporulation (Merhej et al. 2012). Chez *Neurospora crassa*, la délétion de *ve-1* conduit à un raccourcissement du mycélium, une ramification anormale et rend la sporulation indépendante de la lumière (Bayram et al. 2008b). Enfin, chez *Penicillium chrysogenum,* la délétion de *PcVelA* entraine une sporulation équivalente lors d'une incubation dans le noir ou dans la lumière et induit une ramification anormale du mycélium (Hoff et al. 2010).

Malgré sa forte conservation chez les différentes espèces fongiques VeA présente des rôles différents, reflétant ainsi la diversité des modes de développement des champignons.

Un rôle dans la régulation du métabolisme secondaire lui a aussi été attribué. L'expression des gènes impliqués dans la synthèse des métabolites secondaires, communément retrouvés en cluster sont affectés par VeA (Kato et al. 2003; Duran et al. 2007; Calvo 2008; Cary

and Calvo 2008). Kato et al. (2003) ont démontré que chez *Aspergillus nidulans* VeA régule l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de stérigmatocystine. En effet, il est nécessaire pour la synthèse d'AFLR, le facteur de transcription spécifique à la voie de biosynthèse de cette mycotoxine (Chang et al. 1993; Payne et al. 1993; Flaherty and Payne 1997). De la même manière, chez *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus flavus,* les gènes *veA* sont nécessaires pour la transcription d'*aflR* et de *aflJ,* un autre facteur de transcription largement caractérisé chez *Aspergillus flavus* (Meyers et al. 1998; Du et al. 2007). D'autres études révèlent que *veA* est nécessaire pour la synthèse d'autres métabolites secondaires tels que l'acide cyclopiazonique et l'aflatrème chez *Aspergillus flavus* (Duran et al. 2007), la pénicilline chez *Aspergillus nidulans* (Kato et al. 2003) ou chez *Penicillium chrysogenum* (Hoff et al. 2010) ou les trichothécènes chez *Fusarium graminearum* (Merhej et al. 2012). Dans cette dernière étude il a aussi été démontré que FgVe1 est un régulateur positif de la virulence de *Fusarium graminearum.* Chez *Fusarium verticillioides,* FvVE1 est nécessaire non seulement pour la production de fumonisines mais aussi pour provoquer l'infection des plants de maïs par le champignon (Myung et al. 2012).

Caractérisé chez *Aspergillus nidulans*, le gène *veA* code pour une protéine de 573 acides aminés présentant à son extrémité N-terminale un domaine conservé retrouvé chez les champignons (Bayram et al. 2008a) ainsi qu'une séquence de localisation nucléaire (NLS) (Stinnett et al. 2007). A son extrémité C-terminale se trouve un domaine PEST (riche en proline, acide glutamique, serine et thréonine) (Kim et al. 2002). Ce domaine PEST est aussi retrouvé chez des protéines orthologues de VeA chez *Aspergillus parasiticus, Aspergillus fumigatus* et *Neurospora crassa* (Bayram et al. 2008b).

Stinnett et al., (2007) ont étudié la localisation intracellulaire de VeA. Cette étude démontre que cette localisation est dépendante de la lumière. Dans le noir, VeA est principalement localisé dans le noyau alors qu'en présence de lumière, VeA est majoritairement retrouvé dans le cytoplasme. Chez le mutant *veA1* (Käfer 1965) VeA est majoritairement retrouvé dans le cytoplasme de manière indépendante à la lumière. Chez ce mutant, la présence d'une mutation sur le codon d'initiation de la transcription conduit à une protéine tronquée où les 36 premiers acides aminés sont manquants et donc ne possède pas de séquence de localisation nucléaire (NLS) fonctionnelle, expliquant ainsi la localisation cytoplasmique de VeA. Dans cette même étude, il est démontré que le transfert de VeA dans le noyau dépend de l'importine α KapA et qu'une NLS fonctionnelle est indispensable, celle-ci permettant l'interaction de ces deux protéines.

3. Le complexe Velvet

Afin d'identifier les protéines interagissant avec VeA, Bayram et al., (2008a) ont utilisé la technique de purification par affinité (TAP : Tandem Affinity Purification) à partir d'une souche d'*Aspergillus nidulans* exprimant une protéine VeA couplé à une étiquette TAP-tag à l'extrémité C-terminale. Dans le noir, les protéines VelB (*velvet-like*), LaeA et l'importine α KapA interagissent avec VeA. A l'inverse, en présence de lumière seul VelB interagit avec VeA. Par la technique du double hybride chez la levure, les analyses confirment les interactions VeA-VelB et VeA-LaeA : par contre aucune interaction n'est mise en évidence entre LaeA et VelB suggérant ainsi que VeA agit comme un pont entre ces deux protéines. De plus, les analyses par fluorescence ont montré que l'interaction VeA-LaeA a lieu dans le noyau, alors que VeA et VelB interagissent dans le noyau et le cytoplasme. LaeA étant toujours localisé dans le noyau, son interaction avec VeA est nucléaire : VelB doit donc pouvoir rentrer dans le noyau malgré l'absence de NLS dans sa séquence. Bayram et al. (2008a) ont donc démontré que VeA assiste VelB pour rentrer dans le noyau afin de former le complexe Velvet.

Le gène *laeA* (loss of *aflR* expression A) a été identifié en 2004 chez *Aspergillus nidulans* (Bok and Keller 2004). La délétion de ce gène empêche l'expression du gène *aflR* codant pour le facteur de transcription spécifique de la voie de biosynthèse de la stérigmatocystine. La protéine LaeA présente un domaine de fixation S-adenosyl-methionine (SAM) (Bok et al. 2006) qui est présent chez tous les membres de la superfamille des méthylases, incluant les histones méthyl-transférases impliquées dans les modifications de la structure de la chromatine et la régulation épigénétique. L'organisation en cluster des gènes impliqués dans le métabolisme secondaire facilite le mécanisme de régulation basé sur la structure de la chromatine. L'étude de Reyes-Dominguez et al. (2010) démontre que la forte concentration de HepA (protéine responsable de la répression de l'expression des gènes par formation d'hétérochromatine) est associée au *silencing* du cluster de gènes de la voie de biosynthèse de la stérigmatocystine et que LaeA joue un rôle en contrecarrant la formation d'hétérochromatine durant la production de stérigmatocystine. LaeA serait donc une méthyl-transférase qui modifie la méthylation de l'ADN et donc la structure de la chromatine afin de permettre l'accès aux facteurs de transcription aux régions promotrices des gènes. LaeA est donc un régulateur épigénétique global du métabolisme secondaire. Des gènes orthologues de *laeA* sont retrouvés chez d'autres champignons et sont aussi impliqués dans la régulation du métabolisme secondaire (Hoff et al. 2010; Wiemann et al. 2010).

LaeA est aussi impliqué dans le développement des champignons filamenteux. La délétion du gène *laeA* chez *Penicillium chrysogenum* provoque une détérioration de la sporulation (Hoff et al. 2010) et chez *Aspergillus nidulans* LaeA est nécessaire pour le caractère dépendant de la lumière du développement asexué.

Les résultats obtenus lors des différentes études ont permis à Bayram et al., de proposer un mécanisme qui coordonne la régulation du développement sexué et la production de métabolites secondaires. Dans le noir, le complexe VeB\VeA\LaeA contrôle et induit l'activité épigénétique de LaeA qui en conséquence contrôle l'expression des gènes des clusters responsables de la synthèse des métabolites secondaires. En présence de lumière cette interaction diminue car VeA est retenu dans le cytoplasme et LaeA présente une faible activité. Ce mécanisme est représenté dans la Figure 9.

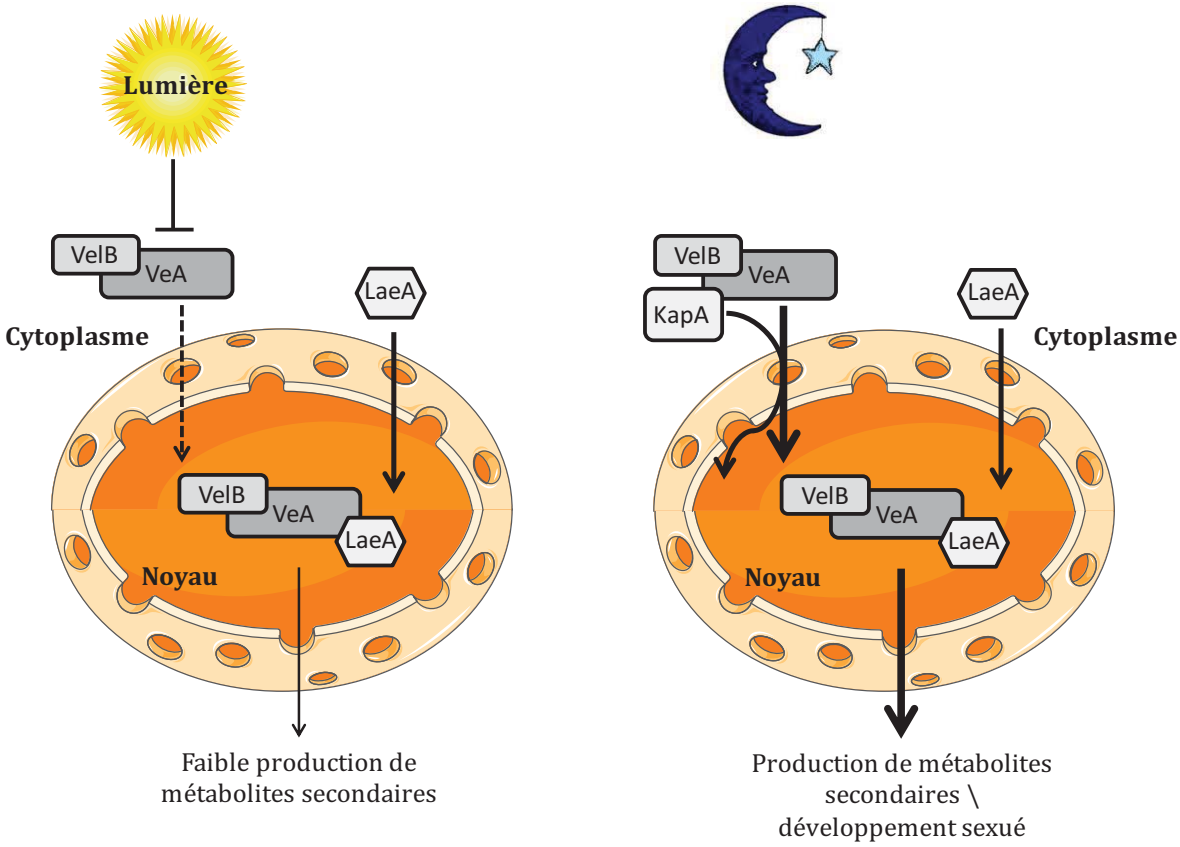


Figure 9 : Modèle de fonctionnement du complexe *velvet* chez *Aspergillus nidulans*
En présence de lumière, VeA est retenue dans le cytoplasme et LaeA présente une faible activité. Dans le noir, VeA couplé à VelB est transporté dans le noyau par l'importine αKapA et il y a formation du complexe *velvet* avec LaeA afin d'activer la production de métabolites secondaires et le développement sexué. D'après Bayram et al. (2008a).

IV. La patuline

1. Généralités

La patuline a été découverte lors de campagnes de criblages de nouvelles molécules fongiques ayant des propriétés antibactériennes suite à la découverte de la pénicilline en 1928 par Fleming. Sa présence a été détectée dans des filtrats de culture d'*Aspergillus clavatus* par Waksman and Horning (1943) et elle a été isolée pour la première fois chez *Penicillium griseofulvum* et *Penicillium expansum* en 1943 par Birkinshaw et al. De par sa découverte simultanée par divers groupes de recherche, la patuline a porté diverses appellations telles que clavacine, expansine, claviformine et clavatine. Ses propriétés antibiotiques l'ont conduit à son introduction en médecine thérapeutique vétérinaire et humaine. Elle a été ainsi utilisée avec succès contre la brucellose bovine et contre les agents pathogènes des rhumes et bronchites. Elle inhibe la croissance des bactéries Gram+ et Gram- (Katzman et al. 1944). Cependant, en raison de sa toxicité pour les hommes et les animaux l'utilisation de la patuline comme antibiotique a été suspendue.

2. Propriétés physiques et chimiques

La patuline, est une lactone hétérocyclique insaturée de poids moléculaire 154 g/mol et de formule brute $C_7H_6O_4$. Caractérisée par un point de fusion de 111°C et un maximum d'absorption à 275 nm, elle est soluble dans l'eau et dans la plus part des solvant organiques. Elle est stable en milieu acide mais perd son activité en milieu alcalin (Figure 10).

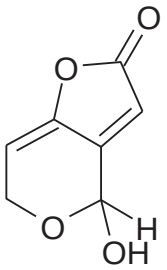


Figure 10 : Structure moléculaire de la patuline

3. Espèces fongiques productrices et conditions de synthèse

La patuline a été isolée comme métabolite secondaire de plusieurs espèces de champignons filamenteux appartenant aux genres *Penicillium, Aspergillus, Byssochlamys* et *Paecilomyces.*

Le principal genre producteur de patuline est le genre *Penicillium.* D'après une étude sur les métabolites secondaires produits par les *Penicillium,* on recense aujourd'hui 14 espèces productrices de patuline : *Penicillium carneum, Penicillium clavigerum, Penicillium concentricum, Penicillium coprobium, Penicillium dipodomycola, Penicillium expansum, Penicillium glandicola, Penicillium gladiocoli, Penicillium griseofulvum, Penicillium marinum, Penicillium paneum,*

Penicillium sclerotigenum, Penicillium vulpinum (Frisvad et al. 2004b) et *Penicillium antarticum.* Cette dernière espèce a récemment été isolée dans les fond marins (Vansteelandt et al. 2012).
Parmi le genre *Aspergillus*, le nombre d'espèces productrices de patuline se limite à trois qui font toutes parties du groupe *Clavati*. Il s'agit d'*Aspergillus clavatus, Aspergillus giganteus* et *Aspergillus longivesica* (Varga et al. 2007).
Dans le genre *Byssochlamys*, seule l'espèce *Byssochlamys nivea* est productrice de patuline. Longtemps l'espèce *Byssochlamys fulva* a été rapportée comme espèce productrice mais les travaux de Puel et al., (2007) basés sur la caractérisation moléculaire de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la patuline ont infirmé ces données.
Enfin, parmi le genre *Paecilomyces,* il semblerait que seules quelques souches de *Paecilomyces saturatus* soient capables de produire de la patuline (Samson et al. 2009).
Parmi toutes ces souches, seules *Penicillium expansum* et *Byssochlamys nivea* sont responsables de grosses pertes économiques. *Byssochlamys nivea* est l'agent responsable de la production de patuline dans les ensilages de maïs alors que *Penicillium expansum* est le contaminant commun des *pomaceae* (pommes et poires) et particulièrement de la pomme en causant la pourriture bleue présentée en Figure 11.



Figure 11 : Pommes contaminées par *Penicillium expansum*

Les pommes et produits à base de pomme constituent les sources principales d'introduction de patuline dans l'alimentation de l'Homme mais d'autres denrées peuvent aussi être contaminées par cette mycotoxine. En effet, *Penicillium expansum* est un saprophyte de nombreuses autres cultures maraichères et arboricoles et la présence de patuline a ainsi pu être détectée dans des pêches, abricots, bananes, raisins... (Neri et al. 2010). La production de patuline dépend de plusieurs facteurs tels que l'activité de l'eau (a_w), la température, le pH mais aussi de facteurs intrinsèques aux fruits (Moake et al. 2005). La production de patuline est inversement proportionnelle au pH car la patuline est instable à des pH élevés (McCallum et al. 2002). La production de patuline a été observée à toutes les températures permissives pour la croissance de *Penicillium expansum*, c'est-à-dire entre 0 et 30°C (Sommer et al. 1974). Les

variétés de pommes influencent aussi la production de patuline par *Penicillium expansum* (McCallum et al. 2002). La production de patuline est aussi largement favorisée par la blessure du fruit. D'une manière générale, les différentes enquêtes réalisées dans le monde montrent que les niveaux de contamination les plus élevés restent ceux enregistrés dans les pommes. En ce qui concerne les jus, la patuline a été détectée à des concentrations comprises entre 0,3 et 4,5 µg par litre. La présence de patuline n'est pas décelable par nos organes olfactifs et gustatifs. Seule une analyse physicochimique peut la mettre en évidence. Les jus contaminés ne présente ni goût particulier, ni modification d'aspect. Par contre, les alcools en contiennent moins car elle est partiellement détruite lors de la fermentation alcoolique des jus de pommes en cidre (Stinson et al. 1978).

4. Voie de biosynthèse de la patuline

L'étude de sa voie de biosynthèse a débuté dans les années 1950, elle est le premier polycétide dont la voie de biosynthèse a été étudiée *in vitro* (Puel et al. 2010).

Historiquement l'élucidation de la voie de biosynthèse de la patuline s'est déroulée en deux étapes. Dans un premier temps, l'utilisation d'acétate radiomarqué au ^{14}C et l'étude de son incorporation ont permis de mettre en évidence six précurseurs : l'acétate, l'acide 6-méthylsalicylique, le *m*-crésol, le *m*-hydroxybenzylalcool et le gentisaldehyde (Bassett and Tanenbaum 1958; Birch et al. 1958; Bassett and Tanenbaum 1960; Bu'Lock et al. 1965). Puis, dans un second temps, l'utilisation de mutants bloqués à différents niveaux de la voie de biosynthèse a permis d'identifier d'autres intermédiaires tels que la phyllostine (Sekiguchi and Gaucher 1978), l'isoepoxydon (Sekiguchi and Gaucher 1979a), l'isopatuline (Sekiguchi and Gaucher 1979b), et l'ascladiol (Sekiguchi et al. 1983). La découverte de ces différents intermédiaires permet d'affirmer que la voie de biosynthèse de la patuline se composerait d'au moins dix d'étapes.

La patuline, comme les aflatoxines ou les fumonisines, est un polycétide impliquant dès la première étape de sa voie de biosynthèse une polycétide synthase qui permet la formation de l'acide 6-méthylsalicylique par la condensation d'une unité d'acétyl-CoA avec trois unités de malonyl-CoA.

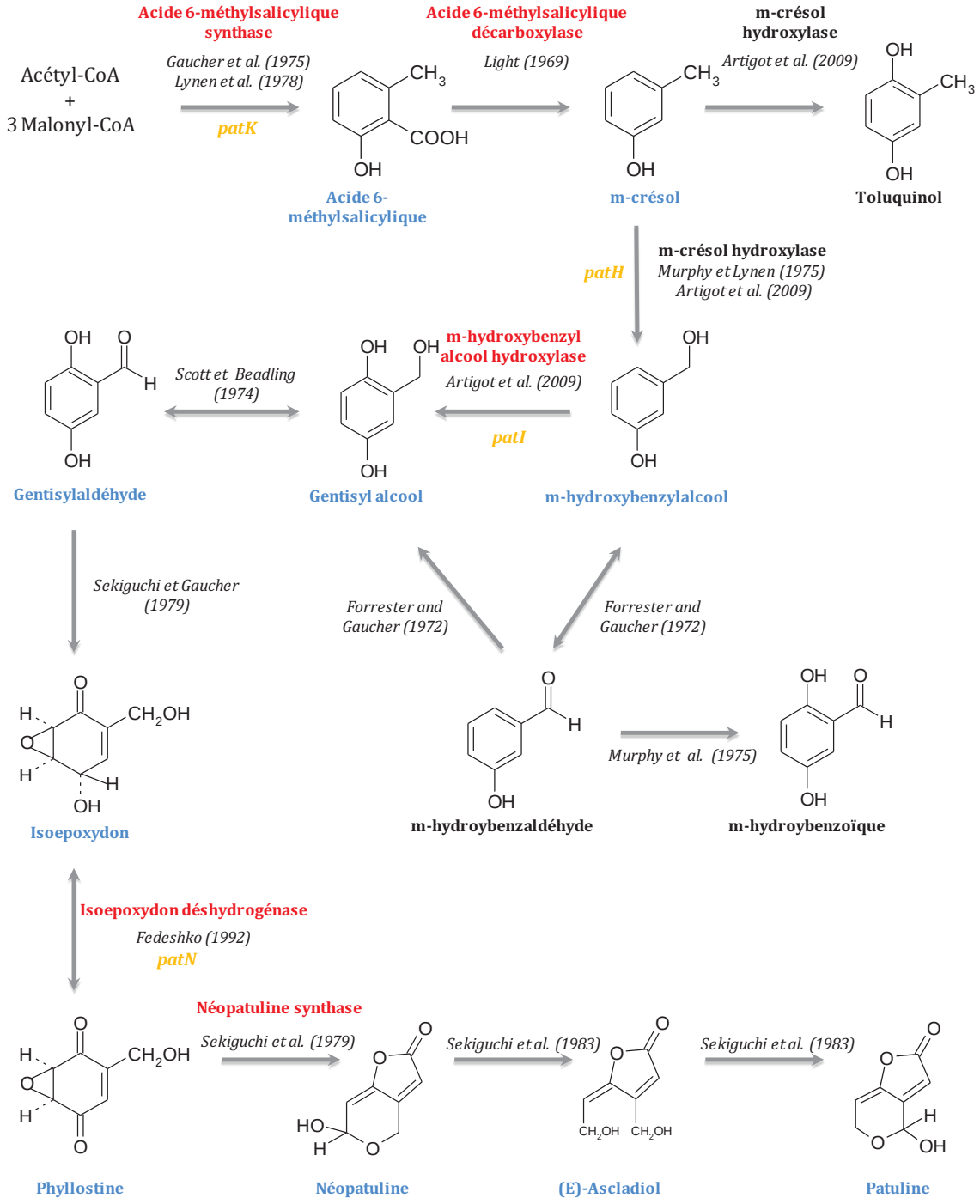


Figure 12 : Voie de biosynthèse de la patuline et des composés apparentés
Les molécules ayant leur nom en bleu sont identifiées comme des précurseurs directs de la patuline, celles ayant leur nom en noir sont des co-métabolites de la voie de biosynthèse de la patuline. En rouge sont indiquées les enzymes qui ont été purifiées et en orange le nom des gènes caractérisés.

Cette enzyme, l'acide 6-méthylsalicylique synthase, présente plusieurs activités enzymatiques telles que : acétyl et malonyl transférase, kétoacyl synthétase, kétoréductase et déshydratase. Cette enzyme de 760 kD a été purifiée par les équipes de Gaucher (1975) et Dimroth et al. (1976) chez *Penicillium patulum* (*Penicillium griseofulvum*). Le gène codant pour cette enzyme a été cloné et caractérisé chez *Penicillium patulum* et chez *Penicillium urticae* (Beck et al. 1990; Wang et al. 1991).

La seconde étape de la voie de biosynthèse de la patuline correspond à la décarboxylation de l'acide 6-méthylsalicylique en *m*-crésol par l'acide 6-méthylsalicylique décarboxylase (Lam et al. 1988). Le *m*-crésol est ensuite converti en *m*-hydroxybenzyl alcool (Murphy and Lynen 1975). A partir de cette étape l'enchainement des différents intermédiaires est beaucoup moins clair. Deux mécanismes sont sujet à débat. Dans ces deux mécanismes, il est acquis que le *m*-hydroxybenzyl alcool est converti en gentisaldéhyde (Forrester and Gaucher 1972; Zamir 1980), néanmoins l'intermédiaire entre ces deux composés pourrait être le gentisyl alcool (Sekiguchi et al. 1983; Iijima et al. 1986) ou le *m*-hydroxybenzaldéhyde (Sekiguchi et al. 1983). Des études ont suggéré que les deux mécanismes étaient possibles (Gaucher, 1975) et d'autres affirment que le *m*-hydroxybenzaldéhyde ne peut pas être converti en gentisaldéhyde mais plutôt en m-hydroxybenzyl alcool (Murphy and Lynen 1975). Dans le cas du second mécanisme décrit, ce serait une *m*-hydroxybenzyl alcool déshydrogénase qui convertirait le *m*-hydroxybenzyl alcool en *m*-hydroxybenzaldéhyde (Forrester and Gaucher 1972; Murphy and Lynen 1975). Une fois le gentisaldéhyde formé, d'autres étapes telles que l'époxydation permettent la formation de l'isoépoxidon, de la phyllostine, de la néopatuline, de l'E-ascladiol et enfin de la patuline.

L'implication d'autres composés tels que le toluquinol, métabolite isolé à partir de plusieurs espèces productrices de patuline, a longtemps été controversée. Au départ, une étude de Scott et Yalpani (1967) a démontré la conversion du deutero-*m*-crésol en toluquinol, gentisylalcool, gentisaldéhyde et patuline comme étant la principale voie de biosynthèse de la patuline. Plus tard, deux études (Forrester and Gaucher 1972; Scott 1974) ont utilisé une technique de radiomarquage ou du deutero-toluquinol afin de démontrer que le toluquinol n'était pas transformé en gentisylalcool ou en patuline mais qu'il était métabolisé en déoxyépoxydon. Dans une dernière étude, beaucoup plus récente (Artigot et al. 2009), il a été démontré que seul le cytochrome CYP619C2 (*PatI*) pouvait catalyser l'hydroxylation du *m*-crésol en toluquinol et que le cytochrome CYP619C3 (*PatH*) ne pouvait pas convertir le toluquinol en gentisylalcool. Sur la base de ces dernières études, le toluquinol est donc un co-métabolite de la patuline et non un intermédiaire de la voie de biosynthèse. Dans la Figure 12 sont représentés la voie de biosynthèse de la patuline et ses composés apparentés.

Actuellement 5 enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de la patuline ont été partiellement ou totalement purifiées. La première, l'acide 6-methylsalicylique synthase, la seconde, l'acide 6-methylsalicylique décarboxylase (Light 1969), la *m*-hydroxybenzyl alcohol dehydrogenase, l'isoépoxydon déhydrogénase (Fedeshko 1992) et la néopatuline synthase (Fedeshko 1992).

Finalement, d'un point de vue strictement chimique et biochimique la voie de biosynthèse de la patuline est relativement bien connue bien qu'il existe certaines incertitudes sur l'implication de quelques composés comme précurseurs directs.

5. Cluster de gènes de la voie de biosynthèse de la patuline

Contrairement à d'autres mycotoxines majeures comme les aflatoxines et les trichothécènes, la génétique de la voie de biosynthèse de la patuline est encore mal connue. En effet, au début des travaux présentés dans cette thèse seuls 5 gènes ont été clonés (*6msas*, *idh*, *abc, patH* et *patI*). Il faut d'ailleurs noter que ces gènes ont été isolés à partir de *Byssochlamys nivea*, *Penicillium griseofulvum* et *Aspergillus clavatus*, trois espèces productrices de patuline mais qui ne sont jamais isolées à partir du substrat «pomme ».

Deux gènes de *Penicillium griseofulvum* ont été isolés, séquencés et caractérisés. Le gène *6msas* code pour la polycétide synthase, l'acide 6-méthylsalicylique synthase, intervenant au début de la cascade enzymatique conduisant à la synthèse de la patuline (Beck et al. 1990; Wang et al. 1991). Le second gène, l'*idh* code pour une alcool déshydrogénase impliquée dans la transformation de l'isoépoxydon en phyllostine, deux autres précurseurs de la patuline (Fedeshko 1992). Ce gène a aussi été isolé chez *Penicillium expansum* (Dombrink-Kurtzman 2007) et chez *Byssochlamys nivea* (Dombrink-Kurtzman and Engberg 2006; Puel et al. 2007).

Un gène se trouvant en aval du gène *idh* a été isoléet séquencé. Il coderait pour une protéine présentant une forte homologie avec une isoamyl alcool oxidase (Dombrink-Kurtzman 2008).

Un gène *abc* codant pour un transporteur actif de la famille des ABC (ATP Binding Cassette) transporteurs, potentiellement impliqué dans le transport actif de la patuline, a été localisé en amont du gène *idh*. Ce gène a été isolé et séquencé chez *Penicillium griseofulvum, Byssochlamys nivea* et *Penicillium expansum* (Puel 2007).

Les deux derniers gènes caractérisés par expression hétérologue chez la levure codent pour des cytochromes P450 monooxygénases impliqués dans la transformation du *m*-crésol en *m*-hydroxybenzyl alcool et du *m*-hydroxybenzylalcool en gentisyl alcool (Artigot et al. 2009).

Un cluster de gènes impliqués dans la synthèse de la patuline a été identifié chez *Aspergillus clavatus*, espèce fongique productrice de patuline (Artigot et al. 2009). Ce cluster d'environ 40 Kb se compose de 15 gènes (Figure 13). Ces gènes codent pour les enzymes nécessaires à la synthèse de la patuline mais aussi pour d'autres types de molécules tels que des

transporteurs ou des facteurs de régulation. Dans ce cluster il y a trois gènes codant pour trois types de transporteurs différents : un ABC (ATP binding cassette) transporteur codé par *patM*, un MFS (Major Facilitator Superfamily) transporteur codé par *pat C* et un transporteur d'acétate codé par *pat A*. Ce cluster contient aussi des gènes codant respectivement pour une carboxylestérase (*patB*), une alcool déshydrogénase Zn-dépendante (*patD*), une GMC-oxydoréductase (*patE*), deux gènes (*patH* et *patI*) codant pour des cytochromes P450 monooxygénases évoqués ci-dessus, une acide 6-méthylsalicylique synthase (*patK*), un gène codant pour un facteur de transcription (*patL*), une isoamyl alcohol oxidase (*patO*), un gène qui code pour une isoepoxydon déshydrogénase (*patN*) et finalement un gène codant pour une décarboxylase (*patG*) qui fera l'objet d'une partie des travaux de thèse présentés plus loin. Deux autres gènes (*patF* et *patJ*) codent pour des protéines dont les rôles sont encore complètement inconnus.

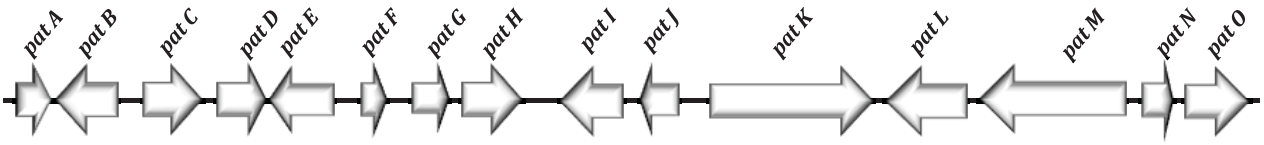


Figure 13 : Cluster de gènes impliqués dans le voie de biosynthèse de la patuline chez *Aspergillus clavatus*.
(Artigot et al. 2009)

La caractérisation du cluster chez *Aspergillus clavatus* ouvre un large champ de perspectives dans le domaine du diagnostic. En effet, des méthodes de détection rapide de la présence de champignons producteurs de patuline pourront être développées à partir des séquences des gènes de ce cluster. *Aspergillus clavatus* n'étant pas un contaminant des pommes, il est indispensable de débuter des études sur *Penicillium expansum* l'espèce fongique productrice de patuline actuellement la plus préoccupante. Le génome de *Penicillium expansum* n'étant pas séquencé, le séquençage du cluster de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la patuline chez cette espèce est la condition *sine qua none* au développement de kits de détection des espèces productrices de patuline via des méthodes telles que la PCR mais aussi à toute étude de la régulation de la synthèse de la patuline *in vivo* quand *Penicillium expansum* se développe dans la pomme.

6. Occurrence de la patuline dans les aliments

Les espèces productrices de patuline ont été isolées à partir d'une grande variété de fruits et légumes incluant les pommes, les poires, le raisin, les cerises, les abricots, les fraises, les pêches, les tomates, les bananes, les amandes, les noix et les noisettes (Puel et al. 2010).

La présence d'espèces potentiellement productrices de patuline ne signifie pas nécessairement la présence de patuline. Néanmoins, la production de patuline est couramment mais non exclusivement associée à la pourriture bleue de la pomme, principalement causée par *Penicillium expansum*. Cette espèce fongique est responsable de la contamination naturelle des nombreux fruits cités précédemment en causant le même type de lésion observé sur les pommes. Néanmoins, les plus fortes concentrations de patuline sont retrouvées dans les pommes ou dans les produits à base de pommes.

Les céréales, les malts et autres produits d'origine céréalière ont fait l'objet de plusieurs enquêtes. L'étude de Lopez-Diaz et Flannigan (1997) a démontré la production de patuline par une souche d'*Aspergillus clavatus* durant le maltage de l'orge et du blé. Une autre étude a fait état de pain moisi contenant en moyenne 45 µg/kg de patuline (Rychlik and Schieberle 2001). Ces même auteurs ont inoculé de façon artificielle des pains à base de farine de blé avec une souche de *Penicillium expansum* et ont démontré la capacité de cette espèce à produire de la patuline sur ce substrat. En effet, au point d'inoculation, la concentration de patuline a atteint les 1600 µg/kg.

D'une manière beaucoup plus surprenante, la patuline a aussi été détectée dans des fromages de type cheddar (Bullerman and Olivigni 1974; Olivigni and Bullerman 1977) contaminés par une souche atypique de *Penicillium roqueforti* (Olivigni and Bullerman 1978). Jusqu'à présent aucune souche de *Penicillium roqueforti* n'a été identifiée comme productrice de patuline, cependant l'espèce *Penicillium carneum*, appartenant à la section *roqueforti* pourrait être responsable de cette production. Les méthodes d'identification disponibles au moment de l'étude ainsi que leur très forte ressemblance macro- et microscopique ne permettaient pas de faire la distinction entre ces deux espèces. Il est maintenant bien établi que les produits laitiers ne sont pas des milieux favorisant la production de patuline, à cause de leur faible teneur en sucre et de la forte concentration en protéines favorisant la formation d'adduits avec la patuline. Ce phénomène peut aussi expliquer l'absence de patuline dans les produits carnés (Bailly et al. 2005).

Les aliments destinés à l'alimentation animale tels que les ensilages et les fourrages peuvent également être contaminés par la patuline (Escoula 1977). La présence simultanée de patuline et d'acide byssochlamique démontrait que *Byssochlamys nivea* était à l'origine de la contamination (Escoula and Henry 1974).

7. Exposition de la population française à la patuline

En 2000, une étude de la ration alimentaire a été entreprise afin de connaitre le niveau d'exposition de la population française à la patuline à partir d'aliments "prêts à consommer" (Leblanc et al. 2005). La présence de patuline a été analysée dans vingt échantillons de pâtisseries aux pommes, de pommes fraiches, de compotes de pommes, de jus de pommes et de cidres. Les résultats montrent que plus de 80 % des produits analysés présentent des niveaux de contamination inférieurs à la limite de détection. Par contre, deux échantillons présentent des niveaux de contamination compris entre la limite de détection et 50 µg/kg. Il s'agit pour le premier, d'un échantillon de jus de pomme à base de concentré et de cidre pour le deuxième. Deux autres échantillons présentent une concentration supérieure à 50 µg/kg. Il s'agit d'un échantillon de tartelette aux pommes (60 µg/kg) et d'un échantillon de beignet aux pommes (100 µg/kg).

D'après cette étude, les aliments contributeurs à l'exposition de la population française à la patuline sont essentiellement les produits transformés tels que le jus de pomme, le cidre et les compotes. L'utilisation des pommes de mauvaise qualité, et donc non commercialisables, dans ces procédés de fabrication est la principale cause de ces niveaux de contamination.

8. Propriétés toxicologiques de la patuline

La dose létale 50 % a été mesurée chez des rongeurs (rat, souris et hamster) par administration orale de patuline. Elle se situe entre 29 et 55 milligrammes par kilogramme de poids corporel. Par contre, lorsque la patuline est administrée par voie intraveineuse, intrapéritonéale ou par voie sous-cutanée, elle s'est avérée être 3 à 6 fois plus toxique pour les mêmes espèces (Pfohl-Leszkowicz 1999). La toxicité subaiguë de la patuline a principalement été étudiée chez le rat, conduisant à une perte pondérale, des désordres gastriques et intestinaux avec une perturbation de la fonction rénale. L'administration de doses répétées conduit à une neurotoxicité se traduisant par des tremblements et des convulsions, ainsi qu'une inhibition de nombreuses enzymes dans l'intestin et le cerveau (Devaraj and Devaraj 1987). L'inhibition de ces enzymes s'explique par la forte affinité de la patuline aux groupements sulfydriles (SH) portés par les protéines.

Mise à part une étude qui montre un effet de l'administration de patuline par voie orale chez des rats au niveau de diverses activités hormonales thyroïdiennes et testiculaires, la patuline est reconnue pour ne provoquer que des désordres gastriques et intestinaux avec ulcérations et hémorragies, voire des perturbations de la fonction rénale lorsqu'elle est administrée à de plus fortes doses (0,1 mg/kg p.c.) (Selmanoglu and Koçkaya 2004).

La patuline est génotoxique, à des doses non cytotoxiques elle provoque l'arrêt de la mitose, des aberrations chromosomiques et l'apparition de micronoyaux au sein des cellules (Pfeiffer et al.

1998). Il y a très peu d'études disponibles sur les effets à très long terme de l'exposition à la patuline mais les rares publications disponibles ont mis en évidence l'absence de tumeurs chez des rats exposés à des doses orales tri-hebdomadaires de 0,1 à 2,5 mg/kg pendant 74 à 104 semaines. Ainsi, cette mycotoxine a été classée par le CIRC dans le groupe 3 où figurent les molécules pour lesquelles il est impossible de se prononcer quant à la cancérogénicité pour l'homme (IARC 1987).

9. Valeurs toxicologiques de référence

En 1990, le JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) a déterminé une dose journalière tolérable provisoire (DJTP) de 7 µg/kg de poids corporel par jour, fondée sur une dose sans effet de 0,1 mg/kg de poids corporel par jour obtenue dans une étude chez le rat (Becci et al. 1981) qui visait à évaluer les effets sur la reproduction, la toxicité à long terme et la cancérogénicité. Cette valeur a été réévaluée en 1995 et cette nouvelle évaluation tient compte du fait que l'essentiel de la patuline ingérée par les rats est éliminé dans les 48 h et 98 % dans les sept jours qui suivent. Finalement, le JECFA a fixé une dose journalière maximale tolérable provisoire (DMJTP) de 0,4 µg/kg de poids corporel par jour. Cette DMJTP a été fixée en appliquant un facteur de sécurité de 100 à la dose sans effet de 43 µg/kg de poids corporel par jour recalculée à partir de l'étude chez le rat.

10. Règlementation

La patuline est la mycotoxine la plus règlementée après les aflatoxines et l'ochratoxine A. Dans le cadre du règlement 1881/2006/CE (abrogeant le règlement 466/2001/CE et ses modifications) portant sur la fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires destinées à l'homme, des teneurs maximales ont été fixées pour la patuline.

Les teneurs maximales de patuline autorisées varient en fonction des denrées considérées et sont présentées dans le Tableau 4. Elles ont été fixées à 50 µg/kg de jus de fruits, nectars de fruits, spiritueux, cidres et autres boissons produites à base de jus de pomme et pommes ; à 25 µg/kg pour les produits solides à base de pommes et à 10 µg/kg pour les jus et autres produis à base de morceaux de pommes destinés aux nourrissons et enfants en bas âge. La teneur maximale de patuline autorisée est en effet plus stricte pour les aliments destinés au nourrisson et à l'enfant en bas âge.

Tableau 4 : Teneurs maximale de patuline dans les denrées alimentaires.
Règlement CE N°1881/2006 de la commission du 19 décembre 2006

Denrées alimentaires	Teneurs maximales (µg/kg)
Jus de fruits, jus de fruits concentrés reconstitués et nectars de fruits	50
Boissons spiritueuses, cidre et autres boissons fermentés produites à partir de pommes ou contenant du jus de pomme	50
Produits à base de morceaux de pomme, tels que la compote de pomme, destinés à la consommation directe à l'exception des denrées alimentaires figurant dans les catégories suivantes	25
Jus de pomme et produits à base de morceaux de pomme, tels que la compote de pommes et la purée de pommes, destinés aux nourrissons et enfant en bas âge et étiquetés et vendus comme tels	10
Aliments pour bébés, autres que les préparations à base de céréales, destinés aux nourrissons et enfant en bas âge	10

OBJECTIFS DE LA THESE

La patuline fait partie de la très réduite liste des mycotoxines pour lesquelles une règlementation européenne est mise en place. Elle est responsable de la contamination de nombreuses denrées alimentaires. Par conséquent cette toxine pose un problème de sécurité sanitaire des aliments et représente un danger pour l'Homme. La patuline étant très résistante aux différents procédés technologiques appliqués aux denrées alimentaires, l'idéal serait de maîtriser la voie de biosynthèse. Mais avant d'envisager des moyens visant à limiter la production de patuline dans les fruits, il est nécessaire de comprendre les mécanismes moléculaires mis en place lors de la biosynthèse de la patuline mais aussi de connaitre les gènes impliqués et leur régulation.

Comme décrit précédemment, les voies de biosynthèses sont des cascades de réactions enzymatiques et les gènes codant pour les enzymes impliquées sont regroupés sous forme de cluster. Enfin, l'expression des gènes de ce cluster est coordonnée par un facteur de régulation spécifique (généralement à l'intérieur du cluster) et par des facteurs de régulation globaux. Actuellement la voie de biosynthèse de la patuline n'est que partiellement élucidée et le cluster de gènes correspondant n'est décrit que chez *Aspergillus clavatus*, organisme producteur de patuline mais incapable de se développer dans les pommes. De plus, seulement quelques enzymes codées par des gènes du cluster ont été caractérisées d'un point de vue moléculaire et biochimique.

Les objectifs de cette thèse s'articulent autour de trois axes.

L'objectif général de la première partie relève plus de l'acquisition de connaissances. En effet, la caractérisation moléculaire de la voie de biosynthèse de la patuline est la condition *sine qua none* à toute étude visant à comprendre la régulation de la biosynthèse de la patuline, mais également à toute action permettant de limiter sa synthèse. Deux études ont été menées en parallèle. La première a consisté à caractériser le cluster de gènes de la voie de biosynthèse de la patuline chez *Penicillium expansum*, l'espèce productrice de patuline la plus préoccupante et responsable de nombreuses pertes économiques. La seconde a consisté à caractériser la seconde étape de la voie de biosynthèse de la patuline. La caractérisation de cette seconde étape conduit à l'élucidation de la première partie de la voie de biosynthèse de la patuline. La caractérisation des gènes du cluster tend à ouvrir un large champ de perspectives dans le domaine du diagnostic.

Dans une seconde partie nous nous sommes intéressés à l'aspect régulation de cette voie de biosynthèse. En premier lieu, le travail a consisté à caractériser le facteur spécifique de la voie de biosynthèse de la patuline chez *Penicillium expansum*. Par la mutation de ce dernier,

l'extinction de l'expression des gènes appartenant au cluster est totale et la production de patuline inexistante. Nous avons aussi étudié l'implication de la patuline dans la pathogénicité et dans la virulence de *Penicillium expansum.* Pour cela différentes variétés de pommes ont été inoculées avec les souches sauvage et mutante, puis au terme de l'incubation, plusieurs paramètres tels que le volume de pourriture, la vitesse de croissance et la production de patuline ont été analysés.

Enfin, dans une troisième partie, qui relève plus de la recherche appliquée, nous avons étudié l'impact de la lumière de différentes longueurs d'ondes sur la croissance de *Penicillium expansum* et la production de patuline. D'une manière générale les pommes sont stockées dans le noir après récolte. Or de nombreuses études chez d'autres ascomycètes ont démontré que la lumière, et plus précisément les lumières bleue et rouge, pouvaient ralentir la croissance des champignons filamenteux et modifier leur production de métabolites secondaires. En exposant *Penicillium expansum* aux différentes longueurs d'onde de lumières nous avons pu étudier sa croissance, sa production de métabolites secondaires mais aussi sa capacité à infecter des pommes dans les différentes conditions.

TRAVAIL EXPERIMENTAL

Chapitre 1 Etude de la voie de biosynthèse de la patuline

RESUME DES ETUDES

1. Caractérisation du cluster de gènes impliqué dans la voie de biosynthèse de la patuline chez *Penicillium expansum (ARTICLE 1)*

Penicillium expansum est considéré comme la principale source de patuline dans les denrées alimentaire destinées à la consommation humaine, en conséquence c'est l'espèce la plus préoccupante concernant la santé publique. Lors de son développement sur les fruits, *Penicillium expansum* est responsable de la maladie appelée « pourriture bleu » se déclarant seulement après récolte. Les fruits et plus particulièrement les pommes sont affectés par cet agent pathogène et sont responsable de la présence de patuline dans les chaines alimentaires.

Durant ces dernières années, les études des mécanismes moléculaires des voies de biosynthèses des mycotoxines se sont multipliées. Actuellement, la plus part des clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse des principales mycotoxines ont été identifiés.

Concernant la patuline, il semblerait que sa voie de biosynthèse soit composée d'une dizaine d'étapes. Il y a quelques années le cluster de gènes impliqué dans la voie de biosynthèse de la patuline a été identifié chez *Aspergillus clavatus*. Ce cluster est composé de 15 gènes regroupés dans une région d'environ 40 kb*. Aspergillus clavatus* est un producteur de patuline mais qui ne se développe pas sur le substrat pomme. Il constitue donc un organisme modèle pour l'étude la voie de biosynthèse de la patuline mais pas pour l'étude des mécanismes moléculaires mis en place lors de la production de patuline lors d'infection des fruits.

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude était la caractérisation de ce même cluster mais cette fois chez *Penicillium expansum*, espèce la plus importante en sécurité des aliments. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires conduisant à la production de patuline chez *Penicillium expansum* pourrait en effet aider à définir des stratégies de lutte contre la contamination des fruits.

Au cours de cette étude nous avons caractérisé le cluster de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la patuline chez *Penicillium expansum.* Pour cela la stratégie utilisée a été de comparer le cluster de gènes d'*Aspergillus clavatus* avec un cluster non fonctionnel « fossile » retrouvé chez *Penicillium chrysogenum* et chez *Penicillium digitatum,* deux espèces non productrices de patuline*.* Dans un premier temps, après alignement des séquences des gènes orthologues, des amorces spécifiques aux régions conservées ont été dessinées dans le but d'amplifier et de séquencer de longs fragments d'ADN. Dans un second temps nous avons amplifié les régions intergéniques afin de relier les gènes entre eux et d'obtenir des ilots de gènes. La dernière étape a été d'assembler ces différents îlots de gènes afin de reconstituer le cluster. Pour cela nous avons utilisé la méthode du Genome Walking qui est une méthode de séquençage de l'ADN de proche en proche. Au terme de cette étude, pour la première fois le

cluster de gènes impliqué dans la voie de biosynthèse de la patuline chez *Penicillium expansum* a été identifié pour la première fois.

Tous les détails de cette étude, publiée dans *International Journal of Food Microbiology* en juillet 2014 sont présentés à la suite dans le format de publication du journal.

International Journal of Food Microbiology 189 (2014) 51–60

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

Sequencing, physical organization and kinetic expression of the patulin biosynthetic gene cluster from *Penicillium expansum*

Joanna Tannous [a,b,c], Rhoda El Khoury [a,b,c], Selma P. Snini [a,b], Yannick Lippi [a,b], André El Khoury [c], Ali Atoui [d], Roger Lteif [c], Isabelle P. Oswald [a,b], Olivier Puel [a,b,*]

[a] INRA, UMR 1331 Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, 180 Chemin de Tournefeuille, F-31027 Toulouse Cedex, France
[b] Université de Toulouse III, ENVT, INP, UMR 1331, Toxalim, F-31076, Toulouse, France
[c] Université Saint-Joseph, Centre d'Analyses et de Recherches (Faculté des Sciences), Campus des Sciences et Technologies, Mar Roukos, Mkallès, P.O. Box 11-514 Riad El Solh, Beyrouth 1107 2050, Lebanon
[d] Laboratory of Microorganisms and Food Irradiation, Lebanese Atomic Energy Commission-CNRS, P.O. Box 11-8281, Riad El Solh, 1107 2260 Beirut, Lebanon

ARTICLE INFO

Article history:
Received 9 April 2014
Received in revised form 11 July 2014
Accepted 22 July 2014
Available online 31 July 2014

Keywords:
Patulin
Penicillium expansum
Gene cluster
Mycotoxins
Apples
Gene expression

ABSTRACT

Patulin is a polyketide-derived mycotoxin produced by numerous filamentous fungi. Among them, *Penicillium expansum* is by far the most problematic species. This fungus is a destructive phytopathogen capable of growing on fruit, provoking the blue mold decay of apples and producing significant amounts of patulin. The biosynthetic pathway of this mycotoxin is chemically well-characterized, but its genetic bases remain largely unknown with only few characterized genes in less economic relevant species. The present study consisted of the identification and positional organization of the patulin gene cluster in *P. expansum* strain NRRL 35695. Several amplification reactions were performed with degenerative primers that were designed based on sequences from the orthologous genes available in other species. An improved genome Walking approach was used in order to sequence the remaining adjacent genes of the cluster. RACE-PCR was also carried out from mRNAs to determine the start and stop codons of the coding sequences. The patulin gene cluster in *P. expansum* consists of 15 genes in the following order: *patH*, *patG*, *patF*, *patE*, *patD*, *patC*, *patB*, *patA*, *patM*, *patN*, *patO*, *patL*, *patI*, *patJ*, and *patK*. These genes share 60–70% of identity with orthologous genes grouped differently, within a putative patulin cluster described in a non-producing strain of *Aspergillus clavatus*. The kinetics of patulin cluster genes expression was studied under patulin-permissive conditions (natural apple-based medium) and patulin-restrictive conditions (Eagle's minimal essential medium), and demonstrated a significant association between gene expression and patulin production. In conclusion, the sequence of the patulin cluster in *P. expansum* constitutes a key step for a better understanding of the mechanisms leading to patulin production in this fungus. It will allow the role of each gene to be elucidated, and help to define strategies to reduce patulin production in apple-based products.
© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Patulin is a polyketide-derived mycotoxin, the risk of exposure to which has emerged as an important topic given the high number of toxic effects that have assigned to it. Patulin produces acute and chronic toxicity mainly genotoxicity, cytotoxicity, mutagenicity as well as immunotoxicity (Puel et al., 2010). It is currently one of the few mycotoxins whose levels in food are regulated in many countries around the world because of its perceived harmful effects in humans, particularly children, who are most susceptible to patulin toxicity (Brandon et al., 2012).

Patulin is produced by a number of species belonging to the *Aspergillus*, *Byssochlamys* and *Penicillium* genera (Varga et al., 2007; Houbraken et al., 2006). Of these, *Penicillium* is the most prolific with 14 species identified as patulin producers (Frisvad et al., 2004; Vansteelandt et al., 2012). Within this genus, *Penicillium expansum* is considered as the main source of patulin in food and consequently the species of greatest concern regarding public health and economic risk (Morales et al., 2008). *P. expansum* is the causal agent of a common post-harvest disease known as blue mold rot (Baert et al., 2007). Fruit products in general and apples in particular, are one of the sectors most affected by this pathogen, and are considered by far the main route of entry of patulin into the food chain (Chen et al., 2004; Baert et al., 2012). The European Union has set maximum acceptable levels of 50, 25 and 10 μg of patulin/kg, for fruit juices, nectars and fermented apple beverages, and solid apple products and apple-based products for infants and young children, respectively (EU Commission Regulation, 2003, 2006).

The understanding of the biosynthetic mechanisms of the most agriculturally important mycotoxins has greatly increased over the past

* Corresponding author at: INRA, UMR 1331 Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, 180 Chemin de Tournefeuille, F-31027 Toulouse Cedex, France.
E-mail address: opuel@toulouse.inra.fr (O. Puel).

http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.028
0168-1605/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

decades. Nowadays, biosynthetic gene clusters have been identified for the major mycotoxins. The aflatoxin biosynthetic pathway and its 25 related genes have been entirely characterized in the most problematic aflatoxigenic fungi, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* (Yu et al., 2004). The cluster of sterigmatocystin in *Aspergillus nidulans*, an intermediate in aflatoxin formation, has been shown to share 16 genes with the aflatoxin gene cluster but arranged differently (Brown et al., 1996). A considerable achievement was the characterization of the trichothecenes gene cluster in *Fusarium graminearum* (Kimura et al., 2003). A part of the ochratoxin A gene cluster was also characterized in the ochratoxigenic species *Penicillium nordicum* (Karolewiez and Geisen, 2005) and the zearalenone biosynthetic gene cluster of *F. graminearum* has been reported to contain four genes located within a 39 kb region (Lee et al., 2011). Recently, the fumonisins biosynthetic gene cluster was identified, with currently 16 genes involved in the biosynthesis of fumonisins in *Fusarium verticillioides* (Bojja et al., 2004; Sagaram and Shim, 2006; Proctor et al., 2013).

In the case of patulin, its biosynthetic pathway consists of about 10 enzymatic reactions as suggested by several biochemical studies and by identification of several mutants that are blocked at various steps in the biosynthetic pathway (Moake et al., 2005). Based on the sequence of the patulin non-producing strain of *Aspergillus clavatus* NRRL1, our team elaborated a putative gene cluster for the biosynthesis on this mycotoxin (Artigot et al., 2009). Out of the 15 genes, only five have been identified and characterized in *Penicillium griseofulvum*, *Byssochlamys nivea* or *A. clavatus*: *patK*, *patG*, *patH*, *patI*, and *patN* encoding respectively a 6-methylsalicylic acid synthase (Beck et al., 1990; Puel et al., 2007), 6-methylsalicylic acid decarboxylase (Snini et al., 2014), *m*-cresol hydroxylase (Artigot et al., 2009), *m*-hydroxybenzyl alcohol hydroxylase (Artigot et al., 2009) and isoepoxydon dehydrogenase (Fedeshko, 1992; Dombrink-kurtzman and Engberg, 2006; Puel et al., 2007).

A better understanding of mechanisms leading to patulin production in *P. expansum* will help to define strategies to reduce its presence in apple based products. Because *A. clavatus* does not grow on pomaceous fruits, it is necessary to obtain the sequence of the patulin cluster in *P. expansum*, the causal agent of blue mold rot, to study the regulatory mechanisms of patulin production in apples.

In this paper, we describe the identification, isolation and analysis of the patulin biosynthetic gene cluster from *P. expansum*. We also performed an analysis of the expression of the different genes of the cluster under both permissive and restrictive conditions for patulin production.

2. Materials and methods

2.1. Fungal growth and DNA isolation

A filamentous fungal strain of *P. expansum* NRRL 35695 isolated from grapes in the Languedoc Roussillon region of France was used in this study. The isolate was previously shown to belong to this *Penicillium* species according to the DNA sequencing of the ITS gene region. Furthermore, its ability to produce patulin was confirmed. The fungal strain was freshly cultivated on PDA media (Fluka, Saint-Quentin Fallavier, France) and allowed to grow for 7 days at 25 °C to enhance sporulation. This culture was then used to inoculate a 250 mL Erlenmeyer flask containing 100 mL of yeast extract-sucrose (YES) broth with 10^5 spores and it was then incubated at room temperature under constant agitation for 4 days. The liquid culture was filtered through Whatman No. 42 filter paper and the mycelium was ground up under liquid nitrogen. DNA was extracted according to the method described by Gardes and Bruns (1993) with some modifications. In this method, the powdered mycelium was collected in microfuge tubes, homogenized with 700 μL of lysis buffer [2% CTAB (Fluka, Saint-Quentin Fallavier, France), 1.4 M NaCl (Euromedex, Souffelweyersheim, France), 20 mM EDTA pH 8 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), 100 mM Tris–HCl pH 8 (Euromedex, Souffelweyersheim, France)] and incubated at 50 °C for 10 min then cooled on ice for 1 h. The sample was later treated with 500 μL of Phenol:Chloroform (50%/50%; v/v) (MP Biomedicals, IIIkirch, France; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), vortexed for one minute and the supernatant collected after centrifugation at 16,200 ×*g* for 15 min at 4 °C. The DNA was precipitated with an equal volume of ice-cold isopropanol (Carlo Erba, Val-de-Reuil, France) and incubated overnight at − 20 °C. After incubation, sample was again centrifuged at 16,200 ×*g* for 10 min at 4 °C. The pellet obtained was rinsed with 70% ethanol (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), thoroughly air-dried and resuspended in 50 μL of sterile water. The DNA purity ratio and concentration were then measured using a NanoDrop ND1000 (Labtech, Palaiseau, France).

2.2. Strategy adopted to identify the patulin biosynthesis genes in *P. expansum*

2.2.1. Design of PCR primers

Several orthologous-gene alignments were carried out for almost all the genes of the patulin biosynthetic pathway previously identified in *A. clavatus*, *P. griseofulvum* and *Penicillium chrysogenum*. The exception was for the two genes *patE* and *patF* that have not been identified so far in a species of *Penicillium* and for *patM*, the gene encoding for an ABC transporter that had been sequenced in a previous study (Puel, 2007). The alignments were conducted using the MultAlin Multiple sequence alignment tool (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/), and they have served as a highly useful resource for the design of PCR primers. The strains used and the sequence accession numbers are listed in Table S1. Degenerative PCR primers containing related sequences with differences at specific locations were designed based on the highly-conserved regions in these alignments to amplify overlapping fragments.

However, to amplify the intergenic regions, the hypothetical gene orders and orientations were assumed relying on the patulin biosynthesis gene homolog clusters in other fungal species, mainly *A. clavatus* for which the total cluster had been sequenced and *P. chrysogenum*, a non-producer species which is phylogenetically very close to *P. expansum*. The lengths of these intergenic regions were retrieved from the GenBank data and several gene-specific primer sets were designed to target these regions on the basis of the partial sequences determined during the course of this study. The primers were chosen to share an optimum theoretical melting temperature (Tm) of approximately 60 °C using the Oligo Calculator tool (http://mcb.berkeley.edu/labs/krantz/tools/oligocalc.html). All the primers used were synthesized by Sigma-Aldrich and their details are given in Table S2a.

2.2.2. PCR amplification

All the PCR amplifications were carried out in 50 μL reaction mixtures containing 5 μL of 10x PCR buffer, 1.5 μL of 50 mM $MgCl_2$, 4 μL of dNTP (2.5 mM each), 1.5 μL of each primer (at 0.1 μg/μL), 2.5 U of recombinant Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Life Technologies SAS, Saint Aubin, France) and H_2O up to 50 μL. Three μg of genomic DNA was used as template. The PCR thermal cycling conditions were carried out in a thermocycler from Applied biosystems (GeneAmp PCR System 2700) as follows: a 5 min preheating step at 94 °C, followed by 40 cycles of amplification (94 °C for 45 s, 60 °C for 45 s, 72 °C for X s) and a final 10 min elongation step at 72 °C. The extension time (X) was selected according to the expected amplicon length.

2.2.3. Genome walking approach

The nucleotide sequences adjacent to known regions were determined according to an improved genome walking method, using the GenomeWalker Universal Kit from Clontech (Saint-Germain en Laye, France) as described by Dombrink-Kurtzman and Engberg (2006). For each walk, two gene specific primers were designed; one for the primary PCR (GSP1) and the other for secondary PCR (GSP2) on the basis of the newly identified gene fragments. The outward gene-specific primers

Table 1
The 5′-UTRs sequences including the translation initiation codon of all the genes involved in patulin biosynthesis in *P. expansum*. The translational start codons are shaded.

Gene name	5′UTR sequence
PatA	AACTTGATTCTAAATTAGAAGCCCTCTTTTCCTCACACTGTGGTCTTTTTTCTGATTCAACT ATAACCACTTTTGCCGACCCAACGTGCTACAAGATG
PatB	AGTGAAATACAAAAAACCTGGGAGCTCATTATACCCCATAATTCATTCCCAATG
PatC	ATCAATACTTTCGCCAACGTCCTCCAGTGGATAACTATATTGCTGCCTTCTATTTTCACTTT ACTACGACTCCATTGGGCAAGTGCCTAGATAGCTGAACCTCTAAAACAGCTGACTAAGTG CCGCTCGGTTCGCTTCCCACAATG
PatD	AGAAACATAGTCTTACTTCGCACAGCTATCTATTATTCAGCAGAATACGCACCATG
PatE	AAAAGCTTTCTGACTCCATTCTGCAGGCAATTCCTTTCTGCGACGGTAATTGGGACCTGA ATATG
PatF	AATTCCATCTGCAATCAGTTTCAGCTTTACCTTCAAAATG
PatG	AAAAGGATCAGTACTGAAAGTGCTACCCCAATGACCATCATG
PatH	GAAGAAATTCAAGCGCTGAAGAGTTCATCCTCGATAAGTGCCTCTTAACTATG
PatI	ACTTTCCGGCCATCTATCAACGCTATG
PatJ	ACGTATTCTTTAGAAGAAGAGATCCAATATTTATGACTCTGCTGTAAAATCAGATTTTTAC CAGTTGGCCAACCTTCAAGCATCACAACAACGATG
PatK	ATTTTCATGAATAAGCTTGACATTGCTAAGGAGATTGCGTCTCCGAACTGCTACTGTCAA AACATG
PatL	ATCTGATTTGTTTTGTCCCTCCACCCCACGCCTCCGTCATG
PatM	CGTCCATTTCCACATTTTCTAGTCGGCAATGTGATTCTTGGTTAATGAAGGGGTTGTGATA GTATTGCAACTTTGCCTATCTTCATAATG
PatN	AAGTCTCTTTATTCGATCTGTTTTCTACTTGTTCCCATTCCCATTTACATTCCAATTTCAATT TCAATTTCAATTTTCAAATTTATTGACAATCATG
PatO	AAATCAATTAGATCTGCTAGATAGCAGGCTTCAAAATG

used in the genome walking assay are reported in Table S2b. The AP1 and AP2 primers, referring to the adaptor primer for the first PCR and nested PCR, were provided in the kit. All the Genome Walker PCR steps were optimized with the Taq DNA Polymerase, using the following thermal cycling parameters: 7 cycles of (94 °C for 25 s; 72 °C for 3 min), 32 cycles of (94 °C for 25 s; 67 °C for 3 min), and 67 °C for an additional 7 min after the final cycle. The products of the primary PCR were diluted 50× and were used in the secondary PCR reactions, using the same program as above with fewer cycles: 5 cycles for the first step and 20 cycles for the second. The secondary PCR products were purified as described below.

2.2.4. Amplification of the 3′ and 5′ cDNA ends

RACE-PCR was used in order to obtain the full-length cDNA sequences of all the genes involved in patulin biosynthesis in *P. expansum*. For this purpose, total RNA was isolated from a 4-day-old *P. expansum* static culture grown in liquid Czapek-glucose medium. The harvested fungal material was ground with the FastPrep apparatus (MP Biomedicals, Illkirch, France) and total RNA was extracted and purified as previously described (Puel et al., 2007). The RNA pellets were solubilized in 50 μL of nuclease free water. The reverse transcription and rapid amplification of cDNA ends were carried out using the GeneRacer RACE Ready cDNA Kit (Invitrogen, Life Technologies SAS, Saint Aubin, France) as specified by the manufacturer. Two sets of primary and nested gene-specific primers that targeted the 3′ and 5′ ends of the cDNA were designed based on the sequence information of each gene (Table S3).

2.2.5. DNA sequencing and data analysis

Before sequencing, all the PCR products were purified with GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), according to the manufacturer's recommendations. In some cases DNA fragments were isolated and then purified from TBE-buffered agarose gels using the QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France). Two sequencing reactions, one for each primer, were performed for all the purified PCR products by the Genomic platform GeT-Purpan (Toulouse, France).

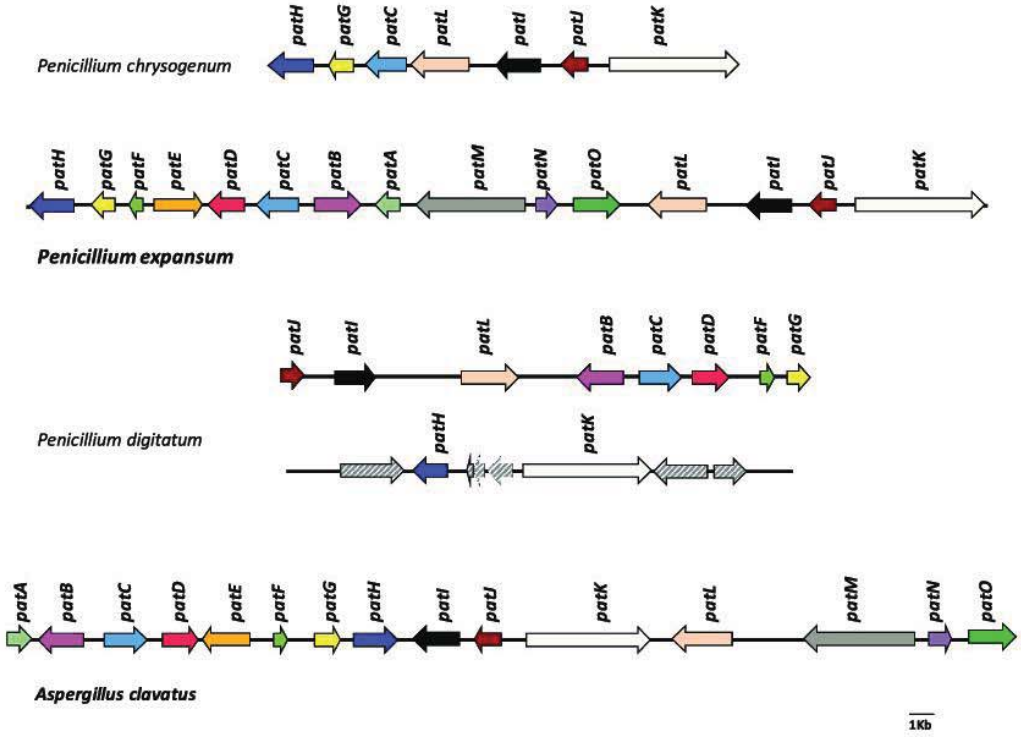


Fig. 1. Schematic representation of the patulin gene cluster in *P. expansum* and comparison of gene organization with three other fungal species that contain some genes related to patulin production or the entire patulin cluster. The direction of transcription is indicated by arrowheads and homologous genes are designated with the same color. The dashed arrows in *P. digitatum* represent genes that are not present in the patulin cluster. The genes, as well as the intergenic regions, are drawn to scale. The patulin cluster of *P. chrysogenum* (ATCC 28089) refers to the work of Van den Berg et al. (2008), that of *P. digitatum* (PHI26) to the study by Marcet-Houben et al. (2012), whereas the putative patulin cluster in *A. clavatus* (NRRL 1) is revised from Artigot et al. (2009). In bold are effective patulin producer species.

2.3. Expression kinetics of the patulin gene cluster

2.3.1. Culture conditions

About 10^6 conidia from a 7-day old *P. expansum* preculture on PDA were used to inoculate the center of two different lots of agar plates overlaid with sterilized cellophane discs. The first set contained 20 mL of Eagle's minimal essential medium (MEM) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) supplemented with 5% sterile fetal calf serum, which includes higher concentrations of amino acids but traces of glucose, to generate the restrictive conditions for patulin production. The second set contained 20 mL of apple-based medium as a permissive substrate for patulin production. The apple-based medium was prepared as described by Baert et al. (2007) to mimic the naturally occurring conditions of *P. expansum*. This substrate is very rich in carbohydrates, especially fructose and sucrose that are essential for patulin synthesis. The pH was measured with HI 99161 pH-meter (Hanna Instruments, Tanneries, France) before inoculation and at the end of the experiment. The analyses of each media were done on a set of five identical culture dishes and the kinetic studies were carried out on the third, fifth and seventh days of culture at 25 °C.

2.3.2. RNA isolation, DNase treatment and reverse transcription

Following mycelial growth, each cellophane disk, along with the fungus, was removed and ground to a fine powder under liquid nitrogen. The mycelial powder was then transferred to 1.5 mL Eppendorf tubes (2/3 full), to which 760 μL of Lysis buffer [10 μL of β-mercaptoethanol (Applied biosystem) and 750 μL of RLT buffer (Rneasy mini kit, QIAGEN)] were added according to Leite et al. (2012). The lysate was then transferred into QIAshredder spin columns (QIAGEN) and centrifuged for 2 min at 20 °C. The supernatant was processed according to the Rneasy mini kit (QIAGEN) protocol, starting from RNA precipitation by adding 350 μL of cold ethanol. In the final step, RNA was eluted in 30 μL of RNase free water and kept at −80 °C for a better conservation. The RNA purity and concentration were determined by NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer. Extracted RNA was treated with 1 U DNase I (Sigma-Aldrich) as specified by the manufacturer. For cDNA synthesis, 5 μg of DNase-treated RNA (per 20 μL reaction) was used along with the Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase (RT). To detect the remaining genomic DNA contamination, an RT minus control was always included as a negative control reaction in which no reverse transcription takes place.

2.3.3. Expression kinetics of the patulin biosynthetic pathway genes in *P. expansum*

Real-time PCR was used to quantitatively evaluate the expression kinetics of the patulin gene cluster in *P. expansum*. First, a set of specific primers was designed to amplify a 50–100 bp fragment from each gene of the patulin cluster, and the housekeeping gene (ß-tubulin). The primer sequences of the housekeeping gene were deduced from a part of the *P. expansum* β-tubulin gene sequence published in GenBank (accession number: AY674400). For all the genes, one of the primers was chosen to span an exon/intron junction to prevent undesirable amplification of genomic DNA, whereas the second primer was complimentary to an exon. The possibility of primer-dimer and self-complementary formation was estimated using PrimerExpress 1.0 software (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and the primers used in the reactions are listed in Table S4. All the assay reactions were carried out in 384 well-plates on a ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Forster City, CA, United States), using the two-step cycling program: 95 °C, 10 min; 45 cycles of (95 °C, 15 s and 60 °C, 60 s). A dissociation curve analysis was done to confirm the specificity of the amplification. The amplifications were performed in a total volume of 5 μL [2.5 μL of SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), an appropriate volume for each primer, plus 1 μL sample (cDNA or RT minus control diluted (1:20 v:v)].

2.4. Patulin extraction and HPLC analysis

After the appropriate incubation period, the agar media, which were overlaid with cellophane discs, were scraped off the Petri plates, cut into strips, and macerated for 2 days in 50 mL of ethyl acetate. The organic phase was then filtered through Whatman filter paper, grade 1 (Whatman, GE Healthcare, Kent, UK) and reduced with a rotary evaporator and then with a Zymark TurboVap (McKinley Scientific, Sparta, NJ, United States) with dry nitrogen. The final residue was dissolved in 500 μL of methanol/water (80/20) and then filtered through a 0.45 μm Teflon filter (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Twenty five microliter aliquots of these filtered extracts were injected onto the Ultimate 3000 HPLC system (Dionex/ThermoScientific, Courtaboeuf, France) for the quantitative determination of the patulin concentration. The patulin was quantified by HPLC with diode-array detection with a 250 × 4.60 mm Gemini 5 μm C6-Phenyl column (Phenomenex, Torrance, CA, United States) at a flow rate of 0.9 mL/min. A gradient program was used with 0.2% acetic acid (Eluent A) and methanol (eluent B) and the following elution conditions: 0 min 100% B, 10 min 90% B, 30 min 50% B, 45 min 90% B, from 45 to 50 min 90% B, and from 60 to 65 min 0%

Table 2
The positions of transcription initiating and terminating nucleotides, the translation start and stop codons of all the genes involved in patulin biosynthesis in *P. expansum*, the number of introns and their respective positions within each gene. The genes encoding sens transcripts are in bold type, while those encoding anti-sens transcripts appear in regular font.

Gene	Transcription initiating and terminating nucleotides	Positions of the translation start and stop codons	Number of introns	Intron position
patH	18–2085	195–2035	4	653–742 1316–1366 1747–1818 1883–1936
patG	2669–3873	2810–3834	1	3733–3782
patF	4182–4986	4350–4949	0	
patE	**5300–7394**	**5362–7362**	**2**	**5740–5792** **7255–7315**
patD	7471–9200	7640–9147	6	7690–7751 7891–7983 8019–8088 8512–8642 8724–8795 8909–8965
patC	9432–11,530	9636–11,387	2	10,668–10,722 10,868–10,923
patB	**12,029–14,133**	**12,080–14,006**	**3**	**12,194–12,267** **12,784–12,863** **13,287–13,373**
patA	14,500–15,785	14,650–15,690	4	14,912–14,981 15,028–15,108 15,220–15,295 15,492–15,555
patM	16,194–20,894	16,342–20,894	6	16,468–16,537 18,489–18,555 18,822–18,874 19,940, 20,005 20,246–20,310 20,609–20,657
patN	**21,260–22,299**	**21,354–22,249**	**2**	**21,400–21,462** **21,706–21,758**
patO	**22,914–24,873**	**22,914–24,873**	**4**	**23,174–23,236** **23,438–23,494** **24,452–24,522** **24,641–24,693**
patL	26,056–28,549	26,056–28,511	1	28,217–28,272
patI	29,997–32,056	30,147–32,032	4	30,593–30,725 30,878–30,942 31,741–31,797 31,862–31,911
patJ	32,588–33,869	32,661–33,776	2	33,138–33,193 33,645–33,723
patK	**34,550–40,190**	**34,613–40,016**	**1**	**34,700–34,772**

B. The presence of patulin was monitored at a wavelength of 277 nm. Patulin was identified by its retention time (min) according to a standard (Sigma-Aldrich) and quantified by measuring peak area according to standard curve. Results were expressed as μg/mL of culture medium.

2.5. Nucleotide sequence accession number and sequence analysis

The patulin gene cluster sequence was deposited in the GenBank database with accession number KF899892. The raw sequencing data are available online and can be downloaded on the following link: https://secure.yazibadrive.net/my/FolderLink/73894926-41f6-fd72-228b-5494c948584b/false.

The gene sequences were submitted to AUGUSTUS program (http://bioinf.unigreifswald.de/augustus/submission) to obtain intron predictions (Stanke et al., 2004). The membrane-targeting hydrophobic segments were located in some proteins using the TMpred program (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html).

The presence of signal peptide sequence and N-glycosylation sites was sought using SignalP 4.0 (Petersen et al., 2011) and NetNGlyc 1.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/).

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the patulin gene cluster in P. expansum and its evolution across species

In this study, the overall well-organized patulin pathway gene cluster was sequenced in *P. expansum*, the causal agent of blue mold rot and the main source of patulin in food. The strategy used was based on (i) the putative patulin cluster described in the patulin non-producing strain of *A. clavatus* NRRL 1 (Artigot et al., 2009), (ii) the existence of a nonfunctional "fossil" patulin cluster in *P. chrysogenum* and *P. digitatum* (Marcet-Houben et al., 2012; Puel et al., 2010), and (iii) the availability in GenBank of some orthologous genes in *P. griseofulvum*. The work was built up in three steps. Firstly, after alignments of sequences of some available orthologous genes, primers specific to conserved region of these genes were designed in order to amplify and sequence large fragments of genes. In the second phase, the inter-gene regions were amplified in order to link genes together and obtain gene islands. In the third step, in order to reconstitute the cluster, GeneWalking methodology was used to obtain the sequences of the remaining genes not yet sequenced and to link islands together. The 5′UTR and 3′UTR sequences including respectively the translation initiation point and the poly-adenylation signal site were experimentally determined by comparing the sequence of the RACE-PCR product with the genomic sequence. For a better location of start codons, a search of the Kozak consensus sequence was carried out for each gene (Bruchez et al., 1993). The 5′-UTR sequences including the translation initiation and the start codons are shown in Table 1. After analysis, all the genes showed a unique unambiguous start codon except the *patG* gene which had two putative start codons located respectively at positions +31 and +40. The comparison with the *A. clavatus patG* gene that has only one start codon, suggests that the second ATG codon could be the real start codon (Snini et al., 2014). The intron positions within the gene sequences were determined by alignment with the cDNA sequences of their orthologous genes in *A. clavatus*. These positions were subsequently confirmed using the trained gene prediction software Augustus (Stanke et al., 2004). The patulin gene cluster in *P. expansum* contains 15 genes gathered together in a 40,217 bp DNA region (Fig. 1). The coordinates of all the genes involved in patulin

Table 3
Comparison between patulin gene cluster sequences of the two *P. expansum* strains NRRL 35695 and ATCC 24692.

	Gene homology (similar positions/total nucleotides)	Coding sequence homology (similar positions/total nucleotides)	Protein sequence identity (similar positions/total amino acids)	Intron number (size of intron)
patA	1041/1041	750/750	249/249	4 1(64) 2(76) 3(81) 4(70)
patB	1925/1929	1684/1686	561/561	3 1(74) 2(80) 3(87)
patC	1751/1752	1640/1641	546/546	2 1(56) 2(55)
patD	1502/1508	1018/1023	340/340	6 1(57) 2(72) 3(131)[a] 4(70) 5(93) 6(62)
patE	1993/2001	1880/1887	628/628	2 1(53)[b] 2(61)
patF	599/600	599/600	199/199	0
patG	1021/1025	971/975	323/324	1 1(50)
patH	1832/1842	1570/1575	524/524	4 1(53) 2(72)[c] 3(51) 4(90)
patI	1886/1886	1581/1581	526/526	4 1(50) 2(57) 3(65) 4(133)
patJ	1116/1116	981/981	326/326	3 1(79) 2(56) 3(73)
patK	5392/5404[d]	5319/5331[d]	1776/1776[d]	1 1(73)[e]
patL	2456/2456	2400/2400	799/799	1 1 (56)
patM	4539/4553	4174/4185	1389/1394	6 1(49) 2(65)[f] 3(64) 4(53) 5 (67) 6(70)[g]
patN	994/996	778/780	259/259	2 1(63) 2(53)
patO	1956/1960	1712/1716	569/571	4 1 (63) 2 (57) 3(71) 4(53)

[a] 1 nucleotide difference in the third intron between NRRL 35695 and ATCC 24692.
[b] 1 nucleotide difference in the first intron between NRRL 35695 and ATCC 24692.
[c] 5 nucleotide differences in the second intron between NRRL 35695 and ATCC 24692.
[d] Insertion of three nucleotides in ATCC 24692 strain at 2403 position leading to the insertion of 1 supplementary amino acid residue.
[e] In ATCC 24692 strain the unique intron is not detected.
[f] 2 nucleotide differences in the second intron between NRRL 35695 and ATCC 24692.
[g] 1 nucleotide difference in the sixth intron between NRRL 35695 and ATCC 24692.

biosynthesis in *P. expansum*, including the positions of transcription initiating and terminating nucleotides, the translation start and stop codons and the intron positions within each gene are grouped in Table 2. Towards the end of the present work, the genome sequence of another *P. expansum* strain ATCC 24692 was made publicly available by the DOE JGI since October 1st, 2013 (http://genome.jgi.doe.gov/Penex1/Penex1.home.html). The two patulin gene clusters of the *P. expansum* strains were compared. Differences in the coding sequences of the *patG*, *patK*, *patM* and *patO* genes have led to some amino acid differences (Table 3). An insertion in the ATCC 24692 strain of three base pairs in the *patK* gene sequence has led to an insertion of one amino acid. No information on the patulin production capacity of ATCC 24692 is available in the literature, so the impact of these differences on the production of patulin is difficult to assess.

In order to understand the evolution of the patulin gene cluster across different genomes, the gene organization of the patulin cluster in *P. expansum* was compared to three other species (*A. clavatus*, *P. chrysogenum* and *P. digitatum*) containing parts of or the entire patulin biosynthesis cluster in their genome. DNA and amino acid sequences were compared using the basic local alignment search tool (BLAST) at NCBI. Supplementary comparisons were done with the alignment functions in EMBL-EBI (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa). These comparisons revealed variable percentages of identical nucleotides (60–70%) and identical amino acids (70–90%) depending on the gene (Table S5).

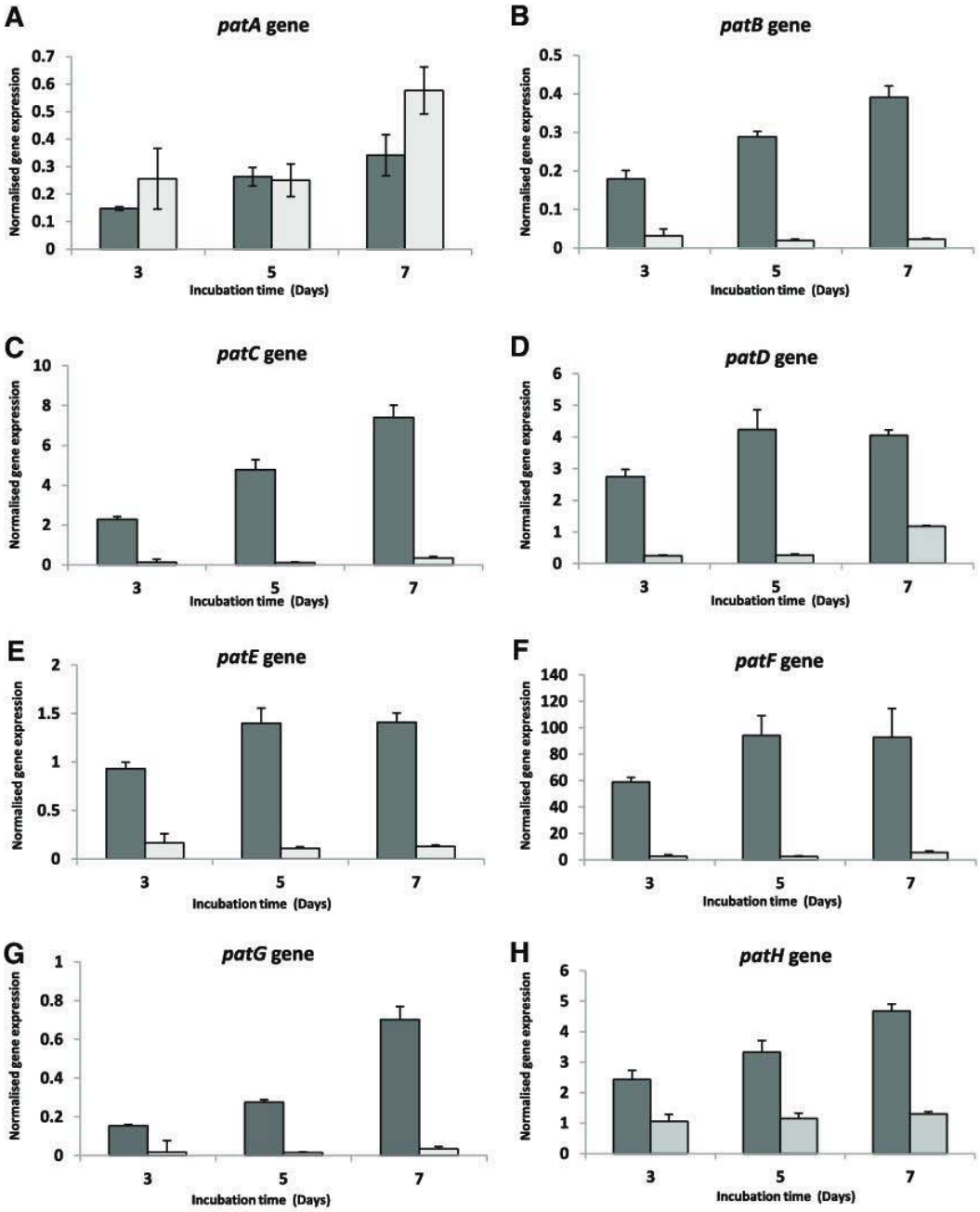


Fig. 2. Time coordinated expressions of the putative patulin biosynthesis genes in *P. expansum* under patulin-permissive and restrictive conditions on APAM (■) and MEM (□), respectively. Relative expression values are the averages of five replicates for each day of culture with standard deviations shown as error bars.

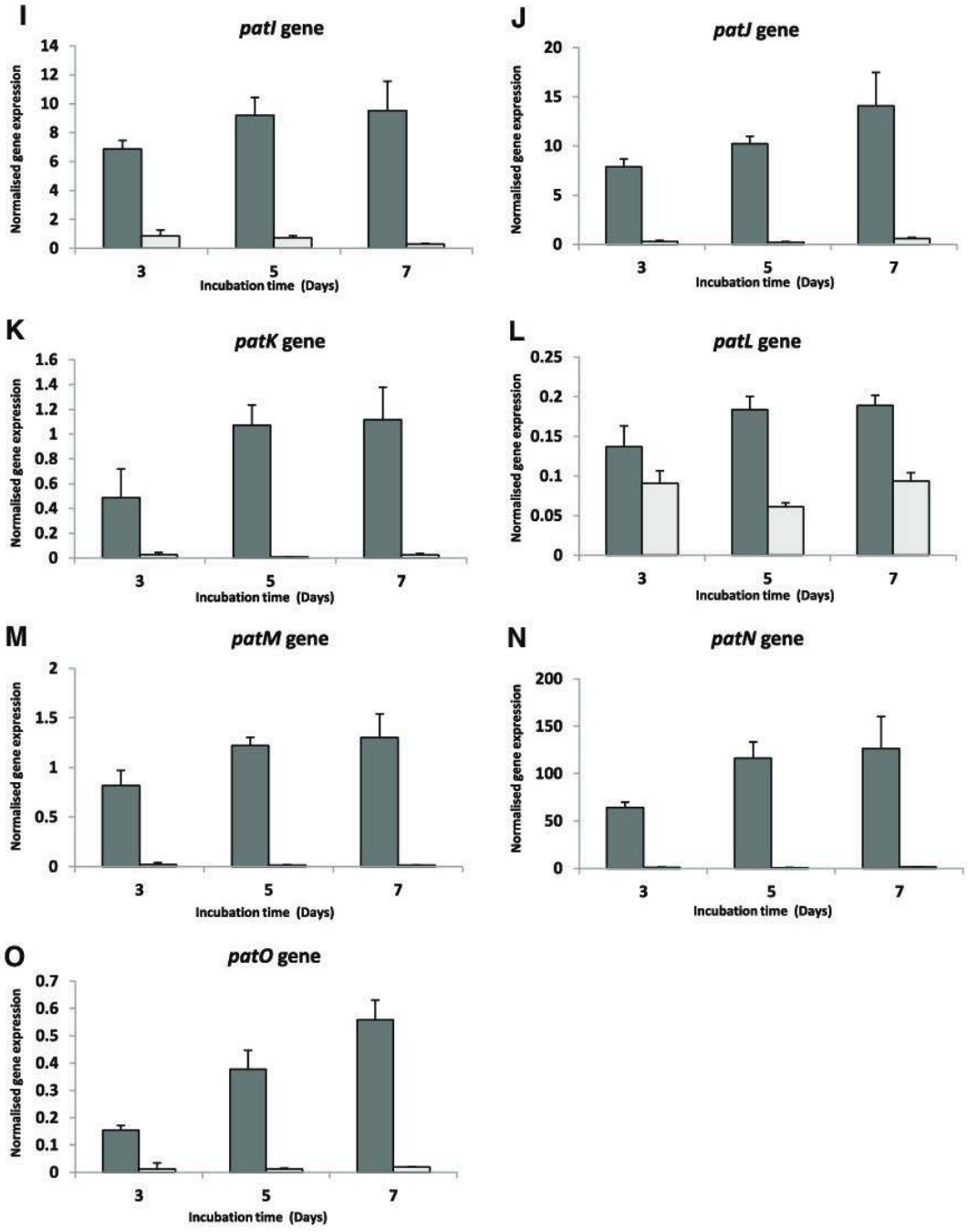


Fig. 2 (*continued*).

The comparison of the chromosomal organization is shown in Fig. 1. The patulin gene cluster in *A. clavatus* and *P. expansum* shares the same number of genes. Although *A. clavatus* is known for its ability to produce patulin, the sequenced strain NRRL1 was deemed non-productive. This could probably be explained by a mutation in the promoter or the coding sequence of one of the 15 genes. Moreover, there was a notable difference in the gene order in the patulin cluster in *A. clavatus* compared with *P. expansum*. Indeed, in *P. expansum* the first and the last genes of the cluster are *patH* and *patK* whereas in *A. clavatus* the first and the last genes are *patA* and *patO*. Going into the details, we noted that the transcription factor (*patL*) shared a common locus and orientation for transcription between those two distant species, whereas the two groups of genes surrounding the gene *patL* have switched places while keeping the same orientation. In the case of the first half of the patulin cluster, it is clear that the order of the first eight genes is highly conserved among the two species but these genes have rotated by changing their directions. The sequencing of the whole *P. expansum* patulin cluster shed light on the evolution of the patulin cluster in two phylogenetically close species to *P. expansum*, i.e. *P. chrysogenum* and *P. digitatum*. These last two species possess part of the patulin gene cluster in their genome and these genes share high percentages of sequence identity with *P. expansum* (70–90%). *P. digitatum* sequences possess a higher identity than those of *P. chrysogenum*, showing a closer relationship between *P. digitatum*

and *P. expansum* previously established on the basis of β-tubulin (Samson et al., 2004). Surprisingly *patH* and *patK* that are located in another scaffold in *P. digitatum* exhibit lower identity.

The two groups of genes delineating the left and the right ends of the patulin cluster in *P. expansum* (*patH* and *patG* on one hand and *patL*, *patI*, *patJ* and *patK* on the other hand) have a conserved order as well as orientation in *P. chrysogenum* (Fig. 1), though this species has lost almost all of the essential genes for patulin biosynthesis found in the middle of the cluster in *P. expansum*. The absence of 8 genes explains its inability to produce patulin. By comparing this partial *P. digitatum* patulin cluster to that of *P. expansum*, three groups of genes were found to be conserved in *P. digitatum* with a reversed direction of transcription compared to *P. expansum* (Fig. 1).

Overall, the comparative analysis of complete and partial patulin clusters across the four species revealed some degree of mesosynteny conservation. These regions of similarity described refer to synteny blocks which are groups of genes whose order has been preserved along the chromosomes in two or more genomes (Drillon, 2013). These blocks are very useful in tracing the evolution of the genome. The conservation of gene clusters across multiple genomes was previously investigated for other classes of mycotoxins. A comparative analysis of complete and partial aflatoxin clusters across five *Aspergillus* species was performed in a study by Carbone et al. (2007). The genomic searches revealed a conservation of gene order and direction of transcription for specific groups of two or more aflatoxin pathway genes. In the same perspective, the variation in the genomic context of the fumonisin gene cluster among species was examined during the evolutionary diversification of *Fusarium* species (Proctor et al., 2013).

In addition, a search for a signal peptide and N-glycosylation sites (Asn-Xaa-Ser/thr) was performed in each protein encoded by the genes of patulin cluster. Four proteins, PatB, PatE, PatF and PatO, whose functions remain obscure, had putative signal peptides in their N-terminal extremities and several putative N-glycosylation sites. The presence of these features suggests that these proteins can enter into the endoplasmic reticulum/Golgi secretory pathway, and can either be inserted into cell or organelle membranes, or can reside in organelles. The secretion of protein from the cell is not to be excluded. Such enzyme with signal peptide has already been identified in aflatoxin biosynthesis. Versicolorin B synthase (VBS) catalyzes the transformation of versiconal into versicolorin B. A body of evidence strongly suggests that VBS is transported within secretory vesicles via the classical secretory pathway (Chiou et al., 2004; Roze et al., 2011). PatE shares 59% similarity with VBS and like VBS contains putative N-glycosylation sites added to a signal peptide. Based on these similarities, it appears likely that PatE is translocated to secretory vesicles. Given that PatB, PatF, and PatO share the same features as PatE, it is reasonable to speculate that these proteins are localized with PatE in vesicles. On the basis of a similar chemical structure, it has been suggested that PatE is responsible for the final step leading to patulin biosynthesis (Artigot et al., 2009). The sequestration of the last enzyme and its end-product within vesicles could allow the fungus to be protected against the high toxicity of patulin.

3.2. Kinetics of the patulin biosynthetic genes expression under permissive and restrictive conditions

Finally, the expression of the different genes of the cluster was analyzed under both patulin-permissive and -restrictive conditions using natural apple-based medium (APAM) and MEM medium supplemented with 5% sterile fetal calf serum, respectively. In each culture medium, the patulin content was quantified by HPLC, at different time intervals (3, 5, 7 days). At the same time points, the expression of the patulin genes was measured by qRT-PCR. Gene expression levels were normalized to the reference gene β-tubulin.

As expected, when *P. expansum* was grown on MEM medium, the patulin production was limited to a basal level: day 3 (0.06 μg/mL), day 5 (0.24 μg/mL) and day 7 (0.73 μg/mL). According to the amount of patulin, the expression of all the genes, except *patA*, was down-regulated and remained at a basal level, when the fungus was grown under patulin-restrictive conditions (Fig. 2). By contrast, during *P. expansum* growth on APAM medium, the patulin concentration increased with culture duration: day 3 (8.90 μg/mL), day 5 (30.04 μg/mL) and day 7 (62.37 μg/mL) (Fig. 3). Under patulin-permissive conditions, the expression of all the genes was high and increased with culture duration (Fig. 2).

As already mentioned, the *patA* gene that encodes a putative acetate transporter (40% similarity with *A. nidulans* acetate permease A (AcpA) (Robellet et al., 2008)) showed an excessive expression under patulin-restrictive conditions (Fig. 2A), indicating that the *patA* gene transcription is regulated differently from transcription of the other cluster genes. The involvement of an acetate transporter appears coherent, since the first step of the patulin biosynthetic pathway, catalyzed by the 6MSAS enzyme (Beck et al., 1990), is a condensation of acetate and malonate units. Although a large number of polyketides biosynthesis pathways need an acetate starter unit, the involvement of an acetate transporter in secondary metabolite synthesis has not been reported yet. The presence of this kind of transporter in the fungal genomes is limited when compared to the number of polyketide clusters. Thus, PatA could be shared by another secondary metabolite pathway induced by the patulin restrictive conditions. It will be interesting to determine the location of this transporter inside the cell, as well as the other two transporters involved in the biosynthetic pathway of patulin in order to understand their functional role in patulin synthesis and the spatial organization of patulin biosynthesis. The recent demonstration of involvement of vesicles in aflatoxin biosynthesis (Chanda et al., 2009) and the hypothesis of a subcellular compartmentalization of patulin biosynthesis pathway could explain the presence of three transporter genes in the cluster.

Under patulin-restrictive conditions, the putative patulin pathway-specific regulator *patL* showed a higher expression than the rest of the genes but still lower than its expression under permissive conditions (Fig. 2L). Assuming *patL* works as an interrupter, the fact that its expression was not totally suppressed under patulin-restrictive conditions clearly explains the low but detectable patulin production. In our study the pH was measured on the first and last days of the culture. Results show that the APAM medium is strongly acidic with a pH of 3.57 compared to the MEM medium with an initial pH of about 6.33. At the end of the experiment, both media were acidified; the pH of APAM fell to 3.12 whereas that of MEM considerably decreased to reach 5.18. pH plays role in the regulation of secondary metabolites production in filamentous fungi. For instance, acidic pH is required to the production of sterigmatocystin (Keller N.P. et al., 1997), fumonisins (Keller S.E. et al., 1997) trichothecenes (Merhej et al., 2011) whereas alkaline pH is conducive to the penicillin production in *A. nidulans* (Espeso et al., 1993). The involvement of PacC in the regulation of mycotoxin production

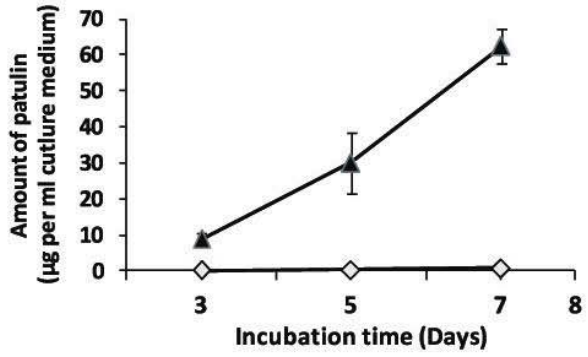


Fig. 3. Patulin production by *P. expansum* grown under patulin-permissive (▲) or restrictive conditions ( ), measured by HPLC-DAD at 277 nm and expressed in μg/mL of culture medium. Five replicates were performed for each day of culture.

has been previously reported for fumonisins, fusaric acid and trichothecenes respectively in *F. verticillioides*, *F. fujikuroi* and *F. graminearum* (Flaherty et al., 2003; Niehaus et al., 2014; Merhej et al., 2011). PacC is a zinc finger transcription factor activated by proteolytic processing in response to ambient alkaline pH. At ambient alkaline pH, the processed PacC form is localized in the nuclei (Mingot et al., 2001). Putative regulatory factor PacC binding sites (5′-GCCARG-3′) (Suárez and Peñalva, 1996) were detected not only in *patL* gene promoter region (1 sens (5′-GCCAAG-3′) and 2 antisens (1 (5′-CTTGGC-3′) and 1 (5′-CCTGGC-3′) but also with an abnormal frequency in *patK* (7 sens (6 (5′-GCCA AG-3′) and 1 (5′-GCCAGG)) and 6 antisens (5 (5′-CCTGGC-3′) and 1 (5′-CTTGGC-3′)), *patH* (2 sens (1 (5′-GCCAAG-3′) and 1 (5′-GCCAGG-3′)) and 3 antisens (5′-CCTGGC-3′)) and *patI* (4 sens (5′-GCCAAG-3′) and 2 antisens (5′-CTTGGC-3′)) coding sequences. All three genes are involved in early steps of patulin biosynthesis pathway. The presence of a great number of putative PacC binding sites could suggest that PacC binds on the coding sequences of some *pat* genes and prevents their transcription at ambient alkaline pH. In apples, the production of patulin occurs under acidic pH and is more particularly accompanied by a further acidification of the fruit tissue due to the secretion by *P. expansum* of organic acids such as gluconic acid (Prusky et al., 2004). This hypothesis is also strengthened by a previous study describing a weak patulin producer strain of *P. expansum* which was unable to acidify the substrate (Neri et al., 2010). To date, few data on the effect of pH on patulin production are available in the literature. However, in a recent study, it was shown that PacC-RNAi mutants accumulated less patulin in comparison to wild type strains, suggesting by contrast the positive involvement of PacC in the regulation of patulin biosynthesis (Barad et al., 2014). The involvement of PacC in patulin biosynthesis should be clarified with the generation of a mutant strain expressing $Pac1^{c}$ constitutively active form. Moreover, the possible bindings of activated PacC form to putative binding sites located in *patL* promoter and in *patK*, *patH* and *patI* coding sequences should be checked by mobility shift assays.

The lack of patulin production on MEM may not be solely caused by the pH difference, since it may also rely on many other factors, such as the carbohydrates and nitrogen content. The level of nutrient nitrogen in the culture is a major factor determining when the patulin pathway is activated. The effect of ammonium on patulin pathway enzymes was well-documented (Rollins and Gaucher, 1994). In *Penicillium grisofulvum*, a reduction in the extracellular ammonium ion concentration from 30 mM to 4 mM is required to initiate the derepression/induction process. By contrast, the addition of 30 mM ammonium chloride provokes a harsh decrease of *6msas* (*patK*) and *idh* (*patN*) gene expression levels (Fedeshko, 1992). Analysis of the promoter regions revealed the presence of nitrogen regulatory factor protein NRFA (an AreA orthologous protein in *Penicillium sp.*) binding sites (5′-GATA-3′) in all promoter regions except for the *patG* gene. The loss of purine bases immediately adjacent to the GATA core sequences reducing drastically NRFA binding, the 5′RGATA-3′ and 5′GATAR-3′ sequences have been specifically searched (Haas and Marzluf, 1995).

4. Conclusion

Despite the fact that patulin is prominent on the list of the major mycotoxins, not much is known about the genetic bases of its production. From a biochemical point of view, a large part of the biosynthesis pathway was clarified by old studies on *P. griseofulvum* (formerly *P. urticae* and *P. patulum*), a telluric species isolated sometimes from rice and other cereals. Regarding the genetic bases, a putative cluster was proposed by our team based on the sequence of the patulin non-producing strain of *A. clavatus* NRRL 1 (Artigot et al., 2009). Out of the 15 genes, only five have been identified (*patG*, *patH*, *patI*, *patK* and *patN*) in *P. griseofuvlum*, *B. nivea* or *A. clavatus*. Three studies describe partial or total sequence of *patK* (*6msas*), *patM* (*ABC transporter*) and *patN* (*idh*) in *P. expansum* (Sanzani et al., 2012; White et al., 2006; Dombrink-Kurtzman, 2007). This latter species has the greatest economic and public health concern because of its ability to contaminate apples and to produce patulin. In the present study, the patulin biosynthetic gene cluster from *P. expansum* was sequenced and analyzed. The conception of strategies to limit the contamination level of patulin in pomaceous fruits requires a knowledge of the molecular mechanisms involved when *P. expansum*, the agent of blue mold decay, grows inside the fruit. The present work constitutes the first step for the understanding of patulin biosynthesis in *P. expansum*.

Supplementary data to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.028.

Acknowledgments

This research was supported in part by the National Council for Scientific Research (CNRS), Lebanon and by the Research Council of Saint-Joseph University (Lebanon), the two organizations that have funded the doctoral studies of Miss J. Tannous. Selma Snini was supported by a doctoral fellowship funded by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France). We thank Dr. John Woodley for his correction of the original manuscript.

References

Artigot, M.P., Loiseau, N., Laffitte, J., Mas-Reguieg, L., Tadrist, S., Oswald, I.P., Puel, O., 2009. Molecular cloning and functional characterization of two CYP619 cytochrome P450s involved in biosynthesis of patulin in *Aspergillus clavatus*. Microbiology 155, 1738–1747.

Baert, K., Devlieghere, F., Flyps, H., Oosterlinck, M., Ahmed, M.M., Rajković, A., Verlinden, B., Nicolaï, B., Debevere, J., De Meulenaer, B., 2007. Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*. Int. J. Food Microbiol. 119, 170–181.

Baert, K., Devlieghere, F., Amiri, A., De Meulenaer, B., 2012. Evaluation of strategies for reducing patulin contamination of apple juice using a farm to fork risk assessment model. Int. J. Food Microbiol. 154, 119–129.

Barad, S., Horowitz, S.B., Kobiler, I., Sherman, A., Prusky, D., 2014. Accumulation of the mycotoxin patulin in the presence of gluconic acid contributes to pathogenicity of *Penicillium expansum*. Mol. Plant-Microbe Interact. 27, 66–77.

Beck, J., Ripka, S., Siegner, A., Schiltz, E., Schweizer, E., 1990. The multifunctional 6-methylsalicylic acid synthase gene of *Penicillium patulum*. Its gene structure relative to that of other polyketide synthases. Eur. J. Biochem. 192, 487–498.

Bojja, R.S., Cerny, R.L., Proctor, R.H., Du, L., 2004. Determining the biosynthetic sequence in the early steps of the fumonisin pathway by use of three gene-disruption mutants of *Fusarium verticillioides*. J. Agric. Food Chem. 52, 2855–2860.

Brandon, E.F.A., Baars, A.J., Te Biesebeek, J.D., Oomen, A.G., Bakker, M.I., De Heer, C., 2012. Risk assessment of patulin intake from apple containing products by young children. World Mycotoxin J. 5, 391–403.

Brown, D.W., Yu, J.H., Kelkar, H.S., Fernandes, M., Nesbitt, T.C., Keller, N.P., Adams, T.H., Leonard, T.J., 1996. Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 1418–1422.

Bruchez, J.J.P., Eberle, J., Russo, V.E.A., 1993. Regulatory sequences involved in the translation of *Neurospora crassa* mRNA: kozak sequences and stop codons. Fungal Genet. Newsl. 40, 89–97.

Carbone, I., Ramirez-Prado, J.H., Jakobek, J.L., Horn, B.W., 2007. Gene duplication, modularity and adaptation in the evolution of the aflatoxin gene cluster. BMC Evol. Biol. 7, 111.

Chanda, A., Roze, L.V., Kang, S., Artymovich, K.A., Hicks, G.R., Raikhel, N.V., Calvo, A.M., Linz, J. E., 2009. A key role for vesicles in fungal secondary metabolism. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 19533–19538.

Chen, L., Ingham, B.H., Ingham, S.C., 2004. Survival of *Penicillium expansum* and patulin production on stored apples after wash treatments. J. Food Sci. 69, C669–C675.

Chiou, C.H., Lee, L.W., Owens, S.A., Whallon, J.H., Klomparens, K.L., Townsend, C.A., Linz, J.E., 2004. Distribution and sub-cellular localization of the aflatoxin enzyme versicolorin B synthase in time-fractionated colonies of *Aspergillus parasiticus*. Arch. Microbiol. 182, 67–79.

Commission regulation (EC), 2003. No. 1425/2003 of 11 August 2003 amending regulation (EC) No. 466/2001 as regards patulin. Off. J. Eur. Union L 203.

Commission Regulation (EC), 2006. No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Off. J. Eur. Union L 364.

Dombrink-Kurtzman, M.A., 2007. The sequence of the isoepoxydon dehydrogenase gene of the patulin biosynthetic pathway in *Penicillium* species. Antonie Van Leeuwenhoek 91, 179–189.

Dombrink-Kurtzman, M.A., Engberg, A.E., 2006. *Byssochlamys nivea* with patulin-producing capability has an isoepoxydon dehydrogenase gene (*idh*) with sequence homology to *Penicillium expansum* and *P. griseofulvum*. Mycol. Res. 110, 1111–1118.

Drillon, G., 2013. Analyse combinatoire des réarrangements chromosomiques et reconstruction des génomes ancestraux chez les eucaryotes. Ph.D Dissertation Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.

Espeso, E.A., Tilburn, J., Arst Jr., H.N., Peñalva, M.A., 1993. pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. EMBO J. 12, 3947–3956.
Fedeshko, R.W., 1992. Polyketide Enzymes and Genes in *Penicillium urticae*. Ph.D Dissertation University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada.
Flaherty, J.E., Pirttilä, A.M., Bluhm, B.H., Woloshuk, C.P., 2003. *PAC1*, a pH-regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. Appl. Environ. Microbiol. 69, 5222–5227.
Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Larsen, T.O., Samson, R.A., 2004. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. Stud. Mycol. 49, 201–242.
Gardes, M., Bruns, T.D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes — application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol. Ecol. 2, 113–118.
Haas, H., Marzluf, G.A., 1995. NRE, the major nitrogen regulatory protein of *Penicillium chrysogenum*, binds specifically to elements in the intergenic promoter regions of nitrate assimilation and penicillin biosynthetic gene clusters. Curr. Genet. 28, 177–183.
Houbraken, J., Samson, R.A., Frisvad, J.C., 2006. *Byssochlamys*: significance of heat resistance and mycotoxin production. Adv. Exp. Med. Biol. 571, 211–224.
Karolewiez, A., Geisen, R., 2005. Cloning a part of the ochratoxin A biosynthetic gene cluster of *Penicillium nordicum* and characterization of the ochratoxin polyketide synthase gene. Syst. Appl. Microbiol. 28, 588–595.
Keller, N.P., Nesbitt, C., Sarr, B., Phillips, T.D., Burow, G.B., 1997. pH regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus* spp Phytopathology 87, 643–648.
Keller, S.E., Sullivan, T.M., Chirtel, S., 1997. Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B1: oxygen and pH. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 19, 305–309.
Kimura, M., Tokai, T., O'Donnell, K., Ward, T.J., Fujimura, M., Hamamoto, H., Shibata, T., Yamaguchi, I., 2003. The trichothecene biosynthesis gene cluster of *Fusarium graminearum* F15 contains a limited number of essential pathway genes and expressed non-essential genes. FEBS Lett. 539, 105–110.
Lee, S., Son, H., Lee, J., Lee, Y.-R., Lee, Y.-W., 2011. A putative ABC transporter gene, *ZRA1*, is required for zearalenone production in *Gibberella zeae*. Curr. Genet. 57, 343–351.
Leite, G.M., Magan, N., Medina, Á., 2012. Comparison of different bead-beating RNA extraction strategies: an optimized method for filamentous fungi. J. Microbiol. Methods 88, 413–418.
Marcet-Houben, M., Ballester, A.R., de la Fuente, B., Harries, E., Marcos, J.F., González-Candelas, L., Gabaldón, T., 2012. Genome sequence of the necrotrophic fungus *Penicillium digitatum*, the main postharvest pathogen of citrus. BMC Genomics 13, 646.
Merhej, J., Richard-Forget, F., Barreau, C., 2011. The pH regulatory factor Pac1 regulates Tri gene expression and trichothecene production in *Fusarium graminearum*. Fungal Genet. Biol. 48, 275–284.
Mingot, J.M., Espeso, E.A., Díez, E., Peñalva, M.A., 2001. Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. Mol. Cell. Biol. 21, 1688–1699.
Moake, M.M., Padilla-Zakour, O.I., Worobo, R.W., 2005. Comprehensive review of patulin control methods in foods. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 4, 8–21.
Morales, H., Sanchis, V., Coromines, J., Ramos, A.J., Marín, S., 2008. Inoculum size and intraspecific interactions affects *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in apples. Food Microbiol. 25, 378–385.
Neri, F., Donati, I., Veronesi, F., Mazzoni, D., Mari, M., 2010. Evaluation of *Penicillium expansum* isolates for aggressiveness, growth and patulin accumulation in usual and less common fruit hosts. Int. J. Food Microbiol. 143, 109–117.
Niehaus, E.M., Von Bargen, K.W., Espino, J.J., Pfannmüller, A., Humpf, H.U., Tudzynski, B., 2014. Characterization of the fusaric acid gene cluster in *Fusarium fujikuroi*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98, 1749–1762.
Petersen, T.N., Brunak, S., Von Heijne, G., Nielsen, H., 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nat. Methods 8, 785–786.
Proctor, R.H., Van Hove, F., Susca, A., Stea, G., Busman, M., Van der Lee, T., Waalwijk, C., Moretti, A., Ward, T.J., 2013. Birth, death and horizontal transfer of the fumonisin biosynthetic gene cluster during the evolutionary diversification of *Fusarium*. Mol. Microbiol. 90, 290–306.
Prusky, D., McEvoy, J.L., Saftner, R., Conway, W.S., Jones, R., 2004. Relationship between host acidification and virulence of *Penicillium* spp. on apple and citrus fruit. Phytopathology 94, 44–51.
Puel, O., 2007. Bases moléculaires de la voie de biosynthèse de la patuline, mycotoxine produite par *Byssochlamys nivea* et *Penicillium griseofulvum*. Ph.D Dissertation Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse, France.
Puel, O., Tadrist, S., Delaforge, M., Oswald, I.P., Lebrihi, A., 2007. The inability of *Byssochlamys fulva* to produce patulin is related to absence of 6-methylsalicylic acid synthase and isoepoxydon dehydrogenase genes. Int. J. Food Microbiol. 115, 131–139.
Puel, O., Galtier, P., Oswald, I.P., 2010. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. Toxins 2, 613–631.
Robellet, X., Flipphi, M., Pégot, S., Maccabe, A.P., Vélot, C., 2008. AcpA, a member of the GPR1/FUN34/YaaH membrane protein family, is essential for acetate permease activity in the hyphal fungus *Aspergillus nidulans*. Biochem. J. 412, 485–493.
Rollins, M.J., Gaucher, G.M., 1994. Ammonium repression of antibiotic and intracellular proteinase production in *Penicillium urticae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41, 447–455.
Roze, L.V., Chanda, A., Linz, J.E., 2011. Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes. Fungal Genet. Biol. 48, 35–48.
Sagaram, U.S., Shim, W.B., 2006. Regulation of fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*–maize system. Plant Pathol. J. 22, 203–210.
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.
Sanzani, S.M., Reverberi, M., Punelli, M., Ippolito, A., Fanelli, C., 2012. Study on the role of patulin on pathogenicity and virulence of *Penicillium expansum*. Int. J. Food Microbiol. 153, 323–331.
Snini, S.P., Tadrist, S., Laffitte, J., Jamin, E.L., Oswald, I.P., Puel, O., 2014. The gene *PatG* involved in the biosynthesis pathway of patulin, a food-borne mycotoxin, encodes a 6-methylsalicylic acid decarboxylase. Int. J. Food Microbiol. 171, 77–83.
Stanke, M., Steinkamp, R., Waack, S., Morgenstern, B., 2004. AUGUSTUS: a web server for gene finding in eukaryotes. Nucleic Acids Res. 32, W309–W312.
Suárez, T., Peñalva, M.A., 1996. Characterization of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent pcbAB-pcbC promoter of the penicillin biosynthetic cluster. Mol. Microbiol. 20, 529–540.
Van den Berg, M.A., Albang, R., Albermann, K., Badger, J.H., Daran, J.-M., Driessen, A.J.M., Garcia-Estrada, C., Fedorova, N.D., Harris, D.M., Heijne, W.H.M., 2008. Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. Nat. Biotechnol. 26, 1161–1168.
Vansteelandt, M., Kerzaon, I., Blanchet, E., Fossi Tankoua, O., Robiou Du Pont, T., Joubert, Y., Monteau, F., Le Bizec, B., Frisvad, J.C., Pouchus, Y.F., Grovel, O., 2012. Patulin and secondary metabolite production by marine-derived *Penicillium* strains. Fungal Biol. 116, 954–961.
Varga, J., Due, M., Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2007. Taxonomic revision of *Aspergillus* section *Clavati* based on molecular, morphological and physiological data. Stud. Mycol. 59, 89–106.
White, S., O'Callaghan, J., Dobson, A.D., 2006. Cloning and molecular characterization of *Penicillium expansum* genes upregulated under conditions permissive for patulin biosynthesis. FEMS Microbiol. Lett. 255, 17–26.
Yu, J., Chang, P.-K., Ehrlich, K.C., Cary, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Payne, G.A., Linz, J.E., Woloshuk, C.P., Bennett, J.W., 2004. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. Appl. Environ. Microbiol. 70, 1253–1262.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Table S1.
Orthologous genes of the patulin metabolic pathway across different fungi used for primer design

Gene	Proved or putative function	Species	Strain reference	GenBank Acc No.
PatA	Acetate transporter	*A. clavatus*	NRRL 1 (*)	ACLA_093560
		P. griseofulvum	NRRL 2159A	FJ392276
PatB	Carboxylesterase	*A. clavatus*	NRRL 1	ACLA_093570
		P. griseofulvum	NRRL 2159A	FJ392277
PatC	MFS Transporter	*A. clavatus*	NRRL 1	ACLA_093580
		P. griseofulvum	NRRL 2159A	GQ258972
		P. chrysogenum	ATCC 28089(**)	Pc22g08130
PatD	Zn-dependent alcohol dehydrogenase	*A.clavatus*	NRRL 1	ACLA_093590
		P. digitatum	PHI26	PDIG_86340
PatG	6 methylsalicylic acid decarboxylase	*A.clavatus*	NRRL 1	ACLA_093620
		P.chrysogenum	ATCC 28089	Pc22g08120
PatH	*m*-cresol hydroxylase	*A.clavatus*	NRRL 1	ACLA_093630
		P.chrysogenum	ATCC 28089	Pc22g08110
PatI	*m*-Hydroxybenzyl alcohol hydroxylase	*A.clavatus*	NRRL 1	ACLA_093640
		P.griseofulvum	NRRL 2159A	GQ258971
		P.chrysogenum	ATCC 28089	Pc22g08150
PatJ	Hypothetical protein	*A.clavatus*	NRRL 1	ACLA_093650
		P.chrysogenum	ATCC 28089	Pc22g08160
PatK	6- Methylsalicylic acid synthase	*A.clavatus*	NRRL 1	ACLA_093660
		P.griseofulvum	NRRL 2159A	GQ258970
		P.chrysogenum	ATCC 28089	Pc22g08170
PatL	C6 Transcription factor	*A.clavatus*	NRRL 1	ACLA_093670
		P.griseofulvum	NRRL 2159A	FJ392278
		P.chrysogenum	ATCC 28089	Pc22g08140
PatN	Isoepoxydon dehydrogenase	*A.clavatus*	NRRL 1	ACLA_093690
		P.griseofulvum	NRRL 2159A	AY885567
PatO	Isoamyl alcohol oxidase	*A.clavatus*	NRRL 1	ACLA_093700
		P.griseofulvum	NRRL 2159A	EF202832

*: NRRL: Northern Regional Research Laboratory, Illinois, USA
**: ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA
The gene functions are revised from Artigot *et al.* (2009) and Snini *et al.* (2014).

Table S2.
Primers used in this study to amplify the patulin *gene* cluster in *P. expansum*

(a) Primers used for PCR- amplification of partial sequences and intergenic regions	
Primer	**Sequence (5'-3')**
Pexp_PatA_F1	TTAGTCGCSCAGTGGGAGCTCG
Pexp_PatA_R1	AGMGCATCCTGACACATCAGRTGG
Pexp_PatB_F1	ATCCGMTATGCCGARCCSCC
Pexp_PatB_R1	GGAGKCGCTTGGGGCTRTCGGG
Pexp_PatB_F2	ATGGGYGTCTCSGCCGGTGG
Pexp_PatB_R2	CATTKGGRTTCCCCGTCTTSACAAAC
Pexp_PatB_F3	GGGAGGATGGGTCCACAGGC
Pexp_PatB_R3	GTAAACGCCGGGCCTCCTCC
Pexp_PatB_F4	CACATGGGAGACTGTTGTAGCAGC
Pexp_PatB_R4	GTCGAGCCCGCGGTCACG
Pexp_PatC_F2	GCCAAYCTGCTCTATGGNYTGGATAA
Pexp_PatC_R2	ATGGCACTTGCRATGGCCAAGCC
Pexp_PatC_R3	CCGTAGACGTTGGAGGGGCTG
Pexp_PatD1_F	CAYTCGGACCACTTTGCKCAGAYGAA
Pexp_PatD1_R	TTCRTCTGMGCAAAGTGGTCCGARTG
Pexp_PatD_F4	TGATTCCTTGACGAGAATATACACTGATGC
Pexp_PatD_R4	AATGCTTCGTTGCACTATTCCAAGGGG
Pexp_PatD5_F1	GACAGCTGCCACACGTCCAATAATC
Pexp_PatD5_F2	TCATGACCGGGAACTAGCGGAC
Pexp_PatD_F5	GAGGGCGAGACCGTTTGGAAGG
Pexp_PatD_R5	GCCATGGAGGTCGGCAAACGC
Pexp_gapPatDF_F1	GAGGACATATTGGGGATAATGCCCG
Pexp_gapPatDF_R1	ATTTTCGGGAGGAAGTGGGCCG
Pexp_PatE_F1	GGCTGCCAATCGTCGAGATCC
Pexp_PatE_R1	GTGGCTTCTATGAGCTGAACAATGGC
Pexp_PatE_F2	CCGGATAATGGATATCAAAGGCTGATG
Pexp_PatE_R2	GAGCCCGGGAAGTACTCAGGC
Pexp_PatE_F3	GATAAGCTGTGGATTTGGCTGTTTGG
Pexp_PatE_R3	CCTTTGATATCCATTATCCGGGGAG
Pexp_patEambi_F2	GTCATTGGCGGGGGCACGG
Pexp_patEambi_R2	TGTGCCTTCAGCGTGGCCG
Pexp_patEambi_F3	GTGGAGACAATGGGCCGTGCG
Pexp_patEambi_R3	CACGCGGAGGGCTTCAACACC
Pexp_PatF_F2	CAACACTCAACCGGATCCCGAC

Pexp_PatF_R2	CCAGAGTGCGGGATGTGGCC
Pexp_PatF_R3	CCCCAAGCGGTCACGTTGCC
Pexp_PatF_R4	GGGGGAGATCACTGTCTTCCCC
Pexp_PatG_F2	GGCTTCTTCGCMTCSGTGCC
Pexp_PatG_R1	GSGCATTGGGGAARTCACTSCC
Pexp_PatG_F5	CACCCGCTACGGCAAGGGTTC
Pexp_PatG_R3	CAGATCCATGGCGGCCCGG
Pexp_PatH_F1	TACACCCAYATMAAATTCACCGAATGGGC
Pexp_PatH_R1	CATGTGCATSCCCCAGGTGTTG
Pexp_PatH_F4	GAAGTCCTCGATCGCAAGAGTGGC
Pexp_PatH_F6	CGGTCGCCTGTTTGGGAGGAC
Pexp_PatH_R4	CCYTCMGTAAACYGCGAAAACACNTC
Pexp_patH_F7	GAATGGGCCGCCCAGTATGGC
Pexp_patH_R5	GGCCATATGATGTTCCGGGTCGATC
Pexp_PatH_DL4_R1	GAAGGGAAGAGACCGAATTGGAAAGGG
Pexp_PatI_F2	GGTACAGTAACAGTATCACCAACTCTCTTGTC
Pexp_PatI_R2	GCCCAGAGCAACTTGGCAAYGCC
Pexp_IG1_F6	GCCACCAAGGTTAGAGTGGCCAG
Pexp_IG2_F	CCAAGGACCATTTGTCCATCAGGTAG
Pexp_IG2_R	CAAACATATTCACTGTACTCAGTACCAGGAG
Pexp_PatJ_F3	CCTCGGCAAACTCCCGCATAATGG
Pexp_PatJ_R3	CGGCCGATGGATTGGAGGACTC
Pexp_PatK_F1	CATACCCCTCTGGGRRACATCCC
Pexp_PatK_R1	GGCCATGATGCCGTTTGTCTTGCC
Pexp_PatK_F2	CAGGTGTTTGCTCGTATGGGTACGG
Pexp_PatK_R2	GTCCTGGCCGCGRGGGTC
Pexp_PatK_F3	CAAGCTGTATTCCACCGCACTGG
Pexp_PatK_R3	CACCCACCTTGTCCARGTAGTCAATYG
Pexp_PatK_F4	GCGGCCGTCAAAGCGCGACTG
Pexp_PatK_R4	GATGTAGGTCACCACGGTTCCCTTC
Pexp_PatK_F5	CCAGATCGCCTGGCCACCG
Pexp_PatK_R5	CGTGCAGGGCTAGCGCACCC
Pexp_PatK_F6	CATGTCCTCCCCTGACATCAC
Pexp_PatK_R6	CTGACAGTCGGATGACTCCACGTC
Pexp_IG2F3	CTTAACCTGATCTAGCACGGTCTGATAC
Pexp_IG2R3	CTCCCACCGACCAGCATCGC
Pexp_IG2F4	CACCTTTTTGTTGCGACAACATACCGTTC
Pexp_IG2R4	CTCTGCATGGAAGAAGCCCAGTC
Pexp_IG2F5	CCCGTTCAGGCTTAGGGCTGAC

Pexp_IG2R5	CAACCACGGCCACGTCGTTGG
Pexp_PatL_F1	ATGTACTCCACTTTCTCCGCCAACTTC
Pexp_PatL_R1	GCGCTGTAGCTCCTGCTGTTCG
Pexp_PatL_F2	CGAACTTACTACCAGAGGGCCCAG
Pexp_PatL_R2	CCTCCAGGGTAGTCGGTGGCAG
Pexp_PatL_R3	ACATAAAGACTGCGGCACATTTTGTACCC
Pexp_PatL_F3	GTATTGCTGCAAGAGCCTCCTCGATTC
Pexp_PatN_F1	CACAACTGGTCTCAAAGGCGCCC
Pexp_PatN_R1	CTTCARTCGCTGTTCCTCCACCC
Pexp_PatO_F1	TGTATGCCCGGTGATAGYTGYTGGCC
Pexp_PatO_R1	CCWCCKCCGCTGAGAGCCCAGTA
Pexp_PatO_R2	CCTCGYTCATRTAACAACCCGARTCTGG

Degenerate nucleotide nomenclature:
(I) Inosine, **(Y)** C or T, **(R)** A or G, **(N)** G or A or T or C, **(K)** G or T, **(S)** G or C, **(W)** A or T

(b) Primers designed for the Genome Walking Experiments

Primer	**Sequence (5'-3')**
Pexp_PatC3_DL3_F1	GCCAGTGGAATCAAAATATCTTCGGGAG
Pexp_PatC3_DL3_F2	CTCCACGTTTCAAATATAGTGGATAAGGGC
Pexp_PatG_R4	GTGACTCCGTCCGCACGGAGAG
Pexp_PatG_R5	GCACGGAGAGTGGTGCAGGCG
Pexp_PatG5_DL1_R1	GACTGAATGCCTGCAGTTTTCCCCTC
Pexp_PatG5_DL1_R2	CCTGCAGTTTTCCCCTCTCTCTTGC
Pexp_PatH_DL3_F1	GGGCTTGCTATCGTCCACCTAGG
Pexp_PatH_DL3_F2	GCTATCGTCCACCTAGGAGTAAATCCG
Pexp_PatH_DL4_F1	GCAAGGGTAAGCACAGGGCTAAGATG
Pexp_PatH_DL4_F2	GTGTGGGATGTATTGAGGCAGATTCCG
Pexp_PatL_DL2_F1	GGGATGATTTTAATTGTAAGCAAGCGAGAAGC
Pexp_PatL_DL2_F2	CAAGCGAGAAGCAGTCTGTTCTTTTGTC
Pexp_PatM_DL3_F1	GGCAAGTTTAAGTGCTGACAACTTGATTC
Pexp_PatM_DL3_F2	GAAGCCCTCTTTTCCTCACACTGTGG
Pexp_PatO_DL4_F1	CTGTGCCAGGCCACCAGAAAGAATTG
Pexp_PatO_DL4_F2	GAAAGAATTGACACGACGAGATACTGTGG

Table S3.
Primer sequences used to determine the 3' and 5' extremities by RACE-PCR

Primer	**Sequence (5'-3')**
Pexp_PatA_ext3'1	CTTCTTTACCGTTGCTGCAATGCCC
Pexp_PatA_ext3'2	CACGGGCATGCTCGGAACTTCC
Pexp_PatA_ext5'1	CAATGGCATTATTCAATGCCGCGGG
Pexp_PatA_ext5'2	GCCGCGGGATCATCTTTGAAGG
Pexp_PatB_ext3'1	CACCAAGCAGTCGCAACGCCAG
Pexp_PatB_ext3'2	CAGGCTATGCGATTGAGTACGCTG
Pexp_PatB_ext5'1	CAACAGGCTTGAGATTGGGGACAG
Pexp_PatB_ext5'2	GAGATTGGGGACAGATATTGCCAAGC
Pexp_PatC_ext3'1	CCTGATGGGACTGGGCATGACTAC
Pexp_PatC_ext3'2	CTACACAGGCCGCCTACGCG
Pexp_PatC_ext5'1	GAAGATGGCGTATGCTTTGCCCAG
Pexp_PatC_ext5'2	CTTTGCCCAGCGGGAGAATAAAGAC
Pexp_PatD_ext3'1	GAAAGGGTAAATCCATCTGGAGCTG
Pexp_PatD_ext3'2	CATGCCACCGATTCCGAGGACG
Pexp_PatD_ext5'1	GTCTCGCCCTCTCCGACAGC
Pexp_PatD_ext5'2	GACAGCTGCCACACGTCCAATAATC
Pexp_PatE_ext3'1	GAAATTCTGGATCATGTCCGGAAGAG
Pexp_PatE_ext3'2	CGATACCATTTTCCACGCCTCCTG
Pexp_PatE_ext5'1	CCCTGTTCGGCAAGTCGCGTTG
Pexp_PatE_ext5'2	GTTGCGATAGTCAAACCGGCCG
Pexp_PatF_ext3'1	GGCAACGTGACCGCTTGGGG
Pexp_PatF_ext3'2	GGCCACATCCCGCACTCTGG
Pexp_PatF_ext5'1	GACGGGCGTGCGTTCCCAG
Pexp_PatF_ext5'2	CCCAGTCAGTAGGCCCAAGTGG
Pexp_PatG_ext3'1	CGGACATTCTACTTTGACACGGCTATC
Pexp_PatG_ext3'2	CACGGCTATCTCATCAAACCCGGTC
Pexp_PatG_ext5'1	GCAGCGGCAGATTCATTGCAGC
Pexp_PatG_ext5'2	GTGCCAGAGCGGCGGCC
Pexp_PatH_ext3'1	GGGTCCGATTGATAGTGATCCGGTG
Pexp_PatH_ext3'2	CAATGGCTTCTTGTACTGTGCCAAAGAC
Pexp_PatH_ext5'1	GGGCCATATGATGTTCCGGGTCG
Pexp_PatH_ext5'2	GAGCTGTATGGCTTCAGCATTGACG
Pexp_PatI_ext3'1	GCTGGATCCGAGCGCCGAG
Pexp_PatI_ext3'2	TTGGTTACGGAGCGGGCCGG
Pexp_PatI_ext5'1	CCACTGTGGCACATAGCGCAGC

Pexp_PatI_ext5'2	GTCGACAGGCGGGGTAGCG
Pexp_PatJ_ext3'1	GTCGGCCGATGGATTGGAGGAC
Pexp_PatJ_ext3'2	CTAGGATATAAGCCCTTCTTCCGGG
Pexp_PatJ_ext5'1	CTTCAATAGTATGGCGGTATGTCTGGC
Pexp_PatJ_ext5'2	GGCCTGGTGGAGGTTCGAGG
Pexp_PatK_ext3'1	GATCCGCGGCTGTGTGGCC
Pexp_PatK_ext3'2	GACAGCTGAGGATGTGGATTCGAAGG
Pexp_PatK_ext5'1	GCGCATCTCTGGAATCTCACCC
Pexp_PatK_ext5'2	GCTGAGGAGCGATTGCCAGAGG
Pexp_PatL_ext3'1	CAGAGTCTATGTCGATGCCCTCG
Pexp_PatL_ext3'2	GGTCACGTCTGCTGACATGGTC
Pexp_PatL_ext5'1	GAGCGAGGTAGCCTCCTGTGG
Pexp_PatL_ext5'2	GTATTGCTGCAAGAGCCTCCTCGATTC
Pexp_PatM_ext3'1	CGGCTATGAATTTGCTCATCGGCACCGC
Pexp_PatM_ext3'2	CACCGCAATATTGGCGTTTTCATC
Pexp_PatM_ext5'1	CCACTCCCCACTGCTGATATTTTGTC
Pexp_PatM_ext5'2	AGACCACCCCGGTATCATCGGG
Pexp_PatN_ext3'1	GTCCCCCCAGGCATCCATCATC
Pexp_PatN_ext3'2	GGGGCGGGAATTCTACCGGTC
Pexp_PatN_ext5'1	CGGTATTTCCCTCAGCGAGGGTC
Pexp_PatN_ext5'2	CTCGGTATTGGTGACGGTTCGAGC
Pexp_PatO_ext3'1	CGTATTCATAATTTGGAGACGACTGGC
Pexp_PatO_ext3'2	CTGTACAAACAGGCCGATCCCC
Pexp_PatO_ext5'1	GACCGGGGAGTAAAGGCGTCAC
Pexp_PatO_ext5'2	GGCCACGGCGGCTGACATTATG

Table S4.
Primer sequences used in real-time PCR assays

Primer	**Sequence (5'-3')**
Pexp_btub_F	TGAACGTCTACTTCAACCATGCC
Pexp_btub_R	TCCAAATCGACGAGAACGG
Pexp_PatA_F	TGCTGCAATGCCCATGAAC
Pexp_PatA_R	GCGGCCAACAGAGTGTATGTAAT
Pexp_PatB_F	GGCTATCAGCGGCATCAAG
Pexp_PatB_R	TGGTAATAGCGACCAGTCGAGTT
Pexp_PatC_F	GCCACATGGCGATGGTCA
Pexp_PatC_R	TGGCAAGGAGGGCAGGA
Pexp_PatD_F	GGAAGTTGTTGATTCTGTCCATTGT
Pexp_PatD_R	CAATGCCATGGAGGTCGG
Pexp_PatE_F	GGCACGGATCTCGACGATT
Pexp_PatE_R	GATCGTAGGCGCCCGCT
Pexp_PatF_F	TTGGGCCTACTGACTGGGAAC
Pexp_PatF_R	TGTCGAACGTGAGGGAGATGTA
Pexp_PatG_F	ATGGCGAAAATCGATGTGC
Pexp_PatG_R	CGCGGTCCAGGGCTT
Pexp_PatH_F	TGGAAAACCACCACACCAAAA
Pexp_PatH_R	CTGTGCGGATTCCAAATACGA
Pexp_PatI_F	GGAAGTTCAGGCCAAAGCA
Pexp_PatI_R	TTATGGCCGATAATGGAGTCG
Pexp_PatJ_F	GGATCCAGTTCCTCGCGATT
Pexp_PatJ_R	CGGGAGCAGGTGTATAGGCA
Pexp_PatK_F	ACTCCTGGTACTGAGTACAGTGAATATGAA
Pexp_PatK_R	CTCTGGAATCTCACCCACTGC
Pexp_PatL_F	ACTGGTGTAGGCTCAATCGTGTC
Pexp_PatL_R	ATTTCTTAATCGTTGCATTTCTCGG
Pexp_PatM_F	ACGCGGCCCTATTTGTTTTC
Pexp_PatM_R	GCATCTCCATCCCGATTCCA
Pexp_PatN_F	CTAGCAAAGATTCCCTCGTCAAGT
Pexp_PatN_R	ATATGCATCGGCGAGGCATT
Pexp_PatO_F	GGGCACGCTTCAATACGTCTA
Pexp_PatO_R	GAAGAGGAGGATGCATCGTGG

Table S5:
Comparison of *A.clavatus, P.chrysogenum* and *P.digitatum* nucleotide and amino acid sequences with the orthologs in *P.expansum*

Gene	Percent identity					
	Nucleotide [a]			Amino acid		
	A. clavatus	*P. chrysogenum*	*P. digitatum*	*A. clavatus*	*P. chrysogenum*	*P. digitatum*
PatA	65.2	_	_	81	_	_
PatB	65	_	83.1	68.2	_	76
PatC	74.3	77.5	85.7	78.6	_	88
PatD	65.7	_	81.6	77.8	_	78.6
PatE	70.3	_	_	82.2	_	_
PatF	72.6	_	88.6	79.9	_	86.6
PatG	69.1	83.3	84.4	78.8	90.5	93
PatH	71.6	86.2	54	84.7	93.7	49.5
PatI	69.4	82.6	83.1	82.4	95.2	90.5
PatJ	72.3	83.9	83	86.5	92.5	89
PatK	72.8	87.7	57.1	77.7	90.9	47.7
PatL	65.8	84.1	89.2	67.8	83.5	90.8
PatM	75	_	_	78	_	_
PatN	75.3	_	_	90.3	_	_
PatO	69	_	_	71.8	_	_

[a] Values were concluded using the nucleotide sequences of coding regions and introns, when present.

2. Caractérisation de la seconde étape de la voie de biosynthèse de la patuline chez *Aspergillus clavatus (ARTICLE 2)*

Nous avons utilisé comme organisme, *Aspergillus clavatus*, producteur de patuline dont le génome est entièrement séquencé. Le cluster de gènes impliqué dans la voie de biosynthèse de la patuline a été identifié chez *Aspergillus clavatus* mais seulement quatre gènes codant pour une acide 6-méthylsalicylique synthase, une *m*-crésol hydroxylase, une hydroxybenzyl alcool hydroxylase et une isoépoxidon déshydrogénase ont été caractérisés. Des études antérieures ont montré l'implication d'une décarboxylase dans la conversion de l'acide 6-methylsalicylique en *m*-crésol. Dans cette étude un gène codant pour une décarboxylase a été identifié chez *Aspergillus clavatus*. Ce gène se trouve dans le cluster précédemment identifié et la protéine pour laquelle il code présente des domaines conservés retrouvés dans la famille des protéines de type AminoCarboxyMuconate Semialdéhyde Décarboxylase (ACMSD). Dans cette famille se trouvent d'autres décarboxylases comme la γ-résorcylate décarboxylase ou l'*o*-pyrocatechuate décarboxylase. Les substrats catalysés par ces deux décarboxylases présentent de fortes similarités structurales avec l'acide 6-méthylsalicylique, substrat potentiel de l'enzyme codée par le gène *PatG.* De plus, les produits issues des décarboxylations de ces substrats présentent eux aussi de fortes similarités structurales avec le *m*-crésol, le potentiel produit issus de la décarboxylation de l'acide 6-méthylsalicylique. Sur la base de ces analyses nous avons posé l'hypothèse que le gène *PatG* codait pour une décarboxylase catalysant la décarboxylation de l'acide 6-méthylsalicylique en *m*-crésol.

Afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, nous avons, dans un premier temps, séquencé entièrement le gène *patG* puis nous avons utilisé la séquence codante pour transformer *Saccharomyces cerevisiae* afin de réaliser des expérimentations d'expression hétérologue chez la levure. La séquence de ce gène a été placée sous le contrôle d'un promoteur inductible au galactose et la présence de la protéine PATG a été confirmée par la technique du western blot. La mise en culture des levures transformées en présence d'acide 6-méthylsalicylique a permis la formation de *m*-crésol, confirmant ainsi pour la première fois que l'acide 6-méthylsalicylique est le substrat de PATG, l'acide 6-méthylsalicylique décarboxylase.

Grâce à cette étude, les gènes impliqués dans les quatre premières étapes de la voie de biosynthèse de la patuline sont identifiés.

Tous les détails de cette étude, qui a été acceptée pour publication dans *International Journal of Food Microbiology* en février 2014 sont présentés, à la suite dans le format de publication du journal.

International Journal of Food Microbiology 171 (2014) 77–83

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

The gene *PatG* involved in the biosynthesis pathway of patulin, a food-borne mycotoxin, encodes a 6-methylsalicylic acid decarboxylase

Selma P. Snini, Souria Tadrist, Joelle Laffitte, Emilien L. Jamin, Isabelle P. Oswald, Olivier Puel *

INRA, UMR 1331 Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, 180 Chemin de Tournefeuille, F-31027 Toulouse Cedex, France
Université de Toulouse III, ENVT, INP, UMR 1331 Toxalim, F-31076 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 20 September 2013
Received in revised form 8 November 2013
Accepted 18 November 2013
Available online 27 November 2013

Keywords:
Mycotoxins
Patulin
Biosynthesis pathway
Aspergillus clavatus
6-Methylsalicylic acid decarboxylase

ABSTRACT

Patulin is a mycotoxin produced by fungal genera such as *Aspergillus*, *Penicillium* and *Byssochlamys*. It induces neurological, gastrointestinal and immunological effects, which is why patulin belongs to a short list of mycotoxins whose level in food is regulated in many countries around the world. Recently, a cluster gathering 15 genes involved in the biosynthesis of patulin has been identified in *Aspergillus clavatus*, but so far, only 4 genes encoding 6-methylsalicylic acid synthase, *m*-cresol hydroxylase, *m*-hydroxybenzyl alcohol hydroxylase and isoepoxydon dehydrogenase have been characterized. Previous studies have shown the involvement of a decarboxylase in the transformation of 6-methylsalicylic acid, the first stable patulin precursor, into *m*-cresol. In this study a putative decarboxylase gene, *PatG*, was identified in the genome sequence of *A. clavatus*. This gene is located near two P450 cytochrome genes *PatH* and *PatI* responsible respectively for the hydroxylation of *m*-cresol and *m*-hydroxybenzyl alcohol. This decarboxylase encoded by *PatG* (ACLA_093620) consists of 325 amino acids. The search for putative conserved domain revealed that the gene product belongs to the AminoCarboxyMuconate Semialdehyde Decarboxylase (ACMSD) related protein family. This family includes decarboxylases such as the γ-resorcylate decarboxylase or o-pyrocatechuate decarboxylase. The substrates of these enzymes display strong structural similarities with 6-methylsalicylic acid. *PatG* was strongly expressed during patulin production whereas it was very weakly expressed in non-patulin permissive conditions.
The coding sequence was used to enable heterologous expression of functional enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. The presence of decarboxylase was confirmed by Western blot. The bioconversion assays showed that PATG catalyzed the decarboxylation of 6-methylsalicylic acid into *m*-cresol. These results confirm for the first time that 6-methylsalicylic acid is the substrate for PATG, the 6-methylsalicylic acid decarboxylase. With this study, the four genes involved in the four first steps of patulin biosynthesis pathway (acetate → gentisyl alcohol) are now identified.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Patulin is a toxic fungal compound included in a short list of mycotoxins whose levels in food are regulated in many countries around the world (aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, fumonisins and trichothecenes). This toxin induces immunological, neurological and gastrointestinal effects (Scott, 1974; Puel et al., 2010). Assessment of the health risks due to patulin consumption by humans has led Europe to regulate its amount to 50 μg kg^{-1} for fruit juice and derived products, 25 μg kg^{-1} for solid apple products and 10 μg kg^{-1} for food destined for consumption by babies and young children (EU Commission Regulation, 2006). Although the patulin issue concerns mainly human health, growth of some patulin producing species in feed can produce risks for animal health (Sabater-Vilar et al., 2004; Rasmussen et al., 2011).

Patulin can be isolated from several species belonging to the *Aspergillus*, *Byssochlamys*, and *Penicillium* genera. In *Aspergillus*, the number of patulin producing species is limited to three: *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus giganteus* and *Aspergillus longivesica* (Varga et al., 2007) while only *Byssochlamys nivea* produces this toxin in the genus *Byssochlamys* (Houbraken et al., 2006). The genus *Penicillium* is the most prolific with respect to its ability to produce patulin (Frisvad et al., 2004). Among patulin producing *Penicillium* species, *Penicillium expansum*, responsible for the decay in pomaceous fruit (apples and pears) characterized by a quick soft rot, is considered to be the main source of patulin not only in these fruits but also in less common hosts of the pathogen (apricots, peaches, strawberries and kiwifruits) (Neri et al., 2010).

Patulin, like several other major mycotoxins (aflatoxins, fumonisins, zearalenone and ochratoxins), is a polyketide metabolite. The biosynthesis of this polymer of acetate and short carboxylates needs the involvement of multifunctional enzymes called polyketide synthases (PKS) (Huffman et al., 2010). The action of PKS alone is not enough to lead to mycotoxin biosynthesis. Other modification enzymes are needed

* Corresponding author at: INRA, UMR 1331 Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, 180 Chemin de Tournefeuille, F-31027 Toulouse Cedex, France.
E-mail address: opuel@toulouse.inra.fr (O. Puel).

0168-1605/$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.020

to catalyze the subsequent reactions involved in biosynthetic pathways. The patulin biosynthesis pathway consists of approximately 10 enzymatic steps and the chemical structures of most of the patulin precursors are known (Zamir, 1980; Puel et al., 2010). The genes encoding the enzymes involved in these steps are all located in a cluster on one chromosome (Artigot et al., 2009) as is the case for a large number of mycotoxin pathways (Seo et al., 2001; Yu et al., 2004; Kim et al., 2005; Alexander et al., 2009). In *A. clavatus*, the patulin cluster consists of 15 genes (Artigot et al., 2009). Knowledge of the role of the different genes of the patulin cluster is so far limited to four genes previously identified in *A. clavatus* or in other patulin producing species: *PatK*, *PatN*, *PatH* and *PatI* encoding respectively a 6-methylsalicylic acid synthase (Beck et al., 1990; Puel et al., 2007), an isoepoxydon dehydrogenase (Dombrink-Kurtzman and Engberg, 2006; Dombrink-Kurtzman, 2007; Puel et al., 2007), and CYP619C3 and CYP619C2 cytochrome P450s (Artigot et al., 2009). CYP619C3 encoded by *PatH* is involved in the transformation of *m*-cresol into *m*-hydroxybenzyl alcohol and CYP619C2 encoded by *PatI* in the modification of *m*-hydroxybenzyl alcohol to gentisyl alcohol. All these genes, except the *PatN* gene, are involved in the first steps of the biosynthetic pathway that begins with successive involvements of the 6-methylsalicylic acid synthase, the 6-methylsalicylic acid decarboxylase, the *m*-cresol hydroxylase and the *m*-hydroxybenzyl-alcohol hydroxylase. Only the gene encoding for the 6-methylsalicylic acid decarboxylase involved in the second step of pathway is not identified.

The objectives of the current study were to isolate, to clone and to characterize by heterologous expression of the gene encoding 6-methylsalicylic acid decarboxylase in *A. clavatus*.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

m-Cresol was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). 6-Methylsalicylic acid was a generous gift from Dr. Y Ebizuka (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo) and Dr. P.M. Shoolingin-Jordan (University of Southampton). All solvents used in the extraction and high-performance liquid chromatography (HPLC) analyses were of analytical grade and purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France). Water for HPLC analyses was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Water used for molecular biology procedures was purified by using a Millipore MilliQ purification system (Billerica, MA, United States).

2.2. Microorganisms and growth conditions

The patulin-producing *A. clavatus* strain NRRL 1980 was chosen rather than the non-patulin producing NRRL 1 strain (Varga et al., 2003), whose complete genome has been sequenced. The NRRL 1980 strain was provided by Dr. S. Peterson, ARS Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, IL, USA. It was cultured on Potato Dextrose Agar (PDA) medium (Sigma-Aldrich) at 25 °C for 7 days in the dark. To determine the transcription kinetics of *PatG*, 5×10^5 conidia from a spore suspension from the previous culture were used to inoculate 1 l Roux Flasks containing 100 ml of sterile Czapek–glucose broth (35 g Czapek medium, 2 g yeast extract, 8 g glucose 1 l distilled water). This culture was incubated in the dark at 25 °C for 3–7 days, without shaking. The supernatants were then extracted and analyzed by HPLC-DAD, and total RNAs were extracted from harvested mycelia. In parallel, the strain was grown under restrictive patulin production conditions, i.e. on Eagle's minimal essential medium (MEM) (Sigma-Aldrich) supplemented with 5% sterile fetal calf serum, over 3–7 days, under shaking (180 rpm). *Escherichia coli* Top 10 F′ (Invitrogen, Carlsbad, CA, United States) was used for cloning experiments. This strain was grown at 37 °C on solid Luria–Bertani medium or in liquid Luria–Bertani medium, both containing ampicillin at 100 μg/ml. *Saccharomyces cerevisiae* InvSc1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, United States) was used for heterologous expression experiments. After transformation, *S. cerevisiae* transformed strains were cultured on SC-U medium plates containing 2% glucose as described in the procedure specified by the manufacturer.

2.3. Cloning of PatG gene

Total RNA was isolated from a 5-day-old *A. clavatus* culture as previously described (Puel et al., 2007). Five micrograms of RNA was used to generate first-strand cDNA in 20 μl reaction mixture containing 1× RT buffer (Invitrogen), dNTP (Invitrogen), RNase inhibitor (Invitrogen) and RevertAid H minus M-MuLV (Fermentas, Vilnius, Lithuania). The specific primers of *PatG* were designed from the NRRL 1 strain sequence obtained by The Institute for Genomic Research and deposited in GenBank (XM_001273088). These primers are listed in Table 1.

By using the GeneRacer kit as specified by the manufacturer (Invitrogen), the 5′ and 3′ untranslated regions (UTRs) of *PatG* were amplified by the rapid amplification of cDNA ends RACE-PCR method, as described elsewhere (Tsitsigiannis et al., 2004). The products obtained were ligated into the pCR2.1-TOPO vector for amplification in an *E. coli* TOP 10 F′ strain. In order to obtain the sequence of the single intron, the genomic DNA was extracted as previously described (Puel et al., 2005) and a fragment containing the intron was amplified, cloned and sequenced.

2.4. Kinetics of PatG expression in A. clavatus

After assessment of concentration, purity and quality, 5 μg of RNA was used to generate first-strand cDNA in 20 μl of reaction mixture, as described above. The amount of RNA transcripts from the gene encoding the decarboxylase PATG was measured in triplicate by real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR). Ten nanograms of cDNA was mixed with the Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, United States), specific *A. clavatus* primers for a housekeeping gene (β-tubulin), or the gene encoding PATG. For each gene, the qRT-PCR reactions were performed independently. The optimal primers used in the reaction were identified by Primer Express 1.0 software (Applied Biosystems) and listed in Table 1. Special care was taken to design or choose sets of primers that spanned exon–exon conjunctions to exclude amplification of genomic DNA. The reactions were denatured at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min, in an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). A dissociation curve analysis was performed to confirm the specificity of the amplified target nucleic acid sequence. Data were analyzed using the method of Peirson et al. (2003), and individual values for *PatG* expression were obtained after normalization to β-tubulin.

2.5. Heterologous expression of PatG in yeast

The entire coding sequence of *PatG* was amplified by RT-PCR using PatGexpF3/R3 primer pairs (Table 1). The cDNA devoid of PCR errors

Table 1
Primers used in this study.

Primer	Sequence (5′ → 3′)	Annealing temperature
PatGext5′1	CCAGATCCAAGGTCCAGGGTGG	60 °C
PatGext5′2	CCACCCAGAAGGATCTCCTCCC	60 °C
PatGext3′1	GTGGAGGCGGCGCGTACGTT	60 °C
PatGext3′2	GATACCGCGATTTCGGCGAATCCG	60 °C
PatGexpF3	AACATGGCAAAGATTGACGTGCACCATCA	60 °C
PatGexpR3	GCCAGTCGACTCGGGCTTGTCTC	60 °C
PatGF1	GGCCATGCGCGAAGCT	60 °C
PatGR1	ACTTTCAGCACGCGAGAAATCT	60 °C
TubACF3	GCCCTACAACGCCACTCTCTC	60 °C
TubACR3	GCATGCAGATATCGTACAGAGCC	60 °C

was inserted into a yeast expression vector, pYES2.1/V5/His-Topo (Invitrogen). The expression vectors were inserted into a TOP 10 F′ cell for amplification. Then, the expression vectors were purified from overnight culture and transferred into strain InvSc1 of *S. cerevisiae* by using of the S.C. EasyComp kit (Invitrogen) following the supplier's protocols.

2.6. Western blotting

Firstly, yeasts were grown at 30 °C in 50 ml SC-U glucose broth for 24 h. Then, the cells were induced in 15 ml SC-U broth supplemented with a sterile galactose aqueous solution (20 g/l) and grown for 24 h. Cells were harvested by centrifugation and proteins were extracted by the FastPrep system with lysing matrix C in yeast breaking buffer according to the FastProtein™ red matrix protocol (MP Biomedical, Illkirch, France). The proteins (15 μg per lane) were separated by 12% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Over-expressed proteins were detected by Western blotting with mouse monoclonal antiV5-fluo antibody (Invitrogen). Reading and analysis of results were carried out using an Odyssey scanner (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA).

2.7. Bioconversion assays

For the induction of *PatG*, the transgenic yeasts were inoculated into SC-U minimal medium broth plus 2% glucose and incubated for 3 days at 30 °C. The yeast cells were then harvested and transferred into SC-U minimal medium containing 2% galactose as the unique carbon source. The OD_{600} was adjusted to 0.4. After 24 h of induction, 1 mM of substrate (6-methylsalicylic acid) was added to the cultures. After 24 h, the medium was analyzed by HPLC-DAD.

2.8. HPLC-DAD and LC–MS analyses

Patulin was quantified by high-performance liquid chromatography with diode-array detection (Kontron instruments, Milan, Italy) as previously described (Puel et al., 2005). Patulin identity was confirmed by liquid chromatography coupled to a high resolution mass spectrometer LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific, San Jose, CA, United States), and fitted with an electrospray ionization mode. A reverse phase 150 × 2.0 mm Luna C18 (2) column (Phenomenex, Torrance, CA, United States) was used. Twenty microliters of methanol suspension of culture extract was injected directly in the LC system. The eluent flow rate was 0.2 ml/min and the gradient was 0.1% acetic acid (eluent A) and acetonitrile (eluent B) as mobile phase. The elution started with a linear gradient ranging from 20% to 50%. Then solvent B was increased to 90% within 5 min. After a 10 min isocratic elution, the gradient was decreased to initial value within 5 min and remained at this value for the last 5 min. Electrospray ionization was performed at 4.5 kV. The temperature and voltage were set respectively to 350 °C and 40 V. Resolution was set to 60 000 for an *m/z* range set to 50–800.

For bioconversion assays, after centrifugation, 5 ml of medium was extracted with 5 ml of ethyl acetate. The organic phase was evaporated in two steps: firstly with a rotary evaporator in vacuo at 50 °C and then with a Zymark TurboVap (McKinley Scientific, Sparta, NJ, United States) at 60 °C. The residue was taken up in 200 μl methanol, and this suspension was filtered through a 0.45 μm pore-size filter (Whatman, GE Healthcare, Kent, U.K.) before injection (20 μl) into the chromatography apparatus. Mycotoxin analysis was done by HPLC-DAD with a 250 × 4.6 mm Kromasil 5 μm C18 column (Interchim). Patulin production and bioconversion assays were determined by HPLC analysis with a linear elution gradient using 0.2% acid acetic (solvent A) and methanol (solvent B) with a flow rate of 0.6 ml/min. The compounds were eluted by starting with 18% of solvent B for 15 min, followed by a step to 30% solvent B, then a linear gradient up to 75% within 10 min. After an isocratic elution for 20 min, the gradient was decreased to the initial value within 10 min, and remained at this value for the last 10 min.

3. Results and discussion

3.1. Sequence analysis of the decarboxylase from A. clavatus

Although the sequenced *A. clavatus* strain NRRL 1 possesses the gene *PatG*, it does not produce patulin. The first aim in this study was to sequence the gene *PatG* from a patulin producing strain (NRRL 1980).

In order to determine the location of the start and stop codons of the putative decarboxylase gene involved in patulin biosynthesis, the 5′ and 3′ UTR extremities were isolated by RACE-PCR, cloned and sequenced. Then the whole coding sequence was obtained and deposited in GenBank (JN698985). Two putative start codons were identified, located after 22 and 42 bp from the transcription initiation point. The translation from the first ATG codon produces a small protein which does not contain a conserved domain. The sequences upstream and downstream of the second ATG were matched to the Kozak sequence consensus in *Neurospora crassa*, suggesting that this ATG was the correct start codon (Bruchez et al., 1993). The sequencing of the whole decarboxylase cDNA confirmed the presence of one 82 bp intron.

When the two *PatG* sequences were compared (NRRL 1 vs NRRL 1980), they differed only in 4 transition and 2 transversion mutations. After translation, the gene product comprised 325 amino acids. The differences observed in nucleic level did not change the amino acid sequence except for one base at position 816 where a thymine is replaced by a guanine. Accordingly, this difference causes an amino acid change: a phenylalanine is replaced by a lysine (F244K). Nevertheless, this change occurs in a non-conserved protein domain. This difference was confirmed by independent PCR reactions. Taken together these data suggest that the *PatG* gene from *A. clavatus* NRRL 1 encodes for a functional protein and that the patulin biosynthesis is blocked elsewhere in the cluster or at transcriptional or post-transcriptional levels.

The search for putative conserved domains in the Conserved Domain Database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml) indicated that the gene product belongs to a large hydroxylase enzyme group with a TM-barrel fold, i.e., amidohydrolase_2 family renamed recently as the AminoCarboxyMuconate Semialdehyde Decarboxylase (ACMSD) related protein family (Liu and Zhang, 2006). The main structural landmark for this family is a mononuclear or binuclear metal center. The finest analysis of amino-acid sequence showed that the protein contains five typical amino acid residues that function as metal ligands including an H × H metal binding motif at the end of the first β-strand, one histidine at the end of the fifth β-fold, one histidine at the end of the sixth β-fold and an aspartic acid at the end of eighth β-fold. This conserved domain was detected in decarboxylases such as the 5-carboxyvanillate decarboxylase and the γ-resorcylate decarboxylase. On the basis of BLASTp analysis, PATG shared 42%, 39% and 44% homology respectively with 5-carboxyvanillate decarboxylase from *Sphingobium* sp. (Peng et al., 2002), the *o*-pyrocatechuate decarboxylase from *Aspergillus oryzae* (Santha et al., 1996) and γ-resorcylate decarboxylase from *Rhizobium* sp. (Yoshida et al., 2004). In addition, substrates converted by these decarboxylases had structural similarities with 6-methylsalicylic acid, the first stable patulin precursor and the expected substrate of PATG (Fig. 1). These data suggest that PATG would be responsible for the transformation of 6-methylsalicylic acid into *m*-cresol by decarboxylation.

Blast analysis of the sequence of *PatG* revealed strong homologies with uncharacterized fungal proteins. However, the strongest homology (88%) was observed with orthologous *PatG* from *Penicillium digitatum*, the main post-harvest pathogen of citrus fruit (PDIG_86360) (Marcet-Houben et al., 2012) and *Penicillium chrysogenum* (PC22g08120), the industrial source of the antibiotic penicillin. In both genomes, these orthologous *PatG* are located amid other orthologous patulin genes. The inability to produce patulin and the lack of some key genes suggest

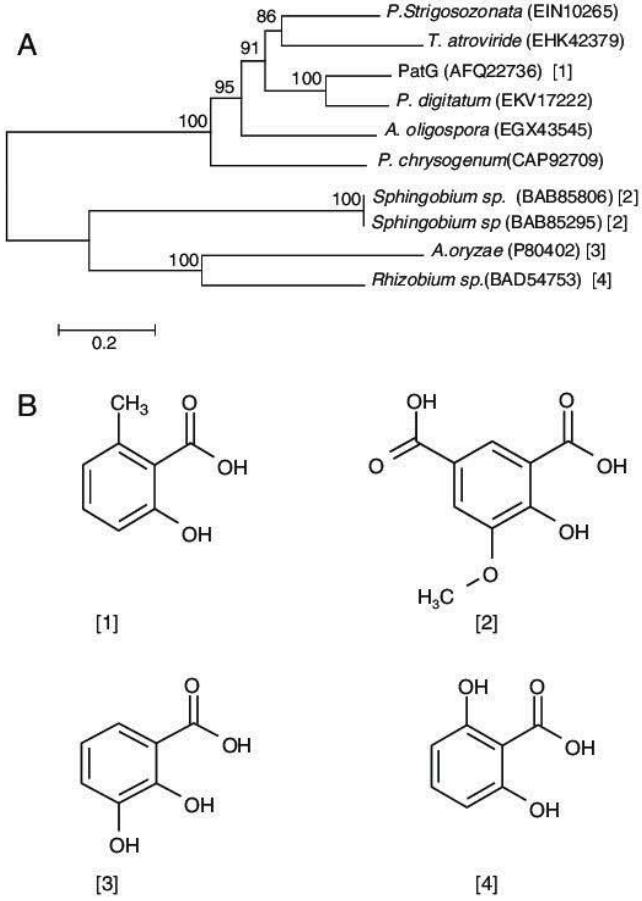


Fig. 1. A) Phylogenetic relationships among decarboxylases *P. strigosozonata*, *T. atroviridae*, *P. digitatum*, *A. oligospora*, *P. chrysogenum*, *Sphingobium*, *A. oryzae*, *Rhizobium* and *A. clavatus* protein sequences determined by ClustalX multiple alignment followed by neighbor joining and bootstrap analysis. B) Substrates transformed by the corresponding enzymes: [1] 6-methylsalicylic acid, [2] 5-carboxivanilic acid, [3] 2,3 dihydroxybenzoic acid and [4] resorcylic acid (2,6 dihydroxybenzoic acid).

that both species possess a nonfunctional "fossil" patulin cluster. An orthologous gene to *PatG* has been found with other orthologous patulin genes in the recently sequenced genome of *Macrophomina phaseolina*, a necrotrophic fungal pathogen (Islam et al., 2012). The presence of *PatK*, *PatG*, *PatH* and *PatI* suggests that this fungal pathogen is able to synthesize not only *m*-cresol but also gentisyl alcohol. The lack of four patulin genes suggests that this fungus is not capable of producing patulin. The presence of a gene cluster similar to that of patulin in a species of *Dothideomycete* suggests the existence of species outside *Eurotiales* capable of producing patulin, its precursors or molecules biosynthetically close. So far, longianone and isoepoxydon are the only two compounds requiring 6-methylsalicylic acid decarboxylase for their synthesis reported as produced by species not belonging to *Eurotiomycetes* (Edwards et al., 1999; Gloer and Truckenbrod, 1988; Goss et al., 1999).

3.2. Kinetics of PatG expression and patulin quantification

The second step of this study was to analyze *PatG* expression when *A. clavatus* was grown in permissive and restrictive conditions for patulin production.

A. clavatus was inoculated into Czapek–glucose medium, without shaking and in Eagle's minimal essential medium with shaking. The first medium supports patulin production while the second does not. For each medium, the patulin level in the medium was quantified by liquid chromatography coupled with UV and mass spectrometry detection, at specific time intervals (3, 5 and 7 days). At the same time, the expression of *PatG* was measured by qRT-PCR.

The identity of patulin was confirmed by high resolution mass spectrometry on the basis of MS and MS^2 spectra. Indeed, it showed a base peak at *m/z* 155.03367 (calculated exact mass: 155.03389, deviation (ppm) −1.39) in positive mode and at *m/z* 153.01966 (calculated exact mass: 153.01933, deviation (ppm) 2.14) in negative mode. These data correspond to a molecular weight of 154 and the formula $C_7H_6O_4$. In ESI (+), the MS^2 peaks were observed at *m/z* 127.03875 (100), 99.03492 (52), 137.02304 (25), 109.0826 (22) and 81.03328 (20). As shown in Fig. 2, the MS2 spectra obtained in negative mode displayed peaks at *m/z* 109.02997 (100), 125.02470 (7), 81.03502 (2.5), and 97.02993 (1.5), according to data previously published (Desmarchelier et al., 2011).

During *A. clavatus* growth on Czapek–glucose medium, patulin concentration increased with culture duration: day 3 (21.7 μg/ml), day 5 (85.5 μg/ml) and day 7 (114.7 μg/ml). The expression of *PatG* increased during incubation as shown in Fig. 3. By contrast, when *A. clavatus* was grown under restrictive conditions (MEM) which does not support patulin production (day 3 (0.006 μg/ml), day 5 (0.05 μg/ml) and day 7 (0.007 μg/ml)), the expression of *PatG* was inhibited.

3.3. Heterologous expression of PATG

On the basis of both the nucleotide sequence and the expression analyses for patulin production, *PatG* encodes for a 6-methylsalicylic acid decarboxylase. The last part of this study was to identify the role of the PATG protein by the means of heterologous expression in yeast.

The coding region of *PatG* was amplified by PCR from cDNA of *A. clavatus* strain NRRL 1980 and was cloned into pYES2.1/V5/His-Topo vector. After galactose induction, the proteins were extracted and analyzed by SDS-PAGE. The over-expressed proteins were detected by Western blotting using anti-V5 antibody. The observed molecular weight was about 43 kDa, in good agreement with the calculated value of 41 kDa for V5 His tagged proteins (Fig. 4). The negative control for the transformed yeast was obtained using the same plasmid vector, including the reverse gene sequence.

Several bioconversion assays were performed. First, we verified that wild type yeast cells do not catalyze the *m*-cresol formed after the transformation of the 6-methylsalicylic acid. Then, galactose-induced yeast cells transformed with *PatG* were incubated with 6-methylsalicylic acid, the candidate phenolic compounds, and the supernatant was analyzed by HPLC. When the 6-methylsalicylic acid was added, a new peak of the reaction product appeared. This product was characterized as *m*-cresol according to its retention time and UV spectrum compared with an authentic standard. The control yeast transformed with the vector containing reverse-inserted *PatG* sequence failed to convert 6-methylsalicylic acid to *m*-cresol (Fig. 5).

Taken together these data indicate that, as predicted from the blast analysis, the protein encoded by *PatG* catalyzes the decarboxylation of 6-methylsalicylic acid to yield *m*-cresol. The status of *m*-cresol as a patulin intermediate was first indicated by the fact that *Penicillium griseofulvum* could convert deutero-labeled *m*-cresol into patulin (Scott and Yalpani, 1967; Forrester and Gaucher, 1972). This observation was strengthened by the isolation and purification of 6-methylsalicylic acid decarboxylase (Light, 1969).

Few decarboxylases belonging to this protein family have been characterized. The o-pyrocatechuate decarboxylase from *A. oryzae* is the only fungal enzyme of this type (Santha et al., 1996). Although decarboxylation represents a common modification of polyketide secondary metabolites, few examples of characterized decarboxylase involved in secondary metabolite biosynthesis pathway exist in literature. For example, the penicillic acid biosynthesis pathway possesses one decarboxylase. This decarboxylase, present in *Penicillium cyclopium* and *Aspergillus ochraceus*, transforms orsellinic acid into orcinol (Sekiguchi et al., 1987). Another orsellinic acid decarboxylase is involved in

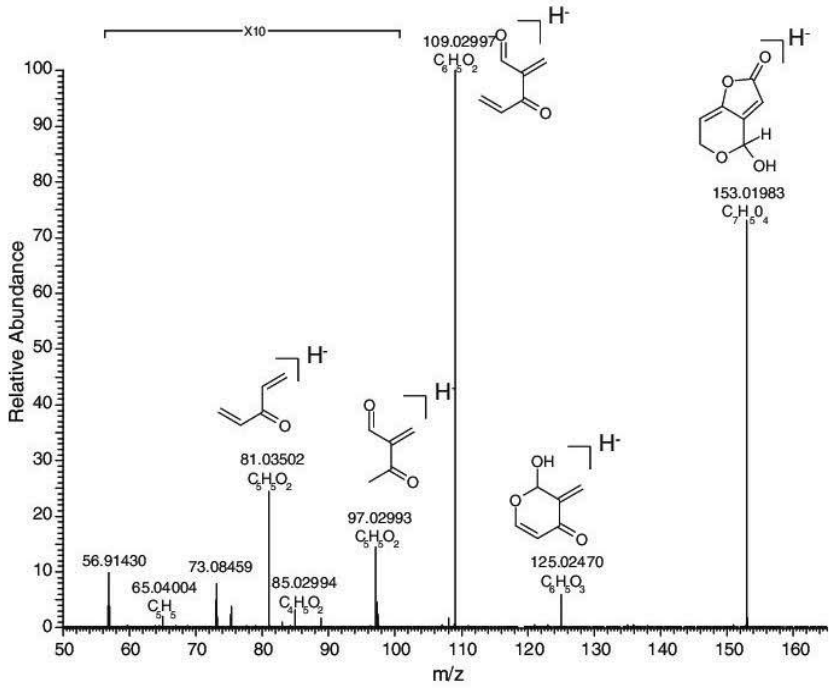


Fig. 2. High resolution MS/MS spectra of patulin.

aurantiogliocladin biosynthesis (Pettersson, 1965). Structural homologies between 6-methylsalicylic acid and orsellinic acid suggest that an enzyme that looks like PATG catalyzes this reaction.

In order to evaluate the specificity of PATG towards 6-methylsalicylic acid, several trials were performed to analyze the conversion of 6-methylsalicylic acid related-substrates. Bioconversion assays were carried out with orsellinic acid and two other substrates catalyzed by decarboxylases: the o-pyrocatechuate decarboxylase which transforms the o-pyrocatechuic acid (2,3 dihydroxybenzoic acid) into 1,2 dihydroxybenzene and the γ-resorcylate decarboxylase which catalyzes the transformation of resorcylic acid (2,6 dihydroxybenzoic acid) into resorcinol. These two decarboxylases share a conserved domain with the protein PATG. The galactose-induced yeasts transformed with *PatG* were incubated with the orsellinic acid; the 2,3 dihydroxybenzoic acid and the 2,6 dihydroxybenzoic acid and the supernatants were analyzed by HPLC after 24 h. None of the substrates was catalyzed by PATG confirming that PATG has specific activity for the 6-methylsalicylic acid.

4. Conclusion

Although patulin is one of the simplest polyketides, its biosynthetic pathway consists of at least 10 enzymatic steps. Recently a cluster of 15 genes involved in the biosynthesis was reported (Artigot et al., 2009). If we exclude the genes encoding for regulatory factors and transporters, 11 genes remain involved directly in

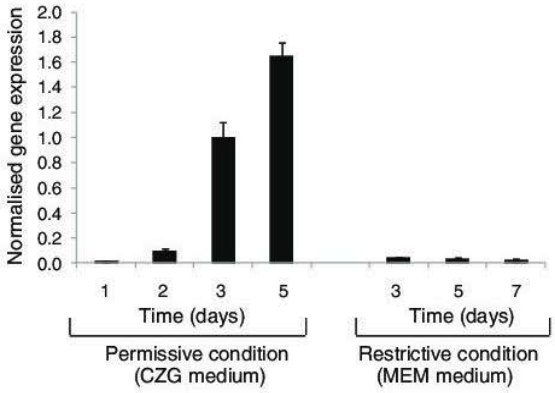


Fig. 3. *PatG* gene expression in patulin-permissive and patulin-restrictive conditions. Patulin-permissive conditions were cultured on Czapek–glucose (CZG) without shaking; patulin-restrictive conditions were cultured on Eagle's minimal essential medium (MEM) supplemented with 5% sterile fetal calf serum, under shaking. *PatG* gene expressions were normalized to the housekeeping gene expression the β-tubulin gene.

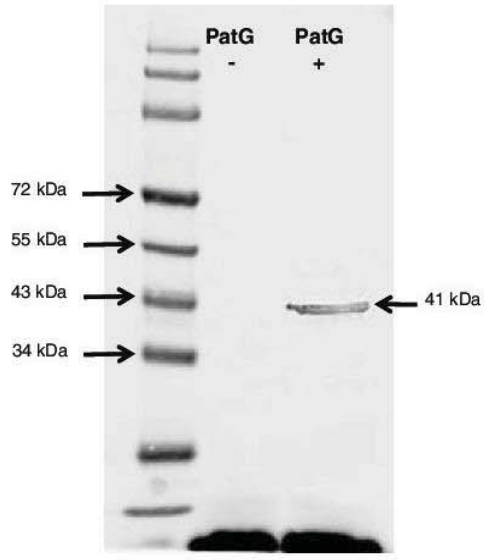


Fig. 4. Analysis of transformant after induction with galactose. Western immunoblot developed with anti-V5 antibody. Lane 1, molecular weight marker; lane 2, total protein from yeast cell control wherein *PatG* gene was inserted in the non-coding direction into the pYES vector with which the yeast cells were transformed; lane 3, total protein from yeast cells expressing PATG decarboxylase.

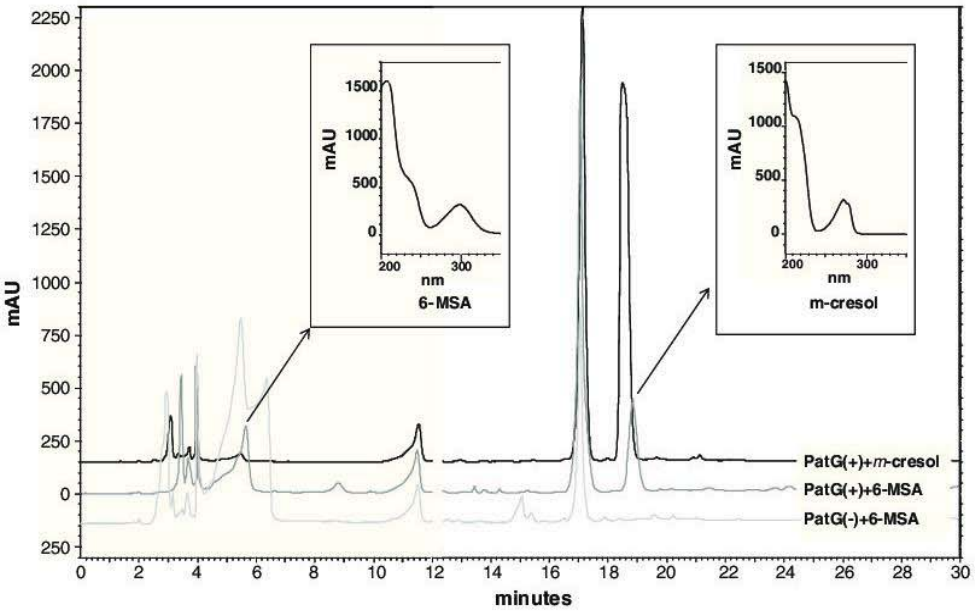


Fig. 5. HPLC analysis of biotransformation assays. Chromatograms at 270 nm of extracts from yeast culture after 24 h of substrate induction. PatG(+) and PatG(−) mean respectively that the *PatG* gene was inserted in the coding or non-coding direction into the pYES vector. Inset, UV spectra of 6-methylsalicylic acid (6-MSA) and *m*-cresol; mAU, milliabsorbance unit.

enzymatic reactions leading to patulin production. So far, only genes encoding for 6-methylsalicylic synthase (*PatK*), *m*-cresol hydroxylase (*PatH*), *m*-hydroxybenzyl alcohol hydroxylase (*PatI*) and isoepoxydon dehydrogenase (*PatN*) have been characterized.

From a biochemical point of view, the first steps of the biosynthetic pathway are clearly elucidated with the successive involvements of 6-methylsalicylic acid synthase, 6-methylsalicylic acid decarboxylase, *m*-cresol hydroxylase and *m*-hydroxybenzyl alcohol hydroxylase. The last part of the biosynthetic pathway is also well characterized with the conversion of neopatulin to ascladiol followed by the transformation of the latter into patulin. The conversion of gentisyl alcohol to two-ring compounds such as neopatulin remains a matter of speculation.

In the present study, we cloned and over-expressed the *PatG* gene from the patulin-producing *A. clavatus* NRRL 1980 strain in a heterologous host. We identified the function of this gene and demonstrated its involvement in patulin biosynthesis. With the identification of the gene encoding the 6-methylsalicylic acid decarboxylase, this study clarifies definitively the second step of the patulin biosynthesis pathway. The role of proteins encoded by five genes is now identified: *PatK*, *PatG*, *PatH*, and *PatI*, involved in the four first steps (acetate → gentisyl alcohol) and *PatN* involved in the transformation of isoepoxydon into phyllostin.

A better understanding of mechanisms which enable fungus to produce its toxin will help to define strategies to reduce patulin in apple-based products. In order to reach this objective the efforts should be continued to unravel the remaining black boxes such as the transformation of gentisyl alcohol into isoepoxydon or the conversion of phyllostin to the two-ring structure neopatulin.

Acknowledgments

Selma Snini was supported by a doctoral fellowship funded by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France). Preliminary sequence data were obtained from the Institute for Genomic Research Website; http://www.tigr.org. Sequencing of *A. clavatus* was funded by the National Institute of Allergy and Infectious Disease (NIAID) funding to William C. Nierman. We thank S. Peterson, a curator of the ARS culture collection for providing *A. clavatus* strain NRRL 1980. We also thank Prof. Y Ebizuka and Prof. P.M. Shoolingin-Jordan for the generous gifts of 6-methylsalicylic acid standards. We thank Dr John Woodley for his correction of the original manuscript.

References

Alexander, N.J., Proctor, R.H., Mccormick, S.P., 2009. Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. Toxin Rev. 28, 198–215.
Artigot, M.P., Loiseau, N., Laffitte, J., Mas-Reguieg, L., Tadrist, S., Oswald, I.P., Puel, O., 2009. Molecular cloning and functional characterization of two CYP619 cytochrome P450s involved in biosynthesis of patulin in *Aspergillus clavatus*. Microbiology 155, 1738–1747.
Beck, J., Ripka, S., Siegner, A., Schiltz, E., Schweizer, E., 1990. The multifunctional 6-methylsalicylic acid synthase gene of *Penicillium patulum*. Its gene structure relative to that of other polyketide synthases. Eur. J. Biochem. 192, 487–498.
Bruchez, J.J.P., Eberle, J., Russo, V.E.A., 1993. Regulatory sequences involved in the translation of *Neurospora crassa* mRNA: Kozak sequences and stop codons. Fungal genet. Newsl. 40, 89–97.
Commission Regulation (EC), 2006. No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Off. J. Eur. Union L 364.
Desmarchelier, A., Mujahid, C., Racault, L., Perring, L., Lancova, K., 2011. Analysis of patulin in pear- and apple-based foodstuffs by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 59, 7659–7665.
Dombrink-Kurtzman, M.A., 2007. The sequence of the isoepoxydon dehydrogenase gene of the patulin biosynthetic pathway in *Penicillium* species. Antonie Van Leeuwenhoek 91, 179–189.
Dombrink-Kurtzman, M.A., Engberg, A.E., 2006. *Byssochlamys nivea* with patulin-producing capability has an isoepoxydon dehydrogenase gene (*idh*) with sequence homology to *Penicillium expansum* and *P. griseofulvum*. Mycol. Res. 110, 1111–1118.
Edwards, R.L., Maitland, D.J., Oliver, C.L., Pacey, M.S., Shields, L., Whalley, A.J.S., 1999. Metabolites of the higher fungi. Part 31.1. Longianone, a C7H6O4 spiro bicyclic lactone from the fungus *Xylaria longiana* (Rehm.). J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 715–720.
Forrester, P.I., Gaucher, G.M., 1972. Conversion of 6-methylsalicylic acid into patulin by *Penicillium urticae*. Biochemistry 11, 1102–1107.
Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Larsen, T.O., Samson, R.A., 2004. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. Stud. Mycol. 49, 201–242.
Gloer, J.B., Truckenbrod, S.M., 1988. Interference competition among coprophilous fungi: production of (+)-isoepoxydon by *Poronia punctata*. Appl. Environ. Microbiol. 54, 861–864.
Goss, R.J.M., Fuchser, J., O'Hagan, D., 1999. Biosynthesis of longianone from *Xylaria longiana*: a metabolite with a biosynthetic relationship to patulin. Chem. Commun. 2255–2256.
Houbraken, J., Samson, R.A., Frisvad, J.C., 2006. *Byssochlamys*: significance of heat resistance and mycotoxin production. Adv. Exp. Med. Biol. 571, 211–224.
Huffman, J., Gerber, R., Du, L., 2010. Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. Biopolymers 93, 764–776.

Islam, M.S., Haque, M.S., Islam, M.M., Emdad, E.M., Halim, A., Hossen, Q.M., Hossain, M.Z., Ahmed, B., Rahim, S., Rahman, M.S., Alam, M.M., Hou, S., Wan, X., Saito, J.A., Alam, M., 2012. Tools to kill: genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. BMC Genomics 13, 493.

Kim, Y.T., Lee, Y.R., Jin, J., Han, K.H., Kim, H., Kim, J.C., Lee, T., Yun, S.H., Lee, Y.W., 2005. Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. Mol. Microbiol. 58, 1102–1113.

Light, R.J., 1969. 6-Methylsalicylic acid decarboxylase from *Penicillium patulum*. Biochim. Biophys. Acta 191, 430–438.

Liu, A., Zhang, H., 2006. Transition metal-catalyzed nonoxidative decarboxylation reactions. Biochemistry 45, 10407–10411.

Marcet-Houben, M., Ballester, A.R., de la Fuente, B., Harries, E., Marcos, J.F., González-Candelas, L., Gabaldón, T., 2012. Genome sequence of the necrotrophic fungus *Penicillium digitatum*, the main postharvest pathogen of citrus. BMC Genomics 13, 646.

Neri, F., Donati, I., Veronesi, F., Mazzoni, D., Mari, M., 2010. Evaluation of *Penicillium expansum* isolates for aggressiveness, growth and patulin accumulation in usual and less common fruit hosts. Int. J. Food Microbiol. 143, 109–117.

Peirson, S.N., Butler, J.N., Foster, R.G., 2003. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. Nucleic Acids Res. 31, e73.

Peng, X., Masai, E., Kitayama, H., Harada, K., Katayama, Y., Fukuda, M., 2002. Characterization of the 5-carboxyvanillate decarboxylase gene and its role in lignin-related biphenyl catabolism in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4407–4415.

Pettersson, G., 1965. An orsellinic acid decarboxylase isolated from *Gliocladium roseum*. Acta Chem. Scand. 19, 2013–2021.

Puel, O., Tadrist, S., Galtier, P., Oswald, I.P., Delaforge, M., 2005. *Byssochlamys nivea* as a source of mycophenolic acid. Appl. Environ. Microbiol. 71, 550–553.

Puel, O., Tadrist, S., Delaforge, M., Oswald, I.P., Lebrihi, A., 2007. The inability of *Byssochlamys fulva* to produce patulin is related to absence of 6-methylsalicylic acid synthase and isoepoxydon dehydrogenase genes. Int. J. Food Microbiol. 115, 131–139.

Puel, O., Galtier, P., Oswald, I.P., 2010. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. Toxins 2, 613–631.

Rasmussen, R.R., Rasmussen, P.H., Larsen, T.O., Bladt, T.T., Binderup, M.L., 2011. In vitro cytotoxicity of fungi spoiling maize silage. Food Chem. Toxicol. 49, 31–44.

Sabater-Vilar, M., Maas, R.F., De Bosschere, H., Ducatelle, R., Fink-Gremmels, J., 2004. Patulin produced by an *Aspergillus clavatus* isolated from feed containing malting residues associated with a lethal neurotoxicosis in cattle. Mycopathologia 158, 419–426.

Santha, R., Rao, N.A., Vaidyanathan, C.S., 1996. Identification of the active-site peptide of 2,3-dihydroxybenzoic acid decarboxylase from *Aspergillus oryzae*. Biochim. Biophys. Acta 1293, 191–200.

Scott, P.M., 1974. Patulin. In: Purchase, I.F.H. (Ed.), Mycotoxins. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, pp. 383–403.

Scott, A.I., Yalpani, M., 1967. A mass-spectrometric study of biosynthesis: conversion of deuteron-*m*-cresol into patulin. Chem. Commun. 945–946.

Sekiguchi, J., Katayama, S., Yamada, Y., 1987. 6-Methyl-1,2,4-benzenetriol, a new intermediate in penicillic acid biosynthesis in *Penicillium cyclopium*. Appl. Environ. Microbiol. 53, 1531–1535.

Seo, J.A., Proctor, R.H., Plattner, R.D., 2001. Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. Fungal Genet. Biol. 34, 155–165.

Tsitsigiannis, D.I., Zarnowski, R., Keller, N.P., 2004. The lipid body protein, PpoA, coordinates sexual and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. J. Biol. Chem. 279, 11344–11353.

Varga, J., Rigó, K., Molnár, J., Tóth, B., Szencz, S., Téren, J., Kozakiewicz, Z., 2003. Mycotoxin production and evolutionary relationships among species of *Aspergillus* section *Clavati*. Antonie Van Leeuwenhoek 83, 191–200.

Varga, J., Due, M., Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2007. Taxonomic revision of *Aspergillus* section *Clavati* based on molecular, morphological and physiological data. Stud. Mycol. 59, 89–106.

Yoshida, M., Fukuhara, N., Oikawa, T., 2004. Thermophilic, reversible gamma-resorcylate decarboxylase from *Rhizobium* sp. strain MTP-10005: purification, molecular characterization, and expression. J. Bacteriol. 186, 6855–6863.

Yu, J., Chang, P.K., Ehrlich, K.C., Cary, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Payne, G.A., Linz, J.E., Woloshuk, C.P., Bennett, J.W., 2004. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. Appl. Environ. Microbiol. 70, 1253–1262.

Zamir, L.O., 1980. The biosynthesis of patulin and penicillic acid. In: Steyn, P.S. (Ed.), The Biosynthesis of Mycotoxins: A Study in Secondary Metabolism. Academic Press, New York, pp. 223–268.

Chapitre 2 Régulation de la voie de biosynthèse de la patuline chez *Penicillium expansum*

RESUME DE L'ETUDE

La mutation du gène *patL*, facteur de transcription spécifique de la voie de biosynthèse de la patuline, affecte la virulence de *Penicillium expansum in vivo*. *(ARTICLE 3)*

Dans cette seconde partie du travail expérimental nous nous sommes intéressés à la régulation de la voie de biosynthèse de la patuline.

Comme expliqué précédemment, les voies de biosynthèses sont des cascades de réactions enzymatiques où d'un point de vue moléculaire, toutes les enzymes impliquées fonctionnent au même moment. De cette façon, les nouveaux intermédiaires synthétisés sont immédiatement pris en charge par l'enzyme suivante jusqu'à la synthèse de la mycotoxine finale. Ces enzymes sont codées par des gènes organisés sous forme de cluster. Généralement au sein du cluster est présent un gène codant pour un facteur de régulation spécifique à la voie de biosynthèse du métabolite. Ce facteur joue le rôle d'interrupteur du cluster. Lorsqu'il est activé, il induit l'expression des autres gènes du cluster et par conséquent enclenche la production du métabolite. De nombreux facteurs de régulations spécifiques à des voies de biosynthèses de mycotoxines sont connus. Néanmoins, le facteur de régulation spécifique de la voie de biosynthèses de la patuline demeurait inconnu jusqu'à cette étude.

Cette fois, nous avons utilisé comme organisme modèle, *Penicillium expansum*, producteur de patuline et responsable de grandes pertes économiques dans la filière pomme. Grâce à une analyse BLAST des séquences des protéines codées par les gènes du cluster chez *Penicillium expansum* nous avons pu emmètre l'hypothèse que le gène *patL* coderait pour le facteur de régulation spécifique de la voie de biosynthèse de la patuline. En effet, la protéine codée par ce gène présentait deux domaines conservés retrouvés chez de nombreux facteurs de transcriptions de champignons filamenteux. Parmi ces domaines conservés le premier code pour un site de fixation à l'ADN de type Cys6 et le second est retrouvé dans les facteurs de transcription de la superfamille des facteurs de transcription à doigt de zinc.

La stratégie employée a été de construire une cassette de délétion du gène *patL* chez *Penicillium expansum.* Cette cassette a permis le remplacement du gène *patL* par un gène conférant la résistance à un antibiotique, permettant ainsi la sélection des transformants. Après obtention du mutant, divers paramètres ont été étudiés. La production de patuline et l'expression de chacun des gènes du cluster ont été analysés. Comme attendu, la souche délétée pour le gène *patL* ne produit plus de patuline et l'expression des gènes du cluster est insignifiante. D'autre part, l'impact de cette délétion sur la morphologie de *Penicillium expansum* mais aussi sur sa capacité à infecter des pommes a été analysé. De manière surprenante, la morphologie de *Penicillium expansum* est affectée par cette délétion. D'autre part, la patuline joue un rôle dans la virulence de *Penicillium expansum* lorsqu'il infecte des pommes de variété

Golden Delicious. En effet, en comparaison aux pommes infectées par une souche sauvage, le développement des lésions brunes est ralenti pour les pommes infectées avec la souche mutante, non productrice de patuline.

Tous les détails au sujet de cette étude, qui sera bientôt soumise pour publication, sont présentés à la suite sous forme d'article.

The disruption of *patL,* the patulin specific transcription factor affects *Penicillium expansum* virulence on apples.

Selma P. SNINI[1,2], Joanna TANNOUS[1,2,3], Pauline HEUILLARD[1,2], Sylviane BAILLY[1,2], Yannick LIPPI[1,2], Enric ZEHRAOUI[4], Christian BARREAU[4], Isabelle P. OSWALD[1,2] and Olivier PUEL[1,2*].

[1]INRA, UMR 1331 Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, 180 Chemin de Tournefeuille, F-31027 Toulouse, Cedex

[2]Université de Toulouse III, ENVT, INP, UMR 1331, Toxalim, F-31076, Toulouse, France

[3]Université Saint-Joseph, Centre d'Analyses et de Recherches (Faculté des Sciences), Campus des Sciences et Technologies, Mar Roukos, Mkallès, P.O Box 11- 514 Riad El Solh, Beyrouth 1107 2050, Lebanon

[4]INRA, UR1264 - MycSA, Villenave d'Ornon, France.

[*]Corresponding author: Olivier Puel
opuel@toulouse.inra.fr

ABSTRACT

Patulin is a toxic secondary metabolite produced by several fungal species belonging to A*spergillus*, *Penicillium* and *Byssochlamys* genera. It is the most common mycotoxin found in apples and apple-derived products such as juice, cider, puree and other food intended for young children. The production of this mycotoxin is associated with a blue mold decay of apples, disease caused by *Penicillium expansum*. Patulin is cytotoxic, genotoxic and has immunosuppressive properties but no studies have demonstrated that patulin could be carcinogenic. As other well-known mycotoxins, patulin is the final product of a string of enzymatic reactions. In filamentous fungi, secondary metabolites biosynthetic pathways are enzymatic cascades where enzymes are activated at the same time and the news synthesized products are consecutively metabolized by the next enzyme. This phenomenon is due to the organization of the genes encoding for the enzymes involved in the biosynthesis in cluster. These genes are co-activated by a transcription factor often located within the cluster. Recently, the cluster of the genes (*patA*-*patO*) involved in patulin biosynthesis was identified in *Penicillium expansum*. A BLAST analysis has revealed that *patL* encodes for a protein, which presents several characteristic patterns of Cys_6 zinc finger regulatory factor and presents a high homology with AFLR, the specific regulatory factor of aflatoxins biosynthesis. Disruption of *patL* caused the inability to produce patulin with an important decrease of *Pat* genes expression. In the complemented PeΔ*patL*:*patL* strain, the ability to produce patulin is restored. Pathogenicity studies performed on apples indicated that the PeΔ*patL* strain can infect apples but not in the same way as the wild type strain. Based on these results, we can conclude that patulin plays a role in the development of the blue mold decay on apples.

INTRODUCTION

Blue mold, caused by *Penicillium expansum,* is the most important apple postharvest disease. *Penicillium expansum* is a pathogen, which infects fruit tissues causing maceration and decay. Injuries on the fruit skin done by birds, insects or even humans during the harvest or postharvest handling process, are the principal sites of invasion by fungal conidia. Blue mold represents a significant economic problem for the fresh-fruit industry, causing up to 80 % of decay in stored fruits (Morales et al. 2007). Little is known about pathogenicity determinants of *P. expansum.* A great number of studies focused on the close relationship between the modulating of the host's ambient pH by fungus and pathogenicity. *P. expansum* acidifies apple tissues via the secretion of organic acids such as gluconic and fumaric acid accompanied by an amonium depletion (Prusky et al. 2004; Vilanova et al. 2014). The fungus produces gluconic acid from the catalyze of β-D-glucose by glucose oxydase (GOX). As for other postharvest pathogens, a key factor in the pathogenicity of *P. expansum* is the secretion of pectolytic enzymes. The action of one of these enzymes, polygalactorunase results in the tissue maceration. The acidification of apple tissue activates transcription of polygalacturonases in fungus. The blue mold caused by *P. expansum* is associated with patulin production that affects the quality of apple products. Patulin is a toxic secondary metabolite that has been reported to cause intestinal disorders (McKinley and Carlton 1980) with ulceration and bleeding (Speijers et al. 1988). Because of the patulin is cytotoxic, genotoxic and has immunosuppressive properties (Moake et al. 2005), the European Union has fixed the maximum tolerated level at 50 µg kg^{-1} for fruit juice and derived products, 25 µg.kg^{-1} for solid apple products. The level in food destinated for babies and young children was set at 10 µg.kg^{-1}.

The biological role of mycotoxins is not clear but several studies attribute to mycotoxins a role in pathogenicity and virulence in animal and plant fungal pathogens (Scharf et al. 2014). In human, gliotoxin enhances the virulence of *Aspergillus fumigatus* by inhibiting the phagocytosis activity of neutrophils that normally eliminate fungus from lung epithelium (Comera et al. 2007). As other secondary metabolite essential for pathogenicity is melanin. DHN melanin is essential for virulence of *A. fumigatus* in human, but also for virulence of *Magnaporthe oryzae* in rice (Woloshuk et al. 1980; Langfelder et al. 1998). For instance, deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV), and fumonisin B1 (FB1) proved to have a well-established role in the onset of diseases on cereals by *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides* (Desjardins et al. 1995; Proctor et al. 2002; Maier et al. 2006; Glenn et al. 2008). In order to elucidate the biological role of mycotoxins, some study used the gene disruption technique for blocking the biosynthetic pathway in a step or for completely turn off this biosynthetic pathway (Proctor et al. 1995; Tsai et al. 1998). The first method leads to the accumulation of one intermediate while the second removes the biosynthesis of the mycotoxin and all intermediates.

In filamentous fungi, the production of secondary metabolites is usually orchestred by a series of genes generally organized in clusters (Keller and Hohn 1997; Keller et al. 2005). A large number of clusters related to the production of secondary metabolites have already been discovered such as the cluster responsible for the biosynthesis of several mycotoxins, like aflatoxins (Yu et al. 2004), fumonisins (Seo et al. 2001) and trichothecenes (Kimura et al. 2007). Based on biochemical, genetic and molecular studies, different patterns for the biosynthesis of patulin have already been proposed. First, the cluster of patulin biosynthesis was characterized in *Aspergillus clavatus* (Artigot et al. 2009). In the organism *Aspergillus clavatus,* two genes encoding P450 cytochrome (Artigot et al. 2009) and one encoding for the 6-methylsalicylic decarboxylase (Snini et al. 2014) were characterized. Then, very recently, the cluster of patulin biosynthesis was identified in *Penicillium expansum*, the main producer of patulin in apple (Tannous et al. 2014).

Fungal secondary metabolites biosynthetic pathways are enzymatic cascades where enzymes are activated at the same time and the news synthesized products are consecutively metabolized by the next enzyme. This phenomenon is due to the organization of the genes encoding for the enzymes involved in the biosynthesis within a cluster. These genes are co-activated by a specific transcription factor within the cluster which is it-self activated by other global transcription factors such as LaeA and Vea. However sometimes, the gene coding for the transcription factor is out the cluster (Flaherty and Woloshuk 2004). Transcription factors are proteins that regulate gene expression by binding to specific gene promoters sites. Positive acting pathway-specific transcription factors are known for the trichothecene (Proctor et al. 1995) aflatoxins/sterigmatocystin (Payne et al. 1993; Woloshuk et al. 1994; Yu et al. 1996).

Numerous studies have revealed that most of transcription factors can be grouped into different families on the basis of similarities in their DNA binding domains.

The zinc finger binding motif is a DNA binding domain that occurs in transcription factors of yeast and fungi (Ehrlich et al. 1999a; Ehrlich et al. 1999b) and the Cys6 zinc binding motif has the amino acid consensus sequence Cys-X_2-Cys-X_6-Cys-X_{5-9}-CyS-X_2-Cys-X_{6-7}-Cys (Coleman 1992). The specific transcription factor plays the role of a switch between the production and the no-production of the mycotoxin.

In this study we report the isolation and characterization of a gene, *patL*, within the patulin biosynthesis cluster. We engineered a genetically modified strain of *Penicillium expansum* lacking the *patL* (PeΔ*patL* strain) and therefore showed the key role played by PATL in the regulation of patulin biosynthesis. The involvement of patulin in pathogenicity and virulence of *Penicillium expansum* was studied as well.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

Patulin was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). All solvents used in the extraction and high-performance liquid chromatography (HPLC) were analytical grade. Water for the HPLC with Diode Array Detector (DAD) was purchased from Merk (Darmstadt, Germany). Water for the molecular biology procedures was purified by using a Millipore MilliQ purification system (Billerica, MA, United States).

Strains, media and culture conditions

Penicillium expansum NRRL 35695 (USDA-ARS National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Ill.) initially isolated from grape berries in the Languedoc Roussillon (France) was used in this study. It was cultured on Potato Dextrose Agar (PDA) medium (Sigma-Aldrich) at 25°C for 7 days in dark. Cultures intended for preparation of protoplasts were grown 12 hours in 250 mL of yeast extract peptone dextrose (YPD) medium (20 g dextrose, 10 g yeast extract, 20 g bactopeptone per litre) on an orbital shaker set at 25°C and 150 rpm. Cultures were inoculated with $3x10^7$ conidia.

Saccharomyces cerevisiae FY1679: MATa/MATα ura3-52/ura3-52; trp1Δ 63/TRP1; leu2Δ 1/LEU2; his3Δ 200/HIS3; GAL2/GAL2 was used in order to obtain the Pe*PatL* gene disruption cassette by homologous recombination.

Escherichia coli Top 10F' (provided with TOPO TA cloning Kit-Invitrogen) was used for plasmid propagation. This strain was grown at 37°C on solid or in liquid Luria-Bertani medium, both contained ampicillin at the concentration of 100 µg/ml.

ADOPTED STRATEGY TO OBTAIN PeΔpatL MUTANT AND COMPLEMENTED STRAIN

Construction of the ΔpatL gene disruption cassette

The cluster of genes involved in biosynthesis of patulin was recently sequenced from the *P. expansum* NRRL 35695 (Tannous et al. 2014). So specifics primers of *patL* were designed from the *P. expansum* patulin cluster sequence deposited in GenBank (KF899892). These primers are listed in Table 1.

Table 1 : Primers used in this study

PRIMER	SEQUENCE (5'→ 3')	ANNEALING TEMPERATURE
5fdebpatLPex[1]	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGCGGACACTTCACCTTGTAAAGGATCTG	60 ˚C
debpatLPex1Rhygro[2]	GAGCCTGTGTGTAGAGATACAAGGGAATTCGACGGAGGCGTGGGGTGGA	60 ˚C
hphF1	GAATTCCCTTGTATCTCTACACACAGGCTC	62 ˚C
hphR1	CGAGTGGAGATGTGGAGTGGGCG	62 ˚C
finpatLPex1Fhygro[2]	GTGTAAGCGCCCACTCCACATCTCCACTCGGTCCGACTTAGAGTACCGCCCTC	60 ˚C
3rfinpatLPex[1]	GCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCCCTATAGGCCTTGTGGGACCATAC	59 ˚C
dpatL-nestedF	GACCTCACTCCGACTCCTTCAAAGATC	61 ˚C
dpatL-nestedR	GGCCTCTAGACATGATTTCCTTCATAGG	60 ˚C
dpatLF3	CGGCGTAGGAGTTTAGTTCATAAGGC	60 ˚C
dpatLR3	GAGGACTGGCAAGTCGAGGCTG	60 ˚C
hygF	TCGGAGGGCGAAGAATCTCG	55 ˚C
hygR	CCGAACATCGCCTCGCTC	55 ˚C
probePePatLF	GGTCTACTTGCTCCTTACCCAGG	59˚C
probePePatLR	GCAAAAGGCTCCACCTTGTACGTAC	59˚C

[1]The sequence underlined were added at the 5'end and were identical to the extremities of the pRS426 cloning vector
[2]The sequence underlined was added at the 5'end and were identical to the extremities of the PCR product generated by primers hphF1/hphR1

A gene replacement cassette Δ*patL* carrying the hygromycin resistance cassette flanked by DNA sequences corresponding to the sequences located at 5' (left jonction) and 3' (right jonction) ends of the *patL* gene was constructed by using homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae.* The strategy employed is detailed in the Figure S1.

Briefly, fragments required for the gene disruption cassette were amplified by PCR and gathered in *S. cerevisiae*, which is able to assemble PCR fragments. *S. cerevisiae* assembles PCR fragment into the pRS426 cloning vector.

By PCR, a 1179 bp DNA fragment matching with the promoter and the 5' untranslated region of *patL* gene (left junction) and a 1049 bp fragment matching with the 3' untranslated region of *patL* gene (right junction) were amplified from the genomic DNA of *P. expansum* NRRL 35695 strain using two pairs of primers 5fdebPatLPex/DebPatLPex1Rhygro and FinPatLPex1Fhygro/3rfinPatLPex respectively. The pair of primers hphF1/hphR1 was used to amplify a 4107 bp fragment encoding for the hygromycin resistance cassette, containing *hph* gene under the control of *A. nidulans gpdA* promoter and *A. nidulans trpC* terminator. This cassette was amplified from the pAN7.1 expression vector (Accession number Z32698). In Table 1, the sequence underlined in primers DebPatLPex1Rhygro and FinPatLPex1Fhygro were added at their 5'end. These sequences are identical to the extremities of the PCR product generated by primers hphF1/hphR1 in order to promote recombination between PCR products. The sequences underlined in primers 5fdebPatLPex and 3rfinPatLPex were added at their 5'end, there are identical to the extremities of the pRS426 cloning vector used for the homologous recombination in *S. cerevisiae*. These three amplicons were purified using GenElute™PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich) as described in the procedure specified by the manufacturer. The PCR conditions for amplify the left junction and the right junction were: denaturation at 98°C for 30 s, followed by 40 cycles with denaturation at 98°C for 10 s, annealing at 60°C for 30 s and extension at 72°C for 45 sec. A final extension step at 72°C for 10 min was performed. The PCR conditions for amplify the hygromycin resistance cassette was the same as previously described except for the cycle extension which was performed at 72°C for 2 min. The Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo scientific, Illkirch, France) was used for PCR reactions.

The two junctions were cotransformed into yeast along with the hygromycin resistance cassette and the pRS426 cloning vector. Homologous recombination creates the circular construct. The procedure allowing the yeast transformation was achieved accordingly to Colot et al. (2006) with few changes. Before yeast transformation, the pRS426 cloning vector was digested by BamHI and EcoRI and for the yeast DNA extraction, the Fastprep system (MP biomedical, France) with lysing matrix C (MP biomedical) in yeast lysis buffer was used instead of 0.5 mm glass beads.

After yeast DNA extraction, the resulting linear deletion cassette (6229 bp) was amplified from the pooled yeast DNA with nested primers dPatL-NestedF and dPatL-NestedR. The following PCR conditions were used: 40 cycles with denaturation at 98°C for 10 s, annealing at 61°C for 30 s and extension at 72°C for 3.25 min. An initial denaturation step of 30 s at 98°C and a final extension step at 72°C for 10 min were performed. The Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo scientific) was used.

This DNA fragment carrying the hygromycin resistance cassette fused to *patL* flanking regions was used to transform protoplasts of the *P. expansum* NRRL 35695 strain in order to generate the mutated PeΔ*patL*1 strain.

For the complementation, primers dPatLF3/dPatLR3 was used to generate the DNA fragment from the WT strain to transform protoplasts of PeΔ*patL*1 strain.

Protoplasts preparation, transformation and transformants selection

In order to prepare protoplasts of *P. expansum*, a culture grown in agitated YPD liquid medium for 12 hours at 25°C was filtered through polyethylene filter (Sigma-Aldrich), washed with NH_4Cl and treated with Lysing Enzymes from Trichoderma harzianum (Sigma-Aldrich) (20 mg/mL of MgSO4 1.2 M, pH 5.8) during 3 hours at 26°C on an orbital shaker set at 60 rpm. As previously described (Merhej et al. 2011), after incubation protoplasts and cellular debris were deposited to the bottom of a tube containing MS buffer (Sorbitol 0.6 M and MOPS 10 mM, pH 6.3). Cellular debris and protoplasts were separated by centrifugation. The formed interphase containing protoplasts were removed and washed with TMS buffer (Sorbitol 1 M and MOPS 10 mM, pH 6.3). Protoplasts were harvested and resuspended in TMSC buffer (Sorbitol 1 M and MOPS 10 mM and $CaCl_2$ 40 mM, pH 6.3).

To 100 µL of protoplasts in TMSC buffer (1.107 protoplasts/mL) were added 5 µg of target DNA in 60 µL Tris-EDTA-CaCl2 buffer (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, $CaCl_2$ 40 mM, pH 7.5) and were mixed with 60 % PEG (Polyethylene glycol) solution. For the complementation, the target DNA was cotransformed with 2 µg of a geneticin resistance pSM334 plasmid. This mixture was added to 50 mL of TopAgar YPDS (10 g/L of yeast extract, 20 g/L of bactopeptone, 182 g/L of sorbitol and 7,5 g/L agar) and spread on ten YPDS plates (10 g/L of yeast extract, 20 g/L of bactopeptone, 182 g/L of sorbitol and 15 g/L agar). Plates were incubated in the dark at 25°C for 24 hours. The following day, 5 mL of TopAgar YPDS containing hygromycin (150 µg/mL) or geneticin (100 µg/mL) were added on plates and replaced at 25°C. Transformants were purified by monoconidial isolation and screened for successful insertion as follow describes.

Nucleic acid manipulation

To confirm the insertion of the hygromycin resistance cassette at the *patL* locus in genomic DNA, PCR followed by enzymatic digestions were performed. First, genomic DNA was extracted as previously described (Puel et al. 2005) and PCR with the pair of primers dPatLF3/dPatLR3 was carry out. These primers are outside the left and the right junction of the disruption cassette. The following PCR conditions were used: 35 cycles with denaturation at 98°C for 10 s, annealing at 61°C for 30 s and extension at 72°C for 3.45 min. An initial denaturation step of 30 s at 98°C and a final extension step at 72°C for 10 min were performed. The Phusion High-Fidelity DNA Polymerase was used.

For the wild-type strain this PCR generated a 5030 bp fragment whereas for the PeΔ*pat*L1 strain generated a 6681 bp fragment. Enzymatic digestions with NdeI of these PCR products produced three fragments (122 bp, 1030 bp and 3878 bp) for the wild-type strain and four fragments (122 bp, 1030 bp, 1570 bp and 3959 bp) for the PeΔ*pat*L1 strain.

Southern blot analysis were performed on 20 µg of genomic DNA digested with StuI restriction enzyme, separated by electrophoresis in a 0.8 % agarose gel and transferred onto a nylon membrane Hybond N^+ (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France). The membrane was hybridized with biotin-labeled probes synthesized according to the procedure specified by the manufacturer (Li-Cor, Lincoln, Nebraska, United-States). The Hyg DNA probe (homologous to hygromycin resistance cassette) and the PatL DNA probe (homologous to 3' right jonction of the *patL*) gene were generated using respectively primer pairs hygF/hygR and probePatLPeF1/probePatLPeR1 (Table 1). The Hyg DNA probe was amplified from the pAN7.1 expression vector (Accession number Z32698) and the PatL DNA probe from the genomic DNA of *P. expansum* NRRL 35695 strain.

COMPARATIVES ANALYSIS BETWEEN WILD-TYPE, MUTANT AND THE COMPLEMENTED STRAINS

In vitro growth, macroscopic and microscopic morphology

All strains of interest were stored on MEA at +4°C. Before experiments, strains were plated on MEA and grown for 7 days at 25°C. Spore suspensions were prepared according to Adjovi et al. (2014)

To compare radial growth, a calibrated inoculum of 10^4 spores was plated centrally on both MEA and PDA, incubated at 25°C in the dark and colony diameters were measured after 7 days. For macroscopic and microscopic examination, a 3 points culture was done on same media.

Macroscopic (color of conidial areas, colony margin, colony texture, pigmentation, exudate, reverse color…) and microscopic (conidiophore branching pattern, phialide and conidia shape, ornamentation…) characters were observed under stereomicroscope (Olympus SZX9 –X12-120) and optical microscope (Olympus CX41 – X400 and X1000) respectively.

Quantitative analysis of the patulin gene cluster relative expression

Cultures conditions used for the quantitative analysis of the patulin gene cluster relative expression were the same as previously described by Tannous et al. (2014). The apple based medium (APAM medium), a permissive substrate for patulin production was used (Baert et al. 2007) and plates were incubated 5 days under dark at 25˚C. Cultures were also permorned on Czapek agar medium. Following mycelia growth, total RNAs extraction and reverse transcription were performed as previously described by Tannous et al. (2014). Real-Time-PCR was used to quantitatively evaluate the expression of the gene cluster in each strain. Primers used and real-time-PCR conditions were the same as designed by Tannous et al. (2014). After incubation, the agar medium was extracted as previously described by Tannous et al. (2014) and patulin production was assessed by HPLC-DAD. Six biological replicates were done for each strain.

Patulin production analysis in vivo

The ability to cause blue mold and patulin production by WT and mutant strains was assessed *in vivo* on Golden Delicious apples. Apples were chosen free of defects or injuries and purchased from a supermarket in Toulouse (France).

As previously described Sanzani et al. (2012), apples were surface-sterilized in 2% sodium hypochlorite solution and rinsed with water. Apples were wounded with a sterile toothpick. For each isolate, 10 µl of a suspension at concentration 10^4 conidia/ml was deposited into the wounds of apples. Apples were incubated at 25° in the dark for 14 days. Diameters of rotten spots were measured every two days of the incubation period, the growth rate and the volume of the rot were determined. Patulin was extracted from apples and quantified by HPLC. To determine the volume of the rot, the method previously described by Baert et al. (2007) was used.

At the end of the incubation period, apples were grinded thanks to a blender and as previously described by MacDonald et al. (2000) an aliquot (10 grams) of each sample was digested overnight at room temperature with 150 µl of *Aspergillus aculeatus* pectinase enzyme (Sigma-Aldrich) and 10 ml of distilled water. Then, samples were centrifuged at 4500 g for 5 min and supernatants were collected and extracted with 50 ml of ethyl acetate. After overnight shaking, the organic phase was filtered through Whatman paper and evaporated in two steps: firstly with a rotary evaporator *in vacuo* set at 50°C and then with a Zymark TurboVap

(McKinley Scientific, Sparta, NJ, United States) set at 60°C. The residue was taken up in 300 µl methanol/water (80/20), and this suspension was filtered through at 0.45 µm pore-size filter before injection (25 µl) into the chromatography apparatus. Patulin production was determined by HPLC-DAD analysis. Six biological replicates were done for each strain.

Kinetic of the patulin production in apples by the wild-type strain

In order to determine the time where *Penicillium expansum* starts to produce patulin when it infects apples a kinetic was performed. Eighteen Golden Delicious apples were inoculated as the same manner described in the previous paragraph and incubated at 25°C degrees. Each day, during 6 days, three apples were analyzed. Diameters of the rotten spot were measured and the rotten part was cut with a margin of one centimeter in the healthy par in order to quantify the produced patulin. Samples were grinded and were used to quantify patulin. The method used was the same as previously described. Patulin production was determined by HPLC-DAD analysis.

HPLC-DAD analysis

The chromatography apparatus used for the patulin quantification was an Ultimate 3000 HPLC system (Dionex/ThermoScientific, Courtaboeuf, France). Analyses were performed with a 250 × 4.60 mm Gemini 5 µm C6-Phenyl column (Phenomenex, Torrance, CA, United States) at a flow rate of 0.9 $mL \cdot min^{-1}$ using the following gradient elution program.

Eluent A was water acidified with 0.2% acetic acid and eluent B was methanol HPLC grade (Fisher Scientific, Illkirch, France). Elution conditions used was: 0 min 100 % B, 10 min 90 % B, 30 min 50 % B, 45 min 90 % B, from 45 to 50 min 90 % B, from 60 to 65 min 0% B. The presence of patulin was monitored at a wavelength of 277 nm. The patulin identity was confirmed by its retention time (min) according to a standard (Sigma-Aldrich) and quantified by measuring peak area according to the standard curve.

Statistics

Following the Fischer test on equality of variance, one-way ANOVA was used to analyze the differences between the different strains. The statistical analysis of the data was carried out with Statview software (Statistical Analysis System; SAS for Windows 98; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Differences were considered to be statistically significant when the *p*-value was lower than 0.05.

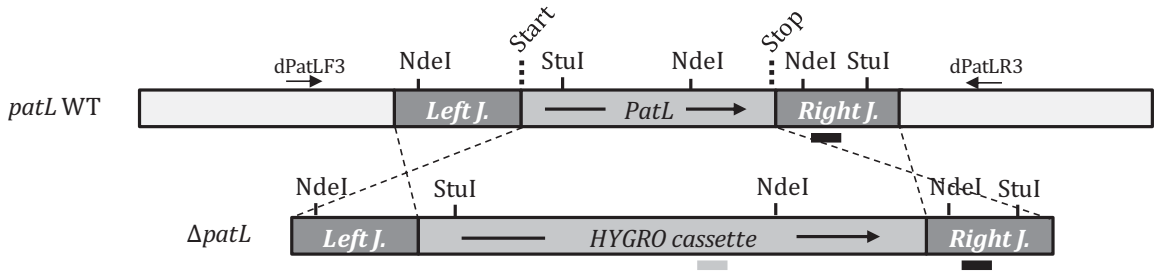


Figure 1: Construction of PeΔ*patL* mutant.
Map of the *patL* WT locus and the replacement construct *ΔpatL* containing hygromycin resistance cassette. Primers used to elaborate a PCR strategy for distinguishing between wild-type and locus integrated transformants are indicated with arrows. The direction of the arrows indicates the direction in which DNA synthesis is primed. Black bars and grey bar indicated respectively the position of the PatL DNA and the Hyg DNA probes used in the Southern blot. The NdeI and StuI sites are also represented.

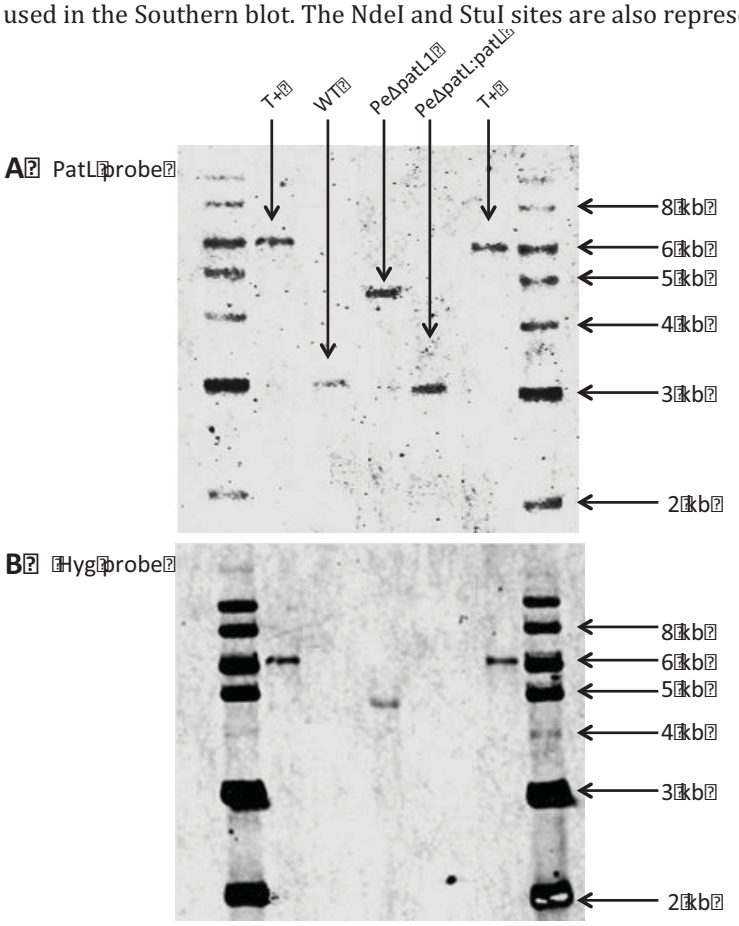


Figure 2: Southern blot analysis of genomic DNA of the wild-type, the PeΔ*patL*1 transformant and the complemented transformant PeΔ*patL*:*patL*.
DNA was digested with StuI and hybridized by the PatL probe (A) and with the Hyg probe (B) both indicated in the map. A-The PeΔ*patL*1 transformant show a unique fragment of 4.7 kb consistent with the replacement of the patL gene by the Δ*patL* cassette. The complemented strain show one fragment of 3 kb corresponding to an integration of the wild type copy of patL. B-Only the PeΔ*patL*1 transformant show a unique fragment of 4.7 kb consistent with the replacement of the patL gene by the Δ*patL* cassette. The wild type and the complemented strain did not hybridized corresponding to the absence of the Δ*patL* cassette. The T+ corresponding to the Δ*patL* cassette of 6.7 kb.

RESULTS

Sequence analysis of patL gene from Penicillium expansum

The search of the putative conserved domains in the Conserved Domain Database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml) indicated that the *patL* gene product belongs to a large family of fungal zinc cluster transcription factors that contains an N-terminal GAL4-like C6 zinc binuclear cluster DNA-binding domain. This kind of domain is only found in fungi, therefore the hypothesis of this study was that the *patL* gene encode for the specific regulatory factor involved in the patulin biosynthesis.

patL gene disruption and complementation

In order to study the role of PATL in regulating *pat* gene expressions, PeΔ*patL* mutants were generated by transformation of the gene replacement cassette Δ*patL* shown in Figure 1 in the wild type *P. expansum* NRRL 35695 strain. After the transformation of *P. expansum* wild type NRRL 35695 strain with the disruption cassette, fifty-one fungal transformants were isolated and purified by single-spore isolation. All the transformants were tested for their ability to produce patulin on Czapek-glucose broth and only those which did not produce patulin were selected for the following tests. Fourty-four fungal transformants did not produce patulin and among them, 19 were analysed by PCR to determine which mutant carried a disrupted *patL* gene.

First, the presence of the disruption cassette in the genome of the mutants was confirmed by amplifying the genomic DNA with primers that anneal to the sequence of the hygromycin gene resistance. All the transformants tested presented the Δ*patL* disruption cassette. Then, the presence of the disruption cassette at the *patL* locus was confirmed by amplifying the genomic DNA with primers the dPatLF3/dPatLR3. The primers were designed to anneal on the *P. expansum* genome and not on the Δ*patL* disruption cassette. The difference between the obtained PCR products length of the wild type strain and the mutant strains was sufficient to differentiate them. The wild type strain presented a 5030 bp amplicon whereas mutants presented a 6681 bp amplicon. To confirm the presence of the disruption cassette at the *patL* locus, an enzymatic digestion of the amplicon previously obtained were performed using NdeI. Out of the 19 isolates tested, 17 showed three fragments (122 bp, 1030 bp and 3878 bp) confirming a mutant profile.

The Southern blot has confirmed that the PeΔ*patL*1 has only one insertion of the disruption cassette at the *patL* locus. For the following experiments, only the mutated strain PeΔ*patL*1 was used.

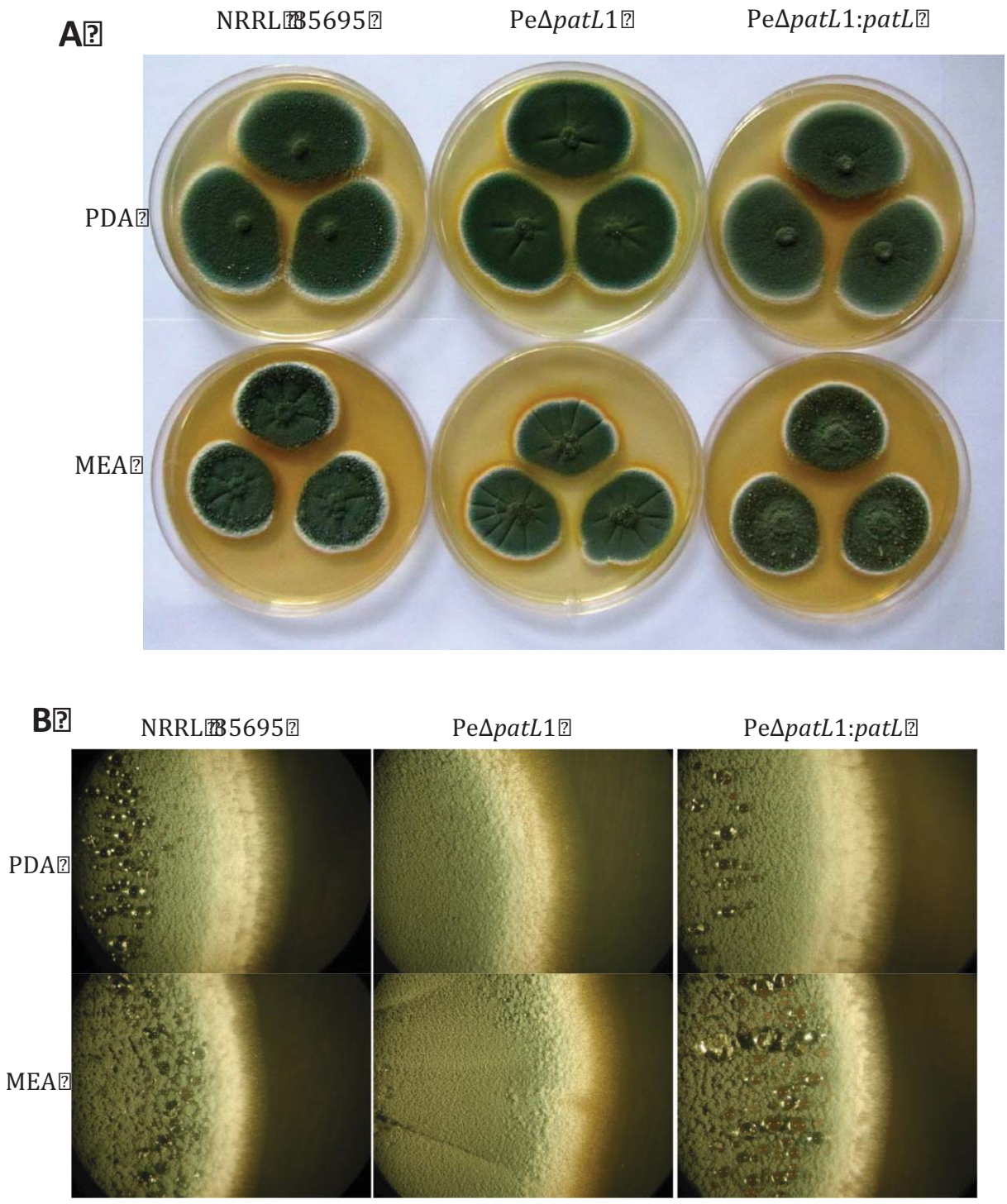


Figure 3: Morphological aspect of NRRL 35695, PeΔ*patL*1 and complemented strains after 7 days of culture at 25°C on PDA and MEA.
A. Macroscopic aspect of colonies B. Observations under stereomicroscope (x12)

To confirm that the phenotype exhibited by the mutant strain PeΔ*patL*1 were a result of the mutation of the *patL* gene, the disrupted strain PeΔ*patL*1 was transformed with a wild-type copy of *patL* for generate the complemented strain PeΔ*patL*:*patL* (Figure 2).

Effect of PePatL disruption on in vitro growth, macroscopic and microscopic morphology

No significant difference was observed between radial growth of PeΔ*patL*1 and wild-type NRRL 35695 strains. Indeed, after 7 days of incubation on MEA, colony diameters were 39.3 +/- 0.6mm and 40 +/- 1mm for wild type and mutant respectively. Similar results were observed on PDA with colony diameters of 41.3 +/-0.6mm and 40.5 +/-0.7mm for wild type and mutant respectively.

Overall morphology of wild type and mutant strains was very similar.

Macroscopically, both colonies displayed a classical *Penicillium expansum* blue-green color with marked white margin (Figure 3A). The texture of the colony was comparable with a clear fasciculation. The aggregation of conidiophores into erect bundles gave to the surface a granular appearance. However, the surface of mutant colony appeared mildly planer with less definite coremia than wild type (Figure 3B). PeΔ*patL*1 strain also presented other particularities: exudate was less abundant and a yellow pigment was clearly visible on MEA.

Microscopically, both strains structures were similar and typical of *P. expansum*: Conidiophores were hyaline, terverticillate with the branches appressed against the main axis. The stipes were smooth-walled on PDA and finely roughened on MEA. Phialides were cylindrical with a short distinct neck. Conidia were ellipsoidal when young then turned subglobose, greenish and smooth-walled (data not shown).

Microscopic and macroscopic characteristics of the complemented strain PeΔ*patL*:*patL* were similar to wild type strain.

Effect of PePatL disruption on patulin production in vitro and in vivo

The capacity to produce patulin was assessed *in vitro* by using apple based medium (APAM = Apples Puree Agar Medium), a permissive substrate for patulin production (Baert et al. 2007) and *in vivo* by inoculating Golden Delicious apples.

In vitro, no patulin was detected for the mutant strain Pe∆*patL*1. A large amount of patulin was detected for the wild-type and the complemented strains cultures. After five days incubation, patulin concentration detected average 0.098 mg/mL for the wild-type strain and 0.55 mg/mL for the complemented strain (Figure 4). Surprisingly, on Czapek agar medium citinin was detected by HPLC in the mutant strain Pe∆*patL*1 extracts, however it was not detected in the wild-type strain extracts (Figure 7).

In vivo, the mutant strain Pe∆*patL*1 can causes blue mold on apples but not to the same way as the wild-type strain. Indeed, the wild-type and the mutant strain Pe∆*patL*1 shared the same development profile for the first four days, then a slowdown was observed for the mutated strain Pe∆*patL*1. The complemented strain Pe∆*patL*1:*patL* presented the same development profile as the wild-type strain. Then, growth rates were calculated from the growth curves and in comparaison with the WT strain, the growth rate was significantly lower for the mutated strain Pe∆*patL*1 from the fourth day. No significant differences were observed between the wild type and the complemented strain (Figure 5)

At the end of the incubation time the volume of the rot were determined as previously described by Baert et al. (2007). The volume of the rot in apples infected with the mutated strain was three times lower than in apples infected with the wild type strain or the complemented strain (Figure 6). At the end of the experiment, apples were grinded and patulin was extracted. As expected, no patulin was detected in apples infected with the deficient strain. In apples inoculated with the wilt-type strain and the complemented strain, a large amount of patulin was detected. After fourteen days incubation, patulin concentration detected average 4.9 µg per apple gram for the wild-type strain and 11.3 µg per apple gram for the complemented strain (Figure 4).

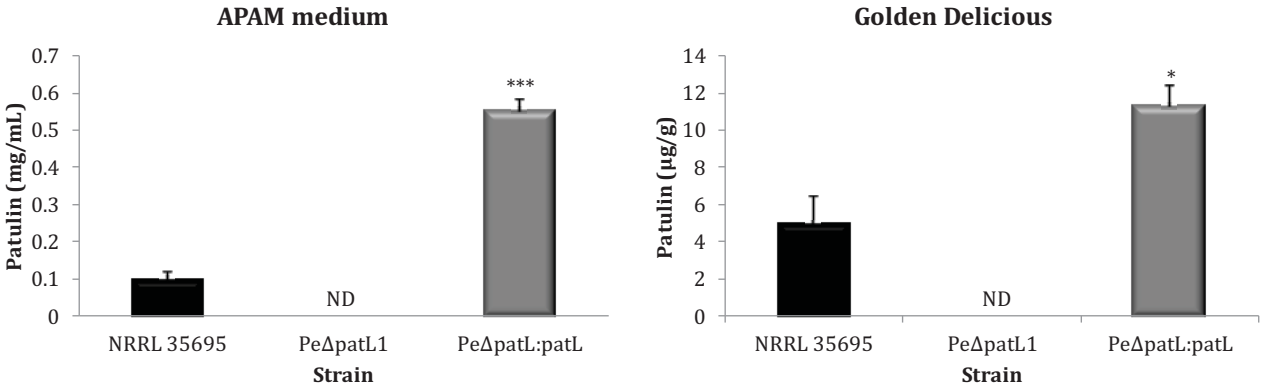


Figure 4: Patulin production on APAM medium and on Golden Delicious.
Patulin production was evaluated by HPLC-DAD at 270 nm after five days on APAM medium and fourteen days on Golden Delicious. Graphs show the mean ± SEM from six replicates. Asterisks denote significant differences between the wild type strain NRRL 35695 and the complemented strain Pe*ΔpatL:patL*: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

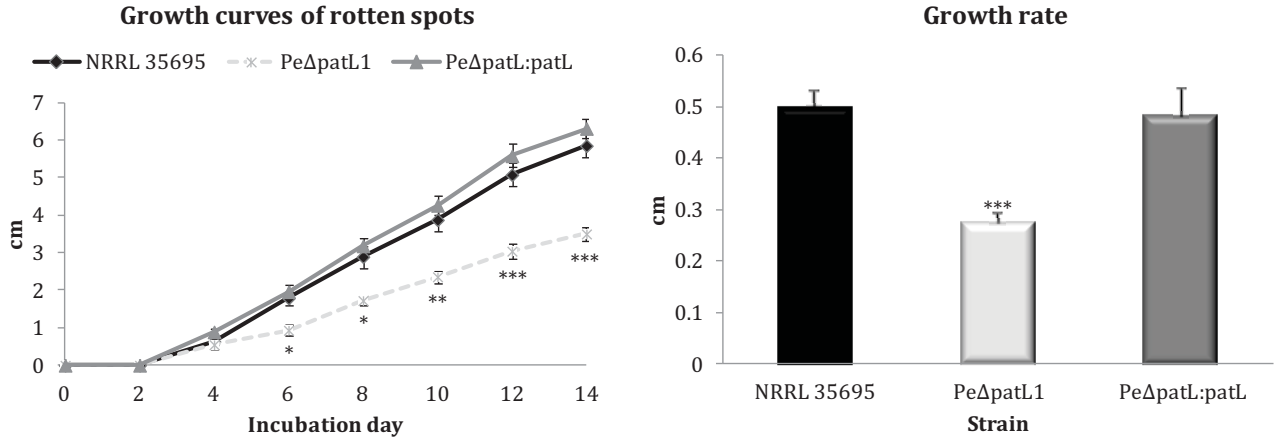


Figure 5: Growth curves of the rotten spot and growth rate.
Golden Delicious apples were infected with each strain. Diameters of rotten spots were measured every two days of the incubation period and growth rates were calculated. Graphs show the mean ± SEM from six replicates. Asterisks denote significant differences between the wild type strain NRRL 35695, the mutated strain Pe*ΔpatL*1 and the complemented strain Pe*ΔpatL:patL*: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

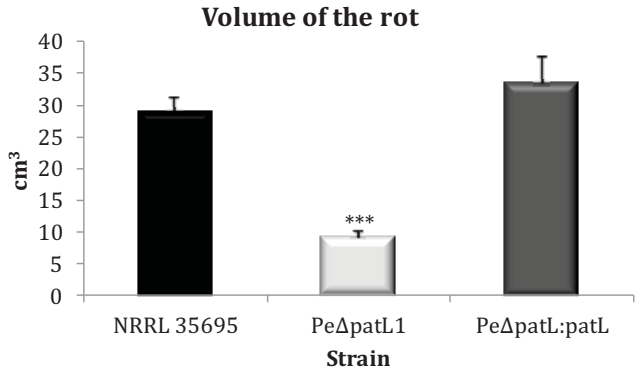


Figure 6: Volume of the rot on Golden Delicious apples.
At the end on the incubation time the volume of the rot were calculated using the method described by (Baert et al. 2007).Graphs show the mean ± SEM from six replicates. Asterisks denote significant differences between the wild type strain NRRL 35695, the mutated strain Pe*ΔpatL*1 and the complemented strain Pe*ΔpatL:patL*: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

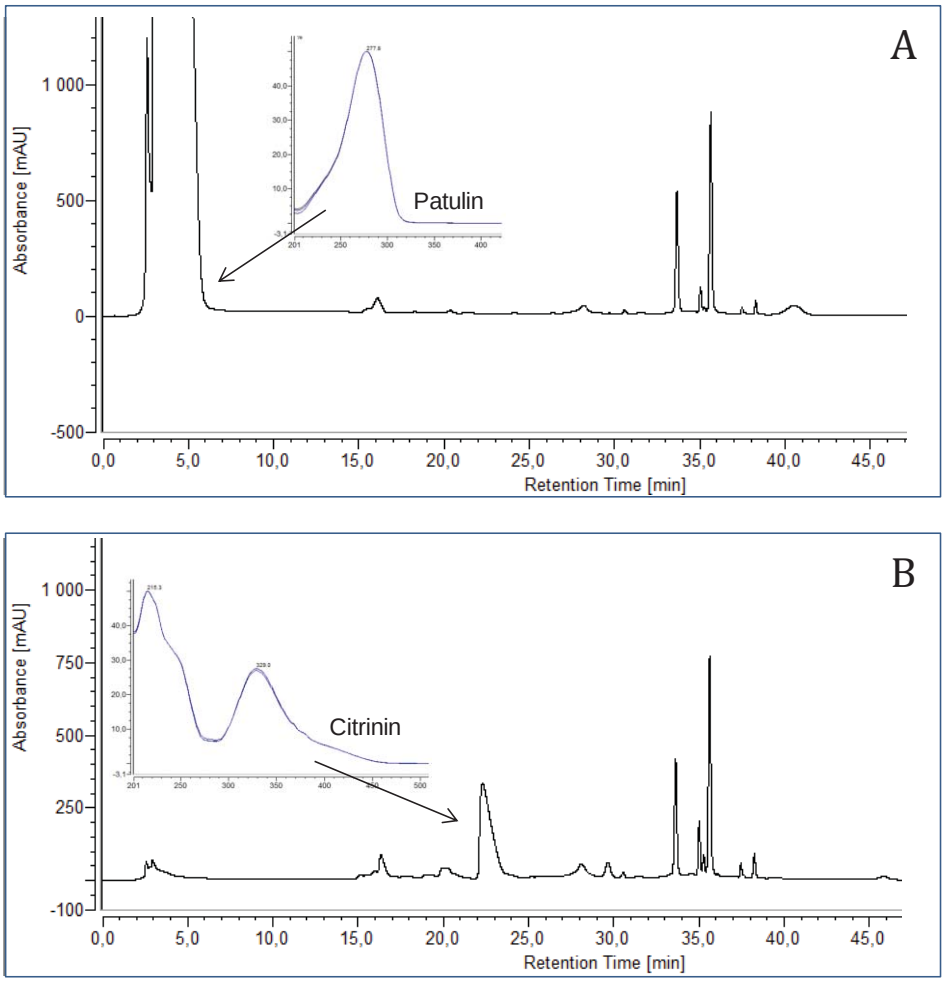


Figure 7: HPLC analysis of the wild type strain NRRL 35695 and the mutant strain PeΔ*patL*1 extracts from Czapek agar medium

Patulin and citrinin production were evaluated by HPLC-DAD at 254 nm after ten days on Czapek medium at 25°C. (A) NRRL 35695 strain, (B) PeΔ*patL*1 strain.

For the kinetic of the patulin production only the rotten part of the apples was extracted and analyzed. In apples infected by the wild-type strain, no patulin was detected for the first three days in apples, then 1.6, 4.3 and 6.3 µg/g of patulin were detected for respectively 4, 5 and 6 day (Figure 8). These results were correlated with the developmental profiles of the blue mold observed on apples. In conclusion, the growth rate increase in presence of patulin.

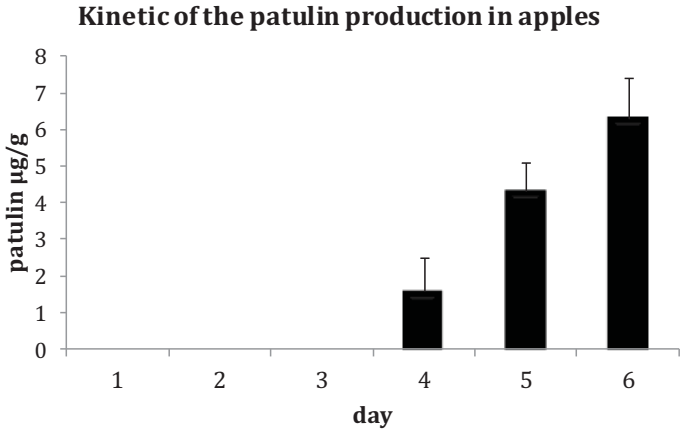


Figure 8: Kinetic of the patulin production in apples.
At the end of each incubation day, the moldy part of the apples was extracted and patulin production was quantified by HPLC-DAD. Graphs show the mean ± SEM from three replicates.

Effect of PePatL disruption on patulin gene cluster expression

In order to confirm that the gene *patL* encode for the specific regulatory factor of the patulin biosynthetic cluster, the expression of all the genes included in the cluster was analyzed under patulin permissive conditions. using natural apple based medium. Gene expression levels were normalized according to the reference gene β-tubulin. For the wild type strain high expression levels of all the genes of the patulin biosynthetic pathway were observed in good accordance with patulin production. For the mutated strain PeΔ*patL*1 the gene expressions were down regulated and remained at a basal level. Expressions of the gene cluster were restored in the complemented strain. The results obtained display a significant positive link between genes cluster expressions and *patL* expression (Figure 9).

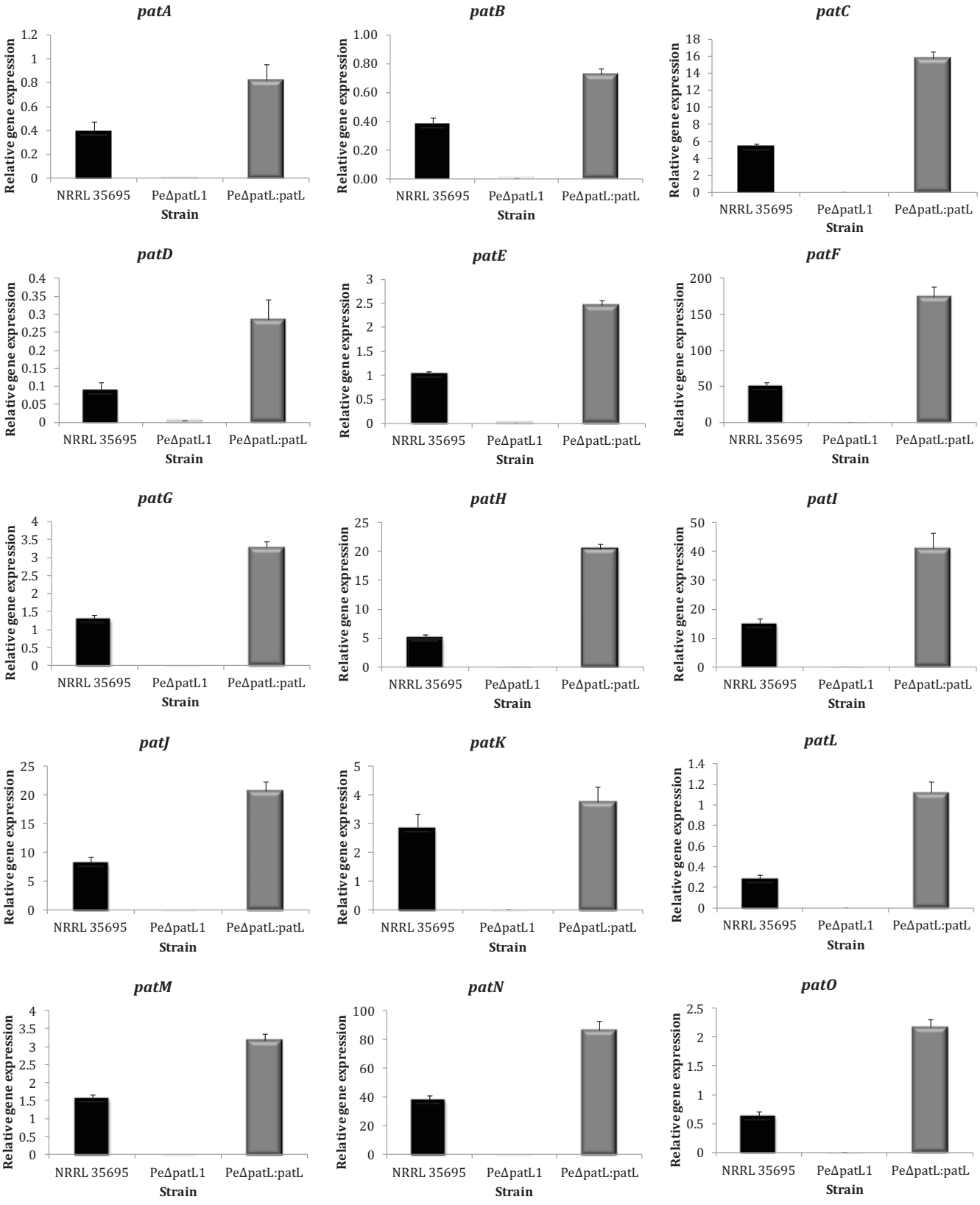


Figure 9: Expressions of the patulin biosynthesis genes in the wild-type strain NRRL 35695, the mutated strain Pe*Δpat*L1 and the complemented strain Pe*Δpat*L:*patL*.
Values were normalized to the β-tubulin as reference gene. Data were represented as mean ± SEM from six replicates.

DISCUSSION

Although patulin is produced by different genera and species, the principal producer is *Penicillium expansum*, which is responsible of the blue mold decay on apples. *Penicillium expansum* infects apples before or during harvest via injuries but symptoms like rotten spot, decay and patulin production appear only during storage.

Patulin is patulin is the final product of a succession of enzymatic reactions. Genes encoding for enzymes involved in the patulin biosynthesis pathway are gathered in a 40 kb cluster (Tannous et al. 2014). In this cluster, some genes encode for enzymes directly involved in the biosynthetic pathway, while others encode for transcription factor or transporteurs. The BLAST analysis has revealed that the *patL* gene encodes for a protein, which presents several characteristic patterns of Cys_6 zinc finger regulatory factor and presents a hight homology with AFLR, the specific regulatory factor of aflatoxin biosynthesis. In mycotoxin biosynthesis pathway, the spresific transcription factor plays the role of a switch between the production and the no-production of the mycotoxin. The biological role of mycotoxins is not elucidated yet, but some studies confer them a pathogenicity role during the host infection. For example, *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides* strains which produced more deoxynivalenol (DON) or more fumonisins are more aggressive and virulent than others (Boddu et al. 2007).

Supported by the fact that the importance of mycotoxins in plant pathogenesis has been already described for other diseases, some studies have focused on the role of patulin in the aggressiveness of *Penicillium expansum*. A recent study in *Penicillium expansum*, showed that patulin could be involved in pathogenicity and virulence (Sanzani et al. 2012). Authors disrupted the gene encoding for the biosynthetic enzyme 6-MSA synthase (Pe*pks*) in order to observe the role of patulin in the pathogenicity and virulence of *Penicillium expansum*. Surprisingly, the obtained mutants are still producing patulin but less than the wild-type strain and on apples inoculated with the mutants disease incidence and severity were lower than those inoculated with the wild-type strain. They restored the wild-type phenotype by artificially adding patulin in the inoculating point, suggesting that patulin act as virulence factor. By using the RNAi (ribonucleic acid interference), Barad et al. (2014) have generated *idh*-RNAi mutants exibiting downregulation of *idh* and reduced patulin production. As in the first study, there are a reduction in disease incidence and severity.

According to the definition of Yoder (1980), the pathogenicity is the ability to cause a disease; it is a qualitative term and the virulence is the amount or the extant of the disease caused; it is a quantitative term. In both previous studies, generated mutants still produced patulin, therefore they can not conclud if patulin acts as a pathogenicity factor.

In order to determine the involvement of patulin in the ability of *Penicillium expansum* to cause a disease, in this study the gene *patL*, encoding for the specific regulatory factor of the

patulin biosynthetic pathway was disrupted. The disruption of this gene causes a total extinction of the expression of all genes within the cluster and a lack of patulin. The total absence of patulin production by these mutants allows to conclude today on the role of the patulin in the pathogenicity, the ability to induce a disease, in *Penicillium expansum*. When the mutant was used to inoculate Golden Delicious apples, it does not produced patulin and it can induced a disease as the same way as the wild-type strain for the first four days. Then, an acceleration was observed for the wild-type strain. The rate of appearance of the rotten spot was correlated to the patulin production, indeed before patulin production the wild-type and the mutated strains shared the same developmental profiles and after the start of patulin production in the wild-type strain the rotten spot appeared faster. Based on these results, patulin could be considered as a virulence factor and not as pathogenicity factor.

These results are not surprising because the importance of mycotoxins in pathogenicity and virulence of fungus has been already described for other fungus. As example, the deoxynivalenol (DON) produced by *Fusarium graminearum* is necessary for the disease severity but not for the initial infection of ears of wheat (disease incidence) (Bai et al. 2001). Another well studied example is for fumonisins. Numerous studies reviewed the involvement of fumonisins in the disease development in maize with contradictory results (Desjardins et al. 1995; Desjardins et al. 1998; Desjardins et al. 2002). Finally several studies agreed on the necessity of fumonisins production to induce the disease. In fact, non-producing strains cannot induce lesions on leaves and do not affect roots development and stem height. in the contrary, fumonisins producing strain cause dose-dependently reduced roots and stem development and induce lesions on leaves (Williams et al. 2007; Glenn et al. 2008). In these cases, DON is a virulence factor and fumonisins are pathogenicity and virulence factors.

After three days, patulin facilitate the colonization of Golden Delicious apples by *Penicilium expansum.* Currently, no data describes the effect of patulin under apples cells but

In contrast, the morphological changes are surprising. The gene *patL* is supposed to encode for the specific regulatory factor for the patulin biosynthetic pathway but the mutant strain PeΔ*patL*1 presented some morphological changes. Exudate is only present on wild-type strain culture and it is composed by patulin. Two major hypotheses may be advanced; the first one is that the gene *patL* could be encode for a global transcription factor although it is located within the patulin biosynthetic gene cluster. This hypothesis is supported by the fact that the gene *Tri6* in *Fusarium graminearum* is located in the trichothecene gene cluster and regulates not only gene within the trichothecene gene cluster but also genes involved in growth and development of this phytopathogen (Seong et al. 2009; Nasmith et al. 2011). The second hypothesis is that patulin influence the development of the fungus *Penicillium expansum*. No

studies demonstrate the involvement of mycotoxins in fungal development so the first hypothesis is more likely.

This study was performed on only one apple cultivar. It will be interesting to test the involvement of patulin in pathogenicity and virulence in other apples cultivars. We can imagine that the apples composition in sugar, phenolic compounds likes flavonoids influence the development of the disease. Some cultivars could be more resistant to infection and patulin could be in this case a pathogenicity factor.

REFERENCES

Adjovi, Y. C. S., S. Bailly, B. J. G. Gnonlonfin, S. Tadrist, A. Querin, A. Sanni, I. P. Oswald, O. Puel and J. D. Bailly (2014). "Analysis of the contrast between natural occurrence of toxigenic *Aspergilli* of the *Flavi* section and aflatoxin B1 in cassava." Food Microbiology **38**(0): 151-159.

Artigot, M. P., N. Loiseau, J. Laffitte, L. Mas-Reguieg, S. Tadrist, I. P. Oswald and O. Puel (2009). "Molecular cloning and functional characterization of two CYP619 cytochrome P450s involved in biosynthesis of patulin in *Aspergillus clavatus*." Microbiology **155**(Pt 5): 1738-47.

Baert, K., F. Devlieghere, H. Flyps, M. Oosterlinck, M. M. Ahmed, A. Rajković, B. Verlinden, B. Nicolaï, J. Debevere and B. De Meulenaer (2007). "Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*." International journal of food microbiology **119**(3): 170-181.

Bai, G. H., R. Plattner, A. Desjardins, F. Kolb and R. A. McIntosh (2001). "Resistance to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat." Plant Breeding **120**(1): 1-6.

Barad, S., S. B. Horowitz, I. Kobiler, A. Sherman and D. Prusky (2014). "Accumulation of the mycotoxin patulin in the presence of gluconic acid contributes to pathogenicity of *Penicillium expansum*." Mol Plant Microbe Interact **27**(1): 66-77.

Boddu, J., S. Cho and G. J. Muehlbauer (2007). "Transcriptome analysis of trichothecene-induced gene expression in barley." Mol Plant Microbe Interact **20**(11): 1364-75.

Coleman, J. E. (1992). "Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins." Annu Rev Biochem **61**: 897-946.

Colot, H. V., G. Park, G. E. Turner, C. Ringelberg, C. M. Crew, L. Litvinkova, R. L. Weiss, K. A. Borkovich and J. C. Dunlap (2006). "A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(27): 10352-7.

Comera, C., K. Andre, J. Laffitte, X. Collet, P. Galtier and I. Maridonneau-Parini (2007). "Gliotoxin from *Aspergillus fumigatus* affects phagocytosis and the organization of the actin cytoskeleton by distinct signalling pathways in human neutrophils." Microbes Infect **9**(1): 47-54.

Desjardins, A. E., G. P. Munkvold, R. D. Plattner and R. H. Proctor (2002). "FUM1-a gene required for fumonisin biosynthesis but not for maize ear rot and ear infection by *Gibberella moniliformis* in field tests." Molecular Plant-Microbe Interactions **15**(11): 1157-1164.

Desjardins, A. E., R. D. Plattner, M. Lu and L. E. Claflin (1998). "Distribution of fumonisins in maize ears infected with strains of *Fusarium moniliforme* that differ in fumonisin production." Plant Disease **82**(8): 953-958.

Desjardins, A. E., R. D. Plattner, T. C. Nelsen and J. F. Leslie (1995). "Genetic analysis of fumonisin production and virulence of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*) on maize (Zea mays) seedlings." Applied and Environmental Microbiology **61**(1): 79-86.

Ehrlich, K. C., J. W. Cary and B. G. Montalbano (1999a). "Characterization of the promoter for the gene encoding the aflatoxin biosynthetic pathway regulatory protein AFLR." Biochim Biophys Acta **1444**(3): 412-7.

Ehrlich, K. C., B. G. Montalbano and J. W. Cary (1999b). "Binding of the C6-zinc cluster protein, AFLR, to the promoters of aflatoxin pathway biosynthesis genes in *Aspergillus parasiticus*." Gene **230**(2): 249-57.

Flaherty, J. E. and C. P. Woloshuk (2004). "Regulation of fumonisin biosynthesis in Fusarium verticillioides by a zinc binuclear cluster-type gene, ZFR1." Appl Environ Microbiol **70**(5): 2653-9.

Glenn, A. E., N. C. Zitomer, A. M. Zimeri, L. D. Williams, R. T. Riley and R. H. Proctor (2008). "Transformation-mediated complementation of a FUM gene cluster deletion in *Fusarium verticillioides* restores both fumonisin production and pathogenicity on maize seedlings." Molecular Plant-Microbe Interactions **21**(1): 87-97.

Keller, N. P. and T. M. Hohn (1997). "Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi." Fungal Genet Biol **21**(1): 17-29.

Keller, N. P., G. Turner and J. W. Bennett (2005). "Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics." Nat Rev Microbiol **3**(12): 937-47.

Kimura, M., T. Tokai, N. Takahashi-Ando, S. Ohsato and M. Fujimura (2007). "Molecular and genetic studies of *fusarium* trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution." Biosci Biotechnol Biochem **71**(9): 2105-23.

Langfelder, K., B. Jahn, H. Gehringer, A. Schmidt, G. Wanner and A. A. Brakhage (1998). "Identification of a polyketide synthase gene (pksP) of *Aspergillus fumigatus* involved in conidial pigment biosynthesis and virulence." Medical microbiology and immunology **187**(2): 79-89.

MacDonald, S., M. Long, J. Gilbert and I. Felgueiras (2000). "Liquid chromatographic method for determination of patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree: collaborative study." Journal of AOAC International **83**(6): 1387-1394.

Maier, F. J., T. Miedaner, B. Hadeler, A. Felk, S. Salomon, M. Lemmens, H. Kassner and W. Schaefer (2006). "Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (Tri5) gene in three field isolates of different chemotype and virulence." Molecular plant pathology **7**(6): 449-461.

McKinley, E. R. and W. W. Carlton (1980). "Patulin mycotoxicosis in Swiss ICR mice." Food Cosmet Toxicol **18**(2): 181-7.

Merhej, J., F. Richard-Forget and C. Barreau (2011). "The pH regulatory factor Pac1 regulates Tri gene expression and trichothecene production in *Fusarium graminearum*." Fungal Genet Biol **48**(3): 275-84.

Moake, M. M., O. I. Padillaâ€Zakour and R. W. Worobo (2005). "Comprehensive review of patulin control methods in foods." Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **4**(1): 8-21.

Morales, H., S. MarÃn, A. Rovira, A. J. Ramos and V. Sanchis (2007). "Patulin accumulation in apples by *Penicillium expansum* during postharvest stages." Letters in applied microbiology **44**(1): 30-35.

Nasmith, C. G., S. Walkowiak, L. Wang, W. W. Y. Leung, Y. Gong, A. Johnston, L. J. Harris, D. S. Guttman and R. Subramaniam (2011). "Tri6 is a global transcription regulator in the phytopathogen *Fusarium graminearum*." PLoS pathogens **7**(9): e1002266.

Payne, G. A., G. J. Nystrom, D. Bhatnagar, T. E. Cleveland and C. P. Woloshuk (1993). "Cloning of the afl-2 gene involved in aflatoxin biosynthesis from *Aspergillus flavus*." Appl Environ Microbiol **59**(1): 156-62.

Proctor, R. H., A. E. Desjardins, S. P. McCormick, R. D. Plattner, N. J. Alexander and D. W. Brown (2002). Genetic analysis of the role of trichothecene and fumonisin mycotoxins in the virulence of *Fusarium*. Mycotoxins in Plant Disease, Springer**:** 691-698.

Proctor, R. H., T. M. Hohn, S. P. McCormick and A. E. Desjardins (1995). "Tri6 encodes an unusual zinc finger protein involved in regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides*." Appl Environ Microbiol **61**(5): 1923-30.

Prusky, D., J. L. McEvoy, R. Saftner, W. S. Conway and R. Jones (2004). "Relationship between host acidification and virulence of *Penicillium s*pp. on apple and citrus fruit." Phytopathology **94**(1): 44-51.

Puel, O., S. Tadrist, P. Galtier, I. P. Oswald and M. Delaforge (2005). "*Byssochlamys nivea* as a source of mycophenolic acid." Appl Environ Microbiol **71**(1): 550-3.

Sanzani, S. M., M. Reverberi, M. Punelli, A. Ippolito and C. Fanelli (2012). "Study on the role of patulin on pathogenicity and virulence of *Penicillium expansum*." International journal of food microbiology **153**(3): 323-331.

Scharf, D. H., T. Heinekamp and A. A. Brakhage (2014). "Human and plant fungal pathogens: the role of secondary metabolites." PLoS Pathog **10**(1): e1003859.

Seo, J. A., R. H. Proctor and R. D. Plattner (2001). "Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in Fusarium verticillioides." Fungal Genet Biol **34**(3): 155-65.

Seong, K. Y., M. Pasquali, X. Zhou, J. Song, K. Hilburn, S. McCormick, Y. Dong, J. R. Xu and H. C. Kistler (2009). "Global gene regulation by *Fusarium* transcription factors Tri6 and Tri10 reveals adaptations for toxin biosynthesis." Molecular Microbiology **72**(2): 354-367.

Snini, S. P., S. Tadrist, J. Laffitte, E. L. Jamin, I. P. Oswald and O. Puel (2014). "The gene PatG involved in the biosynthesis pathway of patulin, a food-borne mycotoxin, encodes a 6-methylsalicylic acid decarboxylase." Int J Food Microbiol **171**: 77-83.

Speijers, G. J., M. A. Franken and F. X. van Leeuwen (1988). "Subacute toxicity study of patulin in the rat: effects on the kidney and the gastro-intestinal tract." Food Chem Toxicol **26**(1): 23-30.

Tannous, J., R. El Khoury, S. P. Snini, Y. Lippi, A. El Khoury, A. Atoui, R. Lteif, I. P. Oswald and O. Puel (2014). "Sequencing, physical organization and kinetic expression of the patulin biosynthetic gene cluster from *Penicillium expansum*." International journal of food microbiology **189**: 51-60.

Tsai, H.-F., Y. C. Chang, R. G. Washburn, M. H. Wheeler and K. J. Kwon-Chung (1998). "The developmentally regulated alb1 gene of *Aspergillus fumigatus*: Its role in modulation of conidial morphology and virulence." Journal of bacteriology **180**(12): 3031-3038.

Vilanova, L., I. Viñas, R. Torres, J. Usall, G. Buron-Moles and N. Teixido (2014). "Acidification of apple and orange hosts by *Penicillium digitatum* and *Penicillium expansum*." International journal of food microbiology **178**(0): 39-49.

Williams, L. D., A. E. Glenn, A. M. Zimeri, C. W. Bacon, M. A. Smith and R. T. Riley (2007). "Fumonisin disruption of ceramide biosynthesis in maize roots and the effects on plant development and *Fusarium verticillioides*-induced seedling disease." Journal of agricultural and food chemistry **55**(8): 2937-2946.

Woloshuk, C. P., K. R. Foutz, J. F. Brewer, D. Bhatnagar, T. E. Cleveland and G. A. Payne (1994). "Molecular characterization of aflR, a regulatory locus for aflatoxin biosynthesis." Appl Environ Microbiol **60**(7): 2408-14.

Woloshuk, C. P., H. D. Sisler, M. C. Tokousbalides and S. R. Dutky (1980). "Melanin biosynthesis in *Pyricularia oryzae*: Site of tricyclazole inhibition and pathogenicity of melanin-deficient mutants." Pesticide Biochemistry and Physiology **14**(3): 256-264.

Yoder, O. C. (1980). "Toxins in pathogenesis." Annual Review of Phytopathology **18**(1): 103-129.

Yu, J., P. K. Chang, K. C. Ehrlich, J. W. Cary, D. Bhatnagar, T. E. Cleveland, G. A. Payne, J. E. Linz, C. P. Woloshuk and J. W. Bennett (2004). "Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis." Appl Environ Microbiol **70**(3): 1253-62.

Yu, J. H., R. A. Butchko, M. Fernandes, N. P. Keller, T. J. Leonard and T. H. Adams (1996). "Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene aflR from *Aspergillus nidulans* and *A. flavus*." Curr Genet **29**(6): 549-55.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

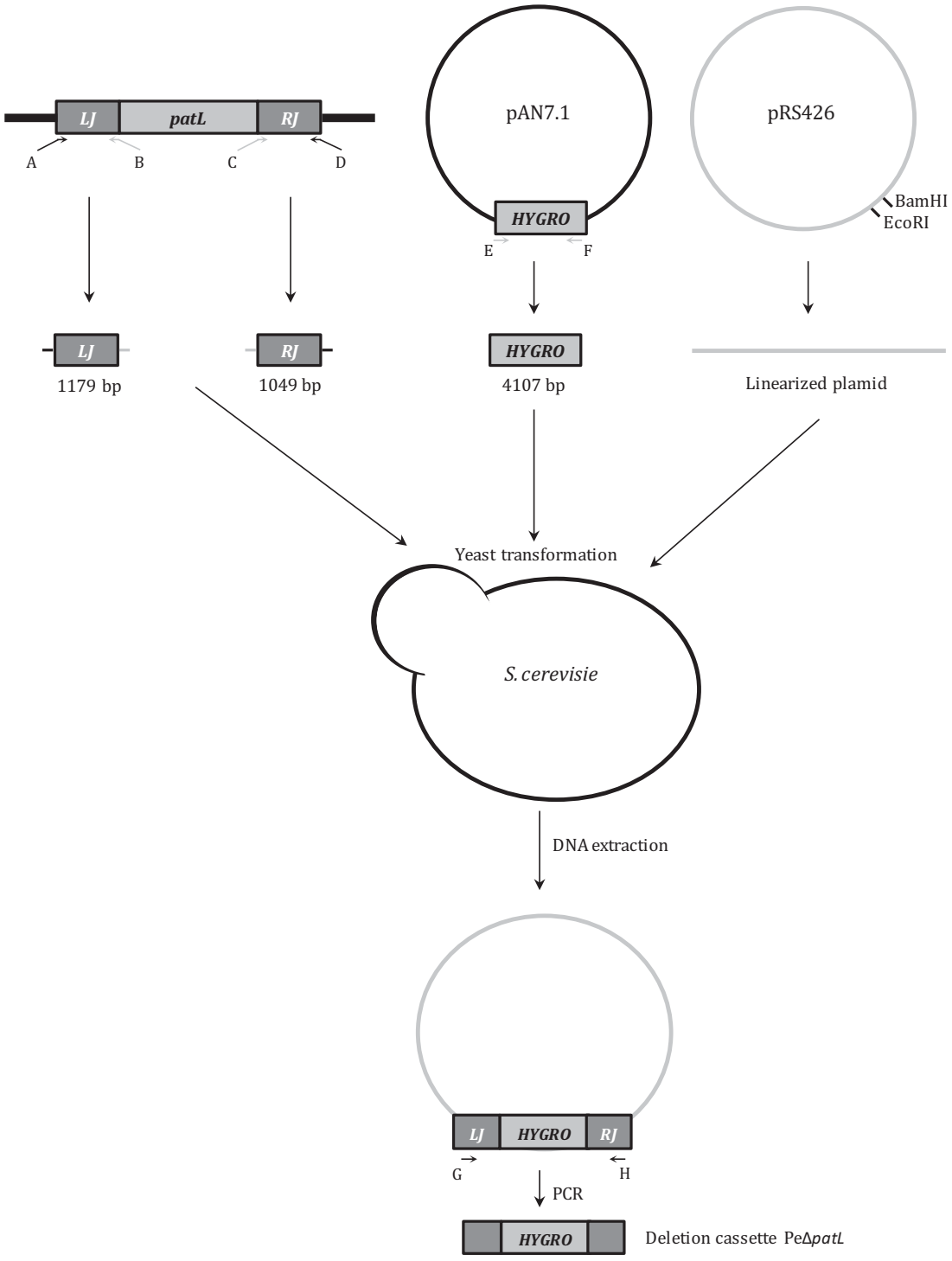


Figure S1: Strategy employed to construct the deletion cassette PeΔ*patL*
The left jonction (LJ) and the right jonction (RJ) were amplified from the wild-type stain. Primers A and D 5'-extremities are identical to the extremities of the pRS426 cloning vector. Primers B and C 5'-extremities are identical to the extremities of the PCR product generated by primers E and F. Primers E and F were used to amplified the hygro resistance cassette. Primers G and H were used to amplified the deletion cassette PeΔ*patL* from the DNA transformed *S. cerevisiae*.
A: 5fdebPatLPex; **B**: DebPatLPex1Rhygro; **C**: FinPatLPex1Fhygro; **D**: 3rfinPatLPex; **E**: hphF1; **F**: hphR1; **G**: dPatL-NestedF and **H**: dPatL-NestedR.

COMPLEMENT A L'ETUDE

Suite à l'étude précédente nous nous sommes intéressés à l'importance de la variété de pomme dans la pathogénicité et la virulence de *Penicillium expansum*. En effet, plusieurs études démontrent que le pH ou la source carbonée peuvent influencer sur la croissance de *Penicillium expansum* et la production de patuline. Dans cette étude nous avons comparé la capacité d'une souche sauvage de *Penicillium expansum* et d'une souche mutante pour le facteur de régulation *patL* (souche générée lors de l'étude précédente) à infecter diverses variétés de pommes.

L'expérimentation précédente réalisée sur des pommes de la variété Golden Delicious a démontré que la patuline était un facteur de virulence et non de pathogénicité. En effet, la production de patuline n'est pas essentielle pour l'infection des pommes par *Penicillium expansum* puisque la souche mutante non productrice de patuline peut se développer et provoquer la macération des tissus. Par contre la présence de patuline produite par le champignon augmente la vitesse de développement des symptômes.

Dans cette étude complémentaire nous avons analysé la capacité d'infection des deux souches pour les variétés de pommes suivantes : Pink Lady, Granny Smith, Reinette grise du Canada, Braeburn et Ariane. Comme dans l'étude précédente nous avons mesuré l'apparition des lésions brunes, les volumes de pourriture et la production de patuline.

De manière surprenante les résultats obtenus sont différents selon la variété considérée, indiquant ainsi que des variétés de pomme sont plus ou moins résistantes à l'infection par *Penicillium expansum* et que la patuline est un facteur de virulence pour certaines variétés.

MATERIELS ET METHODES

Souches

La souche de *Penicillium expansum* NRRL 35695 (USDA-ARS National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Ill.) initialement isolée des baies de raisin dans le Languedoc Roussillon en France a été utilisée pour cette étude.

La souche mutante PeΔ*patL*1 non productrice de patuline, générée dans l'étude précédente a été utilisée afin de déterminer 'impact de la patuline dans l'infection des pommes de diverses variétés.

Les souches ont été cultivées sur le milieu gélosé Potato Dextrose Agar (PDA) durant 5 jours à 25˚C. Les suspensions de spores ont été préparées dans de l'eau stérile à partir de ces cultures puis les spores ont été dénombrées à l'aide d'une cellule de Malassez. Les suspensions de spores ont ensuite été diluées afin d'obtenir des solutions à 10^4 spores/mL.

Variétés de pomme étudiées et mesure du pH

Cette étude a été réalisée sur les différentes variétés de pommes suivantes : Pink Lady, Granny Smith, Reinette grise du Canada, Golden Delicious et Ariane.

Les pH des pommes ont été mesurés à l'aide d'un pH-mètre HI 99161 destiné à la détermination du pH dans les matrices alimentaires (Hanna instruments, Texas, Etats-Unis). Pour cela les pommes ont été coupées en deux et quatre mesures ont été effectuées dans la chair du fruit. Les mesures ont été réalisées sur trois pommes de chaque variété.

Inoculation des pommes

Des pommes de chacune des variétés sans défauts et sans blessures ont été achetées dans un supermarché de Toulouse (France). Comme décrit précédemment (Sanzani et al. 2012), la surface des pommes a été stérilisée avec une solution à 2 % d'hypochlorite de sodium puis rincée à l'eau claire. Les pommes ont été blessées avec un cure-dent stérile en un seul point central et 10 µL d'une suspension de spores à 10^4 spores/mL ont été inoculés dans la blessure. Les pommes ont été incubées 14 jours à 25°C.

Les diamètres des lésions formées ont été mesurés régulièrement le long de la durée d'incubation et une vitesse de développement des lésions a pu être calculée pour chacune des variétés de pommes. Le volume de pourriture formé a été évalué selon la méthode de Baert et al., (2007).

Analyse de la production de patuline in vivo

Afin de déterminer la quantité de patuline produite au terme de l'incubation , les pommes ont été broyées puis comme décrit précédemment par MacDonald et al., (2000) une prise d'essai de 10 g a été digérée toute la nuit à température ambiante avec 570 U de pectinase d'*Aspergillus aculeatus* (Sigma-Aldrich) et 10 mL d'eau stérile. Le lendemain, les échantillons ont été centrifugés à 4500 g durant 5 min et les surnageants ont été collectés et extraits avec 50 mL d'acétate d'éthyle. Après une nuit en agitation, la phase organique a été récupérée, filtrée puis évaporée. L'extrait sec a été resuspendu dans 300 µL d'un mélange méthanol/eau (80/20). L'extrait resuspendu a ensuite été filtré avec un filtre de porosité de 0.45 µm avant injection dans le système de chromatographie.

Analyses HPLC

Le système de chromatographie utilisé pour la quantification de patuline était un système HPLC Ultimate 3000 (Dionex/Thermoscientific, Courtabœuf, France). La phase stationnaire qui a été utilisée est une colonne de Gemini 5 µm C6-Phenyl de longueur 250 mm et de diamètre 4.6 mm (Phenomenex, Torrance, CA, Etats-Unis). La phase mobile a un débit de 0.9 ml/min a été utilisé en gradient avec le programme suivant. Le solvant A était de l'eau acidifié avec 0.2 % d'acide acétique et le solvant B du méthanol. Les conditions d'élution utilisées étaient les suivantes : 0 min 100 % B, 10 min 90 % B, 30 min 50 % B, 45 min 90 % B, de 45 à 50 min 90 % B, de 60 à 65 min 0% B. La présence de patuline a été détectée à 277 en comparaison à un standard et quantifiée en mesurant l'aire du pic obtenu rapporté à une gamme étalon.

RESULTATS

Analyse du pH des pommes

Les pH des variétés de pommes présentés en Figure 10 oscillent entre 3,10 et 3,75. La variété de pomme la plus acide est la Granny Smith et la moins acide est la variété Ariane. Les trois autres variétés ont des pH moyen relativement proche de 3,50.

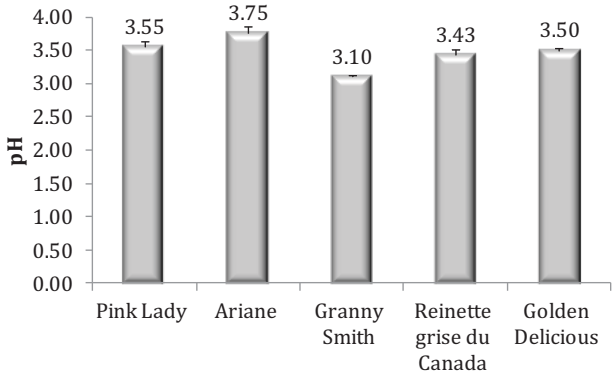


Figure 10 : pH des différentes variétés de pommes.
Le pH des pommes a été mesuré dans la chair du fruit. Quatre mesures différentes par pomme ont été réalisées trois pommes de chaque variété. Les résultats présentés sont les valeurs moyennes obtenues pour chacune des variétés à partir de trois pommes

Analyse des diamètres de lésion, de la vitesse d'apparition des lésions et du volume de pourriture

Par comparaison avec la souche sauvage, les pommes de variétés Pink Lady et Ariane infectées avec la souche mutante présentent des résultats significativement différents pour tous les paramètres étudiés. Pour les pommes de la variété Pink Lady, le diamètre et la vitesse de développement des lésions brunes des pommes infectées par la souche mutante sont statistiquement plus faibles. La vitesse de développement est diminuée de moitié. De plus, en comparaison avec les pommes infectées par la souche sauvage, le volume de pourriture est cinq fois inférieur quand les pommes sont infectées avec la souche mutante. Pour les pommes de variété Ariane, les différences observées sont moins sévères que celles observées précédemment mais demeurent statistiquement significatives. Les diamètres des lésions brunes ainsi que la vitesse de développement de ces dernières sont diminués quand les pommes sont inoculées avec la souche PeΔ*patL*1. Par ailleurs, en comparaison avec les pommes infectées avec la souche sauvage, le volume de pourriture est deux fois plus faible. Pour les autres variétés étudiées (Granny Smith, Reinette grise du Canada et Braeburn) aucune différence significative n'a été observée pour aucun des paramètres étudiés. Tous les résultats sont présentés en Figure 11. La Figure 12 présente l'aspect des pommes infectées avec les différentes souches après 14 jours d'incubation à 25°C.

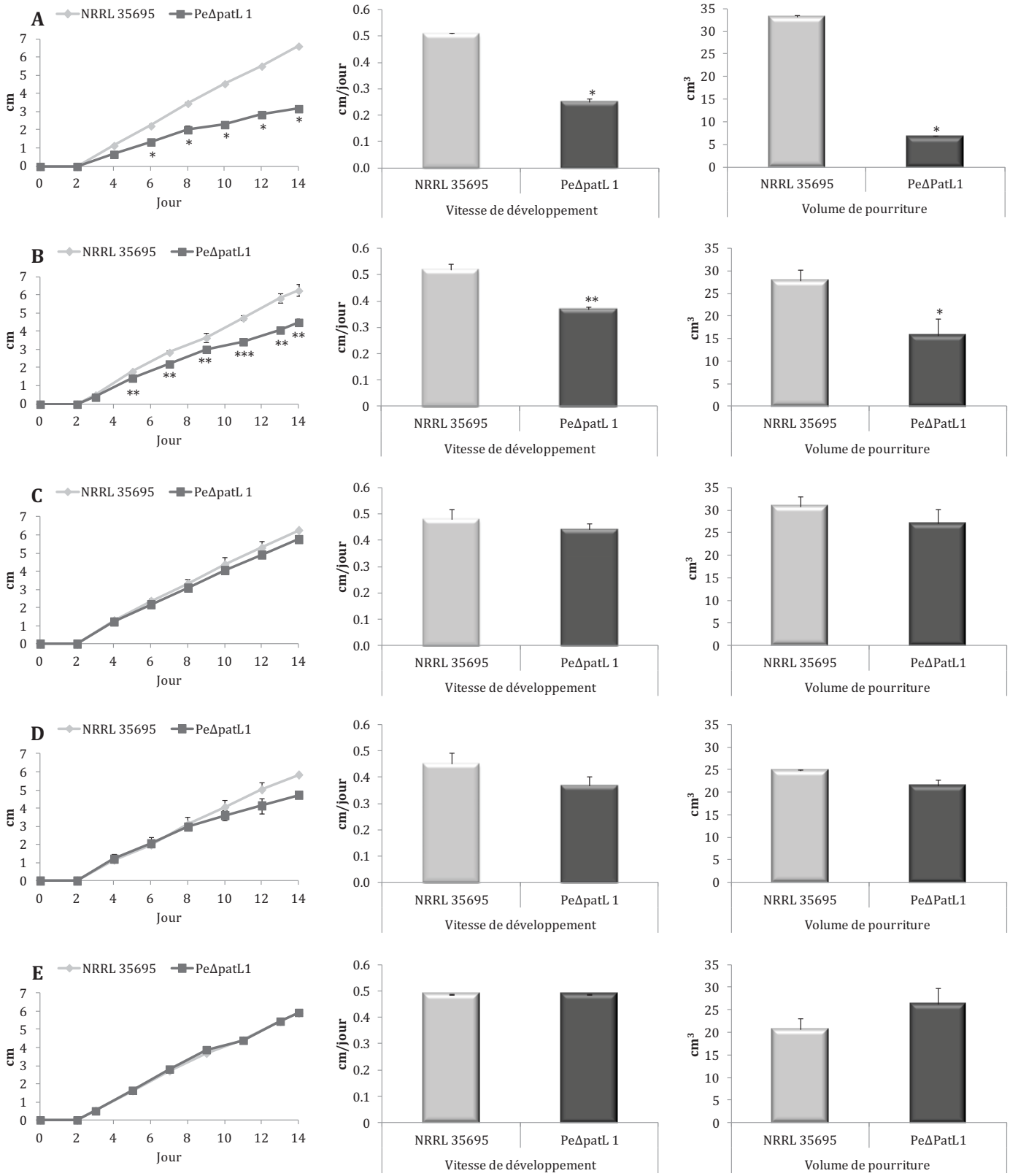


Figure 11 : Suivis du développement des lésion brunes, vitesse de développement de ces lésions et volume de pourriture pour différentes variétés de pommes infectées par la souche sauvage *Penicillium expansum* NRRL 35695 et la souche mutante Pe*Δpat*L1.

Les variétés de pommes testées sont la Pink Lady (A), l'Ariane (B), la Granny Smith (C), la Reinette grise du Canada (D) et la Braeburn (E). Les résultats des graphiques et des l'histogrammes sont présentés en moyenne ± erreur type (SEM) avec les seuils de significativités suivant : $p<0,05$ = * ; $p<0,01$ = ** et $p<0,001$ = ***.



Figure 12 : Lésions brunes observées chez les différentes variétés de pommes infectées avec la souche *Penicillium expansum* NRRL 35695 et la souche mutante PeΔ*patL*1.
Les variétés de pommes testées sont la Pink Lady (A), l'Ariane (B), la Granny Smith (C), la Reinette grise du Canada (D) et la Braeburn (E). Les pommes de gauche ont été infectées avec la souche sauvage alors que les pommes de droites ont été infectées avec la souche mutante. Les photos ont été prises au terme de l'incubation, soit 14 jours à 25°C.

Analyse de la production de patuline in vivo

Au terme de l'incubation, les pommes ont été broyées et extraites afin de déterminer la production de patuline *in vivo* dans des pommes de différentes variétés. Comme attendu, aucune trace de patuline n'a été détectée dans les pommes infectées avec la souche mutante PeΔ*patL*1. Par ailleurs, les quantités de patuline produites *in vivo* par la souche sauvage NRRL 35695 varient en fonction de la variété de pomme considérée. Les plus grandes quantités de patuline ont été détectées pour les variétés Ariane et Breaburn, avec respectivement 10,4 µg et 8,5 µg de patuline par gramme de pomme analysée. Les quantités de patuline produites dans les pommes de variétés Pink Lady, Granny Smith et Reinette grise du Canada sont équivalentes avec respectivement 2,8 µg, 1,1 µg et 1,9 µg de patuline par gramme de pomme analysée (Figure 13).

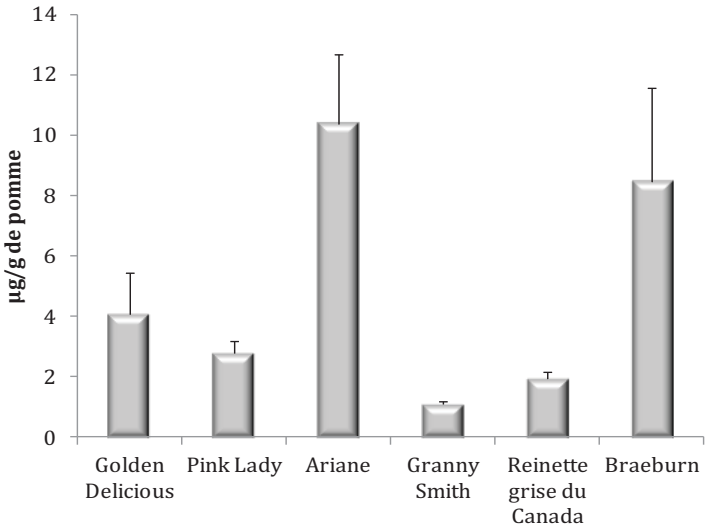


Figure 13 : Analyse de la production de patuline *in vivo* dans différentes variétés de pomme.
Les résultats sont exprimés en microgramme de patuline produite par gramme de pomme. Les résultats présentés sont les valeurs moyennes obtenues pour chacune des variétés à partir de trois pommes.

DISCUSSION

Cette étude fait suite à l'étude du facteur de régulation spécifique de la voie de biosynthèse de la patuline et à l'implication de la patuline dans la pathogénicité et la virulence de *Penicillium expansum* dans les pommes de variété Golden Delicious. Nous avons pu démontrer que la présence de patuline n'est pas un pré-requis au déclanchement de la maladie chez des pommes de variété Golden Delicious mais qu'elle jouait un rôle dans la vitesse de son développement. En effet, dès le quatrième jour d'infection la souche sauvage productrice de patuline enclenche sa production de patuline et augmente la vitesse de développement des lésions brunes.

En complément à cette étude nous nous sommes intéressés aux différences qui pouvaient potentiellement être observées entre les variétés de pommes quant à l'implication de la patuline dans la pathogénicité et la virulence de *Penicillium expansum.* En effet, les différences dans les caractéristiques biochimiques des pommes telles que la concentration en sucre, la composition en composés phénoliques et le pH peuvent influer sur la croissance et la production de métabolites secondaires par cette espèce fongique.

Sur les cinq variétés de pommes supplémentaires étudiées, seules les variétés Pink Lady et Ariane présentent des résultats différents lorsqu'elles sont infectées avec une souche mutante non productrice de patuline. En effet, pour ces variétés, la vitesse de développement des symptômes ainsi que les volumes de pourriture formés sont inférieurs chez les pommes infectées avec la souche mutante. Il semblerait que comme pour la Golden Delicious, la patuline est un facteur de virulence qui aide *Penicillium expansum* à se développer dans le tissu des pommes de variétés Pink Lady et Ariane. Parmi les six variétés de pommes, la Golden Delicious, la Pink Lady et l'Ariane semblent être les plus résistantes à *Penicillium expansum*. Ces trois variétés partagent un fond génétique commun apporté par la variété Golden Delicious. En effet, la Pink Lady est issue d'un croisement entre la Golden Delicious et la Lady Williams et parmi les nombreux ascendants de la variété Ariane, la Golden Delicious est aussi présente. L'hypothèse la plus probable est que la résistance au pathogène *Penicillium expansum* pourrait être apportée par le fond génétique de la Golden Delicious. Afin de vérifier cette hypothèse, une étude identique à celle présentée précédemment devra être conduite sur d'autres variétés issues de croisement avec la Golden Delicious. D'une manière non exhaustive, ces variétés sont la Royal Gala, la Red Delicious ou encore la Chanteclerc.

Dans cette étude, le pH des différentes variétés de pomme a été mesuré et il semblerait qu'il soit un facteur déterminant dans le production de patuline par *Penicillium expansum*. Ainsi, la Pink Lady présente le pH le moins acide et une production de patuline plus élevée. Cette hypothèse est soutenue par l'étude de Marin et al. (2006) qui démontre une différence d'accumulation de patuline entre les variétés Golden Delicious et Fuji. Une autre étude démontre

que l'accumulation de patuline dans les pommes de variété Golden Delicious, Gala et Fuji dépend du pH des pommes (Morales et al. 2008a).

Actuellement peu d'études relatant l'implication du pH dans la virulence et la production de patuline par *Penicillium expansum* sont disponibles. Cependant, depuis peu, la modulation du pH par les espèces fongiques pathogènes semble être un facteur important dans l'augmentation de la virulence de ces mêmes pathogènes. L'habilité à moduler le pH peut être dans les deux sens, les espèces fongiques peuvent alcaliniser ou acidifier le milieu. Par exemple, certains champignons comme *Colletotrichum gloeosporioides* (Prusky et al. 2001) et *Alternaria alternata* (Eshel et al. 2002) alcalinisent les tissus de leur hôte en produisant de fortes concentrations d'ammonium. A l'inverse, d'autres espèces fongiques vont acidifier les tissus via la sécrétion d'acides organiques avec pour conséquence une amplification de leur virulence. C'est le cas de *Botrytis cinera* (Manteau et al. 2003) et de *Sclerotina sclerotiorium* (Bateman and Beer 1965) qui produisent de l'acide oxalique. Les espèces du genre *Penicillium* telles que *Penicillium expansum* et *Penicillium digitatum* produisent majoritairement de l'acide citrique et de l'acide gluconique (Prusky and Yakoby 2003; Prusky et al. 2004).

Un mécanisme de régulation par le pH a été caractérisée chez *Aspergillus nidulans* et les gènes codant pour plusieurs facteurs de transcription impliqués dans cette régulation ont été clonés et caractérisés chez diverses espèces fongiques. Le dernier composant de cette voie est le facteur de transcription PacC qui va réguler positivement ou négativement l'expression d'un certain nombre de gènes en se fixant sur leurs régions promotrices. Ce facteur de transcription étudié chez plusieurs espèces fongiques est impliqué dans la régulation de voies de biosynthèse de métabolites secondaires (Morales et al. 2008a). Des gènes orthologues à *pacC* ont été identifiés, notamment chez *Penicillium expansum*.

Une étude très récente suggère l'implication du facteur de transcription PacC dans la production de patuline par *Penicillium expansum* (Barad et al. 2014). Par la technique du RNAi, un mutant *pacC* a été généré puis la production d'acide gluconique et de patuline, ainsi que la pathogénicité ont été analysés. Les trois paramètres étudiés sont affectés chez les mutants pour le gène *pac*C.

L'analyse des régions promotrices des gènes du cluster de la voie de biosynthèse de la patuline chez *Penicillium expansum* révèle la présence de site de fixation pour le facteur de transcription PacC dans les régions promotrices des gènes *patA* et *patL.* Le gène *patL* codant pour le facteur de régulation spécifique de la voie de biosynthèse de la patuline (Snini, en cours de rédaction), il n'est pas surprenant de retrouver un site de fixation pour le facteur de transcription PacC suggérant ainsi une régulation de la voie par le pH. La présence d'un tel site de fixation dans la région promotrice du gène *patA* est plus surprenante.

D'autres paramètres sont à prendre en considération. La composition des pommes en sucres ou en composés phénoliques peut aussi être un facteur influençant l'infection et la production de patuline par *Penicillium expansum*. Des études portant sur l'effet des composés phénoliques et la production de mycotoxines ont été menées chez différentes espèces fongiques. Une étude démontre l'inhibition *in vitro* de la biosynthèse d'aflatoxine B1 par trois acides phénoliques (Hua et al. 1999). D'autres études démontrent l'inhibition de la production d'ochratoxine A et la croissance de diverses espèces du genre *Aspergillus* par des composés phénoliques (Palumbo et al. 2007; Romero et al. 2009). A l'inverse, l'étude de Ponts et al. (2011), démontre une forte induction de la production de trichothécènes de type B (déoxynivalénol et son dérivé acétylé 15ADON) par l'acide coumarique, l'acide ferulique et l'acide caféique. Dans cette même étude, l'acide hydroxybenzoïque diminue significativement la production de ces même trichothécènes par *Fusarium graminearum*. Une étude menée chez *Penicillium digitatum*, pathogène des agrumes, démontre l'action antifongique des flavonoïdes. La croissance radiale et la sporulation de *Penicillium digitatum* sont très affectés par les flavonoïdes présent chez les agrumes, notamment la naringine et la nobilétine (Ortuño et al. 2006).

Actuellement, une seule étude rapporte l'effet de plusieurs composés phénoliques sur la croissance et la production de patuline par *Penicillium expansum*. La quercétine et l'umbelliférone semblent être les plus efficaces face à une attaque par ce pathogène (Sanzani et al. 2009). Cependant, aucune corrélation entre la croissance de *Penicillium expansum* et l'accumulation de patuline n'a été démontrée. Cette absence de corrélation peut être attribuée à l'influence des composés phénoliques sur la voie de biosynthèse de la patuline. Néanmoins, aucune donnée n'est disponible dans la littérature sur les effets des composés phénoliques sur la voie de biosynthèse de la patuline ou sur la corrélation entre la composition des pommes et la production de patuline. Ce sujet est d'autant plus complexe que la composition des pommes évolue lors du stockage qui dure parfois plusieurs mois.

Enfin, il pourrait être intéressant de distinguer les pommes issues de l'agriculture biologique de celle qui ne le sont pas. Les nombreux traitements reçus par les pommiers et les pommes pourraient moduler le comportement de *Penicillium expansum* ainsi que la production de métabolites secondaires.

Chapitre 3 Impact de la lumière sur la voie de biosynthèse de la patuline et sa production chez *Penicillium expansum*

RESUME DE L'ÉTUDE

Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe de Rolf Geisen du Max Rubner Institut à Karlsruhe en Allemagne. Lors d'un séjour d'une durée de trois mois nous nous sommes intéressés à l'impact de la lumière sur la croissance de *Penicillium expansum* et sa production de patuline. De nombreuses études ont démontré que la lumière avait un impact sur les réponses physiologiques des champignons filamenteux. En effet, elle a un impact sur la production de pigments, sur la balance entre la reproduction sexuée et asexuée ainsi que sur le métabolisme secondaire et donc la production de mycotoxines. Ces études menées sur diverses espèces de champignons filamenteux ont été majoritairement réalisées sur l'impact de la lumière blanche. Dans cette étude nous avons analysé l'impact de lumière de différentes longueurs d'ondes (donc de différentes couleurs) sur la croissance et la production de patuline chez *Penicillium expansum*.

Dans un premier temps nous avons analysé la croissance de *Penicillium expansum* incubé sous différentes couleurs de lumières. Ces lumières sont : bleu royal (455 nm, 3350 lx), vert (530 nm, 7250 lx), jaune (590 nm, 6400 lx), rouge (627 nm, 7700 lx) et blanche (17750 lx). Une culture contrôle a été réalisée à l'obscurité. La croissance de *Penicillium expansum* est fortement ralentie lorsqu'il est exposé aux lumières bleue, rouge et blanche. Incubé sous les lumières jaune et verte la croissance de *Penicillium expansum* est moins affectée. La sporulation de *Penicillium expansum* en fonction des différentes conditions lumineuses a aussi été évaluée. Comme pour la croissance, la sporulation est largement réduite sous les lumières bleue, rouge et blanche. Dans un second temps nous avons réalisé une expérience de « shift » afin d'observer si *Penicillium expansum* peut retrouver un comportement normal après une première exposition à la lumière bleue ou rouge. Les résultats obtenus montrent que même après 3 jours d'exposition aux lumières bleue ou rouge, une fois replacé dans le noir *Penicillium expansum* retrouve une morphologie similaire à celle d'une culture incubée dans le noir. De même, *Penicillium expansum* enclenche la production de patuline dès son incubation à l'obscurité. Dans une dernière partie, la capacité de *Penicillium expansum* à infecter des pommes sous les lumières de différentes longueurs d'ondes a été déterminée. Comme observé pour la croissance et la sporulation, les lumières bleue, rouge et blanche affectent *Penicillium expansum* dans sa capacité à infecter les pommes. Les lumières rouge et blanche causent une inhibition totale de la virulence alors que la lumière bleue ralentit l'apparition des lésions brunes. D'autre part il semblerait que la lumière jaune stimule l'apparition de ces symptômes.

Cette étude démontre pour la première fois l'impact des différentes lumières sur la croissance de *Penicillium expansum* ainsi que sur la production de patuline. Grace à cette étude, le changement des conditions de stockage des pommes est envisageable ainsi que la diminution de l'utilisation de produits chimiques tels que les fongicides lors du stockage.

1. INTRODUCTION

Penicillium expansum est un contaminant commun des *pomaceae* (pommes et poires) et particulièrement de la pomme en causant la pourriture bleue. Ce champignon est le principal responsable de la présence de patuline dans les pommes et ses produits dérivés. *Penicillium expansum* étant capable de se développer à de basses températures le stockage en chambre froide des denrées n'empêche pas la croissance du champignon mais la ralenti seulement. Chaque année, cette espèce fongique est responsable de grosses pertes économiques.

La contamination des pommes par *Penicillium expansum* survient seulement à partir du stockage, qui généralement s'effectue dans des entrepôts à l'abri de la lumière. La production de patuline par *Penicillium expansum* étant favorisée par la blessure du fruit, les bonnes pratiques de culture préconisent une manipulation délicate des fruits pendant et après la récolte. Aussi, avant les étapes de transformation, une phase de triage est réalisée afin d'éliminer les fruits dont la contamination par *Penicillium expansum* est visible. A la fin du processus de transformation, la présence de patuline dans le produit final se réduit à un constat d'échec. En effet, une fois présente la patuline ne peut plus être éliminée par des procédés technologiques de décontamination. Il est donc important et nécessaire d'intervenir avant que le champignon ne produise la mycotoxine.

D'une manière générale, les gènes impliqués dans des voies de biosynthèse sont regroupés sous forme de cluster (Keller and Hohn 1997; Keller et al. 2005) et les gènes au sein d'un même cluster sont soumis à une régulation orchestrée par un facteur de régulation spécifique à la voie de biosynthèse. La patuline ne déroge pas à cette règle. En effet, le cluster de gènes responsable de la voie de biosynthèse de la patuline a été récemment identifié chez *Penicillium expansum* (Tannous et al. 2014). Il est composé de 15 gènes et se trouve à l'intérieur de celui-ci un gène codant pour un facteur de transcription avec un domaine de liaison à l'ADN de type doigt de zinc Zn(II)2Cys6 qui régule positivement l'expression des gènes *pat* et qui est indispensable à la production de patuline (Snini, en cours de rédaction).

De nombreux paramètres environnementaux comme la température, la disponibilité en eau, le substrat, affectent la biosynthèse des mycotoxines. La lumière est un facteur très important pour les champignons. Elle influence plusieurs réponses physiologiques telles que la pigmentation, la balance entre le développement sexué et asexué ainsi que le métabolisme secondaire. Les connaissances à propos des mécanismes de perception de la lumière et la transduction des signaux qui en découlent sont faibles. Néanmoins, plusieurs études ont démontré que la production de métabolites secondaires par les champignons filamenteux pouvait être influencée par la lumière. La réponse des champignons à la lumière a été étudiée chez différentes espèces mais la grande majorité de ces études se sont limitées aux effets de la

lumière blanche sur la croissance et le métabolisme secondaire. Cependant, des études relativement récentes ont démontré que la longueur d'onde et l'intensité de la lumière sont aussi des paramètres importants qui peuvent affecter la croissance, la reproduction et la production de métabolites secondaire par le champignon (Purschwitz et al. 2008; Rodriguez-Romero et al. 2010).

La réponse à la lumière bleue chez *Neurospora crassa* est la réponse qui à été la plus étudiée. Elle favorise la conidiation et le développement des protopérithèces (Innocenti et al. 1983), elle induit la synthèse de caroténoïdes (Harding and Turner 1981) et régule l'horloge circadienne (Sargent and Briggs 1967; Linden and Macino 1997). Ces différentes réponses dépendent toutes de la présence du complexe protéique white collar (WCC). Ce complexe composé des protéines white collar 1 (WC-1) et white collar 2 (WC-2) se forme à la lumière et se fixe aux promoteurs des gènes inductibles à la lumière afin d'activer leur transcription. Le facteur de transcription white collar 1 (WC-1) est le plus ancien et le premier photorécepteur fongique à avoir été décrit (Ballario et al. 1996). Il agit comme un photorécepteur à la lumière bleu lorsqu'il agit avec une molécule de flavine (Froehlich et al. 2002).

Aspergillus nidulans constitue un second exemple très étudié. Des gènes orthologues des photorécepteurs de *Neurospora crassa* ont été décrits : le phytochrome FphA, récepteur à la lumière rouge (Blumenstein et al. 2005; Purschwitz et al. 2008) un homologue de WC-1, LreA et un homologue de WC-2, LreB (Purschwitz et al. 2008).

Chez cette espèce, la balance entre le développement sexué et asexué est contrôlée par la lumière. En présence de lumière de nombreuses spores asexuées sont produites alors qu'à l'obscurité cette espèce fongique produit des ascospores. De même, il a été démontré que *Aspergillus nidulans* était non seulement sensible à la lumière rouge mais aussi à la lumière bleue (Mooney and Yager 1990; Purschwitz et al. 2008). La lumière bleue favorise la reproduction asexuée mais de façon moins efficace que la lumière naturelle (ou une combinaison des lumières bleue et rouge) et inhibe partiellement la reproduction sexuée. La lumière bleue comme la lumière naturelle inhibe la production de stérigmatocystine.

Des études plus récentes se sont intéressées non seulement aux effets des lumières bleue et rouge mais aussi à d'autres lumières à savoir les lumières jaune et verte. Par exemple, l'étude de Schmidt-Heydt et al. (2011), démontre que les lumières aux longueurs d'ondes extrêmes telles que le rouge (627 nm) et le bleu (470-455 nm) ont un plus fort impact que les longueurs d'ondes moyennes (500-600 nm, vert et jaune) sur la croissance des espèces fongiques productrices d'ochratoxine ainsi que sur la production de cette mycotoxine. Cette étude démontre aussi que l'intensité de la lumière est un paramètre important. Une autre étude (Fanelli et al. 2012c) a

démontré que la lumière pouvait stimuler la croissance de *Fusarium proliferatum* et sa production de fumonisines en comparaison à une incubation à l'obscurité.

Dans cette étude nous avons analysé d'une part l'impact de différentes longueurs d'ondes sur la croissance et la production de patuline par *Penicillium expansum* et d'autre par l'impact de ces conditions lumineuses sur la capacité de *Penicillium expansum* a infecter des pommes.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Souches et conditions de culture

La souche de *Penicillium expansum* NRRL 35695 (USDA-ARS National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Ill.) initialement isolée des baies de raisin dans le Languedoc Roussillon en France a été utilisée pour cette étude. Elle a été cultivée sur le milieu gélosé Potato Dextrose Agar (PDA) durant 5 jours à 25˚C. A partir de cette culture une suspension de spores a été préparée dans de l'eau stérile puis les spores ont été dénombrées à l'aide d'une cellule de Thoma. La suspension a été diluée en fonction du dénombrement afin d'obtenir une suspension à 10^5 spores/mL. Cinquante microlitres de cette suspension de spores ont été utilisés pour inoculer en point central des boites de Petri de contenant du PDA (20 mL par boite) afin d'étudier la croissance radiale de la souche, la production de patuline et l'expression des gènes du cluster de la voie de biosynthèses de la patuline.

2.2. Incubateur à lumière (Figure 1)

Cette boite à lumière a été construite afin de permettre l'incubation des cultures sous différentes longueurs d'ondes de lumière (Schmidt-Heydt et al. 2011). Cette boite est divisée en six chambres et chaque chambre est équipée de 5 diodes de type Luxeon high power 5 W, une diode est placée au milieu de la chambre et les quatre autres aux quatre angles de la chambre. Les chambres présentent les longueurs d'ondes suivantes : chambre 1, bleu royal (455 nm, 3350 lx) ; chambre 2, vert (530 nm, 7250 lx) ; chambre 3, jaune (590 nm, 6400 lx) ; chambre 4, rouge (627 nm, 7700 lx) ; chambre 5, lumière blanche (17750 lx). La lumière dite "blanche" dans cette étude ne correspond pas à la lumière naturelle du soleil mais à une combinaison de lumière bleue et rouge additionnée d'une faible quantité de lumière verte. Sur les couvercle de chacune des boites à lumières ont été positionnés des mini-ventilateurs afin de garantir le renouvèlement de l'air.

Les boites de Petri ont été positionnées directement en dessous de chaque diode afin de garantir la plus grande intensité. La distance entre les diodes et les boites de Petri était de 18 cm ne provoquant pas d'effet de chauffe. Une sixième chambre a été utilisée dans le noir afin de servir de contrôle. La boite à lumière a été placée dans une pièce dont la température a été fixée à 25˚C.

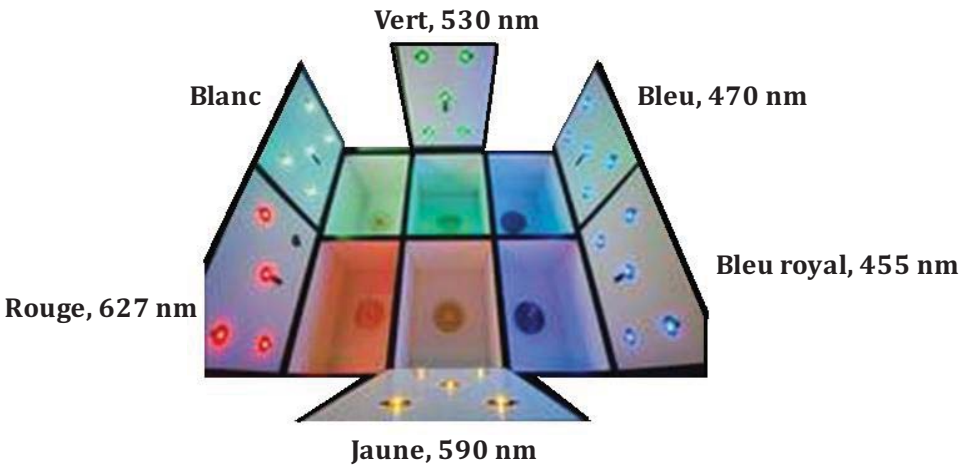


Figure 1 : Photo de la boite à lumière utilisée dans cette étude.
La chambre initialement utilisée à 470 nm a été utilisée dans le noir comme condition contrôle. Des mini-ventilateurs sont disposés sur les couvercles de chacune des chambres afin de garantir le renouvèlement de l'air.

2.3. Etude de la morphologie et de la croissance radiale

Afin d'analyser la croissance et la morphologie de la souche sous les différentes longueurs d'ondes de lumière 50 µL de la suspension de spores à 10^5 spores/mL ont été inoculés en point central sur le milieu gélosé Potato Dextrose Agar (PDA) puis incubés durant 5 jours à 25°C dans les différentes conditions lumineuses. Au terme de l'incubation, les cultures ont été photographiées et les diamètres des colonies ont été mesurés. Cette expérience a été réalisée 5 fois.

2.4. Expérience de shift

Cette expérience dite de « shift » a permis d'analyser la capacité de *Penicillium expansum* à s'adapter aux changements de conditions lumineuses. Dans un premier temps les boites de Petri ont été exposées à une lumière bleue ou rouge ou incubées dans le noir. Au terme de cette première incubation de trois jours, les conditions lumineuses ont été changées. Les cultures qui étaient incubées dans le noir ont été placées en lumière bleue ou rouge et inversement. L'incubation a été poursuivie pendant 3 jours, 5 jours et 7 jours supplémentaires. Les cultures ont été réalisées comme décrit dans le paragraphe précédent et au terme de l'incubation des aliquots de 1 g de gélose avec le mycélium ont été prélevés et extraits comme décrit dans le paragraphe 2.8.

2.5. Extraction des ARN totaux et Reverse transcription

Avant inoculation les boites de Petri de PDA ont été recouvertes d'un film cellophane afin de faciliter la récupération du mycélium au terme de l'incubation. L'extraction des ARN totaux a été réalisée à l'aide du kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Un traitement à la DNase I (RNase-free DNase, Qiagen) a été réalisé selon les instructions du fournisseur afin d'éliminer les contaminations par de l'ADN génomique. Les ADN complémentaires ont été synthétisés par transcription inverse avec le kit RT Omniscript reverse transcription (Qiagen). Chaque réaction de 20 µL est composé de 2 µg d'ARN totaux, 2 µL d'oligo dT (10 µM), 2 µL de tampon RT-PCR 10X, 2 µL de dNTPs (10 mM), 1 µL (4U) d'inhibiteur de RNase, 1 µL (4U) de Omniscript Reverse Transcriptase et d'eau RNase-free pour atteindre un volume final de 20 µL. La synthèse des ADN complémentaires a été réalisée 1 heure à 37 °C. De ces boites de culture des aliquots de 1 g de gélose ont été prélevés et extraits comme décrit dans le paragraphe 2.8. Ces aliquot de gélose ont été utiliser pour évaluer la production de patuline par *Penicillium expansum* sous les différentes conditions lumineuses. La production de citrinine, une autre mycotoxine a également été évaluée.

2.6. PCR quantitave en temps réel (RT-PCR)

La PCR quantitative en temps réel a été utilisée pour quantifier l'expression des gènes du cluster de la voie de biosynthèse de la patuline chez *Penicillium expansum*. Les amorces qui ont été utilisées sont les mêmes que décrites par Tannous et al. (2014). Toutes les analyses ont été réalisées dans des plaques de 384 puits sur un thermocycleur ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Forster City, CA, United States) et avec le programme suivant : 10 min à 95°C puis 45 cycles de 15 sec à 95°C et 60 sec à 60°C. L'analyse des courbes de dissociations a permis de confirmer la spécificité de l'amplification. Les amplifications ont été réalisées dans un volume total de 5 µL (2,5 µL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), un volume approprié de chaque primer et 1 µL d'ADN complémentaire dilué au 1/20ième).

2.7. Etude de la pathogénicité et de la virulence de Penicillium expansum dans les différentes conditions d'exposition aux lumières

La capacité de *Penicillium expansum* à infecter des pommes a été testée dans les différentes conditions lumineuses décrites précédemment. Des pommes de la variété Golden Delicious sans défauts et sans blessures visibles ont été choisies dans un supermarché de Karlsruhe (Allemagne). Comme décrit précédemment par Sanzani et al. (2012), la surface des pommes a été stérilisée avec une solution à 2 % d'hypochlorite de sodium puis rincée à l'eau claire. Les pommes ont été blessées avec un cure-dent stérile en un seul point central et 10 µL d'une

suspension de spores à 10^4 spores/mL ont été inoculés dans la blessure. Les pommes ont été incubées 12 jours à 25°C dans les différentes conditions lumineuses. Les diamètres des lésions formées ont été mesurés régulièrement le long de la durée d'incubation et une vitesse de développement des lésions a pu être calculée pour chacune des conditions lumineuses.

A la fin de l'incubation, le volume de pourriture formé a été déterminé puis une extraction des métabolites secondaires a été réalisée. Afin de déterminer le volume de pourriture formé, la méthode décrite par Beart et al. (2007) a été utilisée.

Pour l'extraction des métabolites, les pommes ont été broyées puis comme décrit précédemment par MacDodald et al. (2000) une prise d'essai de 10 g a été digérée toute la nuit à température ambiante avec 150 µL de pectinase d'*Aspergillus aculeatus* et 10 mL d'eau stérile. Le lendemain, les échantillons ont été centrifugés à 4500 g durant 5 min et les surnageants ont été collectés et extraits avec 50 mL d'acétate d'éthyle. Après une nuit en agitation, la phase organique a été récupérée, filtrée puis évaporée. L'extrait sec a été resuspendu dans 300 µL d'un mélange méthanol/eau (80/20). L'extrait resuspendu a ensuite été filtré au travers d'un filtre de porosité de 0,45 µm puis injecté dans le système de chromatographie.

2.8. Analyse en chromatographie sur couche mince (CCM) de la production de patuline

Les aliquots de gélose prélevés au terme de l'incubation ont été extrait avec 1 mL de chloroforme. Après 30 min d'agitation à température ambiante, les aliquots de gélose ont été retirés et le chloroforme évaporé à l'aide d'un SpeedVac. L'extrait sec a été resuspendu dans 60 µL d'un mélange de méthanol/eau (80/20) et 10 µL ont été déposés sur les plaques utilisées pour la chromatographie en couche mince (Silica gel 60, Merck, Darmstadt, Allemagne). La phase mobile utilisée était composée d'un mélange de toluène, acétate d'éthyle et d'acide formique (60:30:10 [v:v:v]). Un standard de patuline (Sigma, St Louis, USA) a été utilisé comme référence et les spots ont été visualisés à 270 nm. Pour l'analyse de la production de citrinine, les spots ont été visualisés à 366 nm en comparaison à un standard de citrinine (Sigma, St Louis, USA).

2.9. Analyse HPLC-DAD de la production de patuline

Pour l'analyse par HPLC les extraits secs ont été resuspendu dans 100 µl d'un mélange méthanol/eau (80/20) avant d'être injecté dans le système de chromatographie, une chaine Ultimate 3000 HPLC (Dionex/ThermoScientific, Courtaboeuf, France). Les analyses ont été réalisées avec une colonne de type Gemini 5 µm C6-Phenyl 250 × 4.60 mm (Phenomenex, Torrance, CA, United States) avec un débit de 0,9 mL/min. L'éluant A était de l'eau acidifié avec 0,2 % d'acide acétique et le solvant B du méthanol. Le programme d'élution qui a été utilisé était en gradient et les conditions étaient les suivantes : 0 min 100 % B, 10 min 90 % B, 30 min 50 %

B, 45 min 90 % B puis de 45 min à 50 min 90 % B et de 60 min à 65 min 0 % B. La présence de patuline a été détectée à la longueur d'onde de 277 nm et confirmée par l'utilisation d'un standard (Sigma-Aldrich) puis quantifiée à l'aide d'une gamme étalon.

3. RESULTATS

3.1.Suivis de la croissance et production de patuline

Au terme des 5 jours d'incubation à 25°C les diamètres de croissance ont été mesurés. La mesure a été prise dans deux sens en angle droit. Les lumières bleue, rouge et blanche ont pour effet de ralentir fortement la croissance de *Penicillium expansum.* Par contre, les incubations sous les lumières jaune et verte ont un effet beaucoup plus modéré sur la croissance de *Penicillium expansum*. L'analyse de la sporulation dans les différentes conditions lumineuses a montré que la sporulation été beaucoup moins importante lorsque la souche été incubée sous les lumières bleue, rouge et blanche (Figure 2).

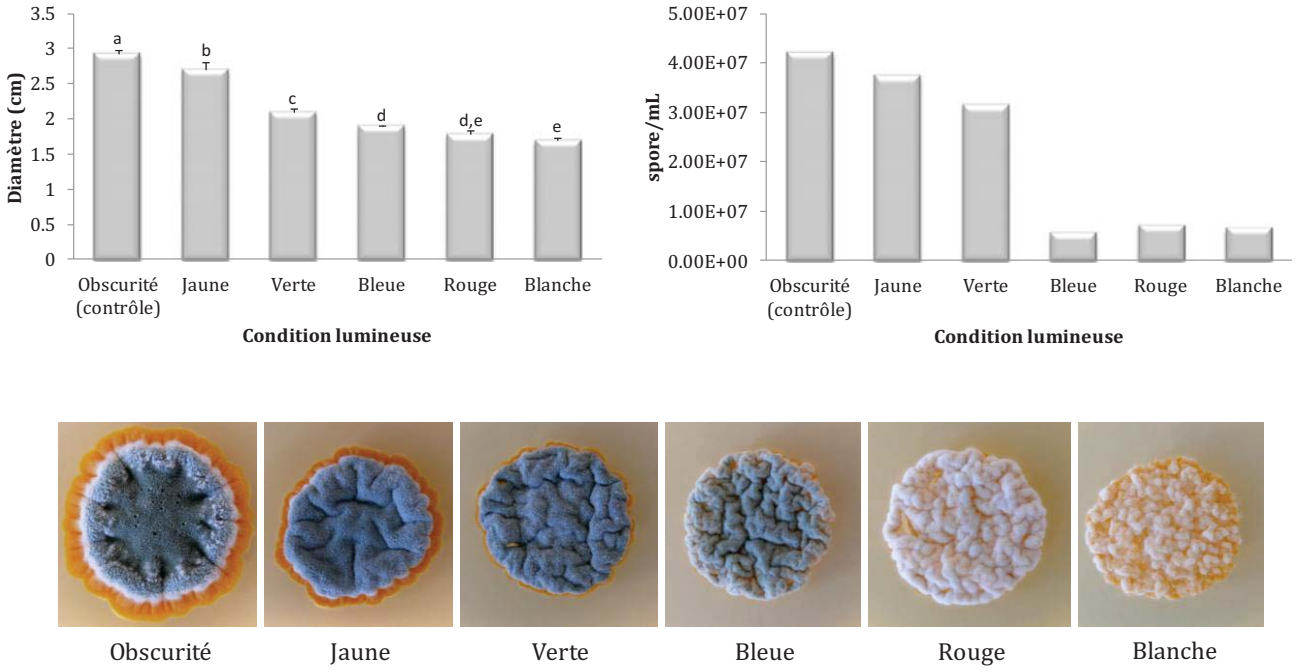


Figure 2 : Croissance radiale, sporulation et aspect macroscopique de la souche NRRL 35695 sur PDA incubée 5 jours à 25°C dans les différentes conditions lumineuses.
Les résultats de l'histogramme sont présentés en moyenne ± erreur type (SEM) et le seuil de significativité a été fixé à p<0,05. Les différentes lettres en minuscules témoignent d'une différence significative entre les différents groupes.

Comme décrit précédemment des aliquots de gélose ont été extraits et une analyse qualitative de la présence de patuline par chromatographie en couche mince a été réalisée. Les spots ont été visualisés à 270 nm en comparaison à un standard de patuline. La présence de patuline n'a été détectée que pour les cultures incubées à l'obscurité et aux lumières jaune et verte (Figure 3).

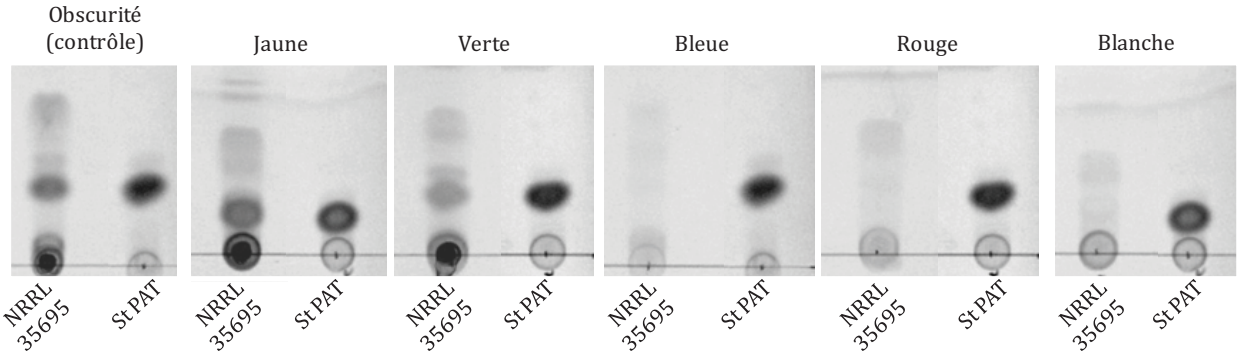


Figure 3 : Analyse de la production de patuline sur PDA par chromatographie sur couche mince (CCM).
Pour chaque condition lumineuse étudiée, une analyse en comparaison d'un standard de patuline (St PAT) a été réalisée. Un spot correspondant à la présence de patuline est visualisé pour la culture de la souche NRRL 35695 de *Penicillium expansum* sur PDA à l'obscurité, sous lumière jaune et lumière verte. Aucune trace de patuline n'a été détectée pour les cultures incubées sous les lumières bleue, rouge et blanche.

En exposant les plaques utilisée pour la chromatographie en couche mince à 366 nm, les spots correspondant à la citrinine produite ont pu être visualisés. La présence de citrinine a été détectée sous toutes les conditions lumineuses sauf pour la lumière bleue. Néanmoins, il semblerait que des concentrations plus faible sont détéctée lorsque *Penicillium expansum* est incubé sous les lumières blanche et rouge (Figure 4).

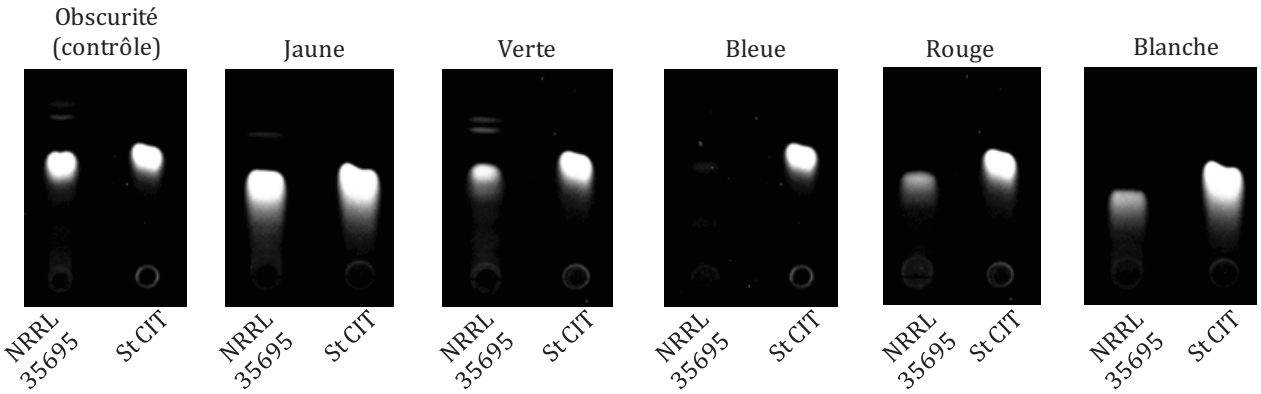


Figure 4 : Analyse de la production de citrinine sur PDA par chromatographie sur couche mince (CCM).
Pour chaque condition lumineuse étudiée, une analyse en comparaison d'un standard de citrinine (St CIT) a été réalisée. Un spot correspondant à la présence de patuline est visualisé pour la culture de la souche NRRL 35695 de *Penicillium expansum* sur PDA sous toutes les conditions lumineuses sauf pour la lumière bleue.

3.2. Etude de l'expression des gènes du cluster de la voie de biosynthèse de la patuline

Après 5 jours d'incubation à 25°C sur PDA et dans les différentes conditions lumineuses les ARNs totaux ont été extraits et l'expression de chacun des gènes du cluster analysée. Les niveaux d'expression des gènes ont été normalisés par rapport à l'expression du gène de la β-tubuline et les résultats ont été rapportés à la condition contrôle, à savoir l'incubation des cultures dans le noir (Figure 5).

L'expression d'aucun gène du cluster n'a pu être mesuré pour les cultures incubées sous lumière blanche. En effet, une analyse de la qualité des ARNs a démontré que les ARNs issus des cultures incubées sous lumière blanche étaient complètement dégradés.

En ne détectant pas de patuline dans les cultures exposées aux lumières bleue et rouge nous nous attendions a trouver la voie de biosynthèse de la patuline complètement éteinte. De façon surprenante, les gènes du cluster ne présentent pas tous le même profil d'expression selon la condition lumineuse considérée.

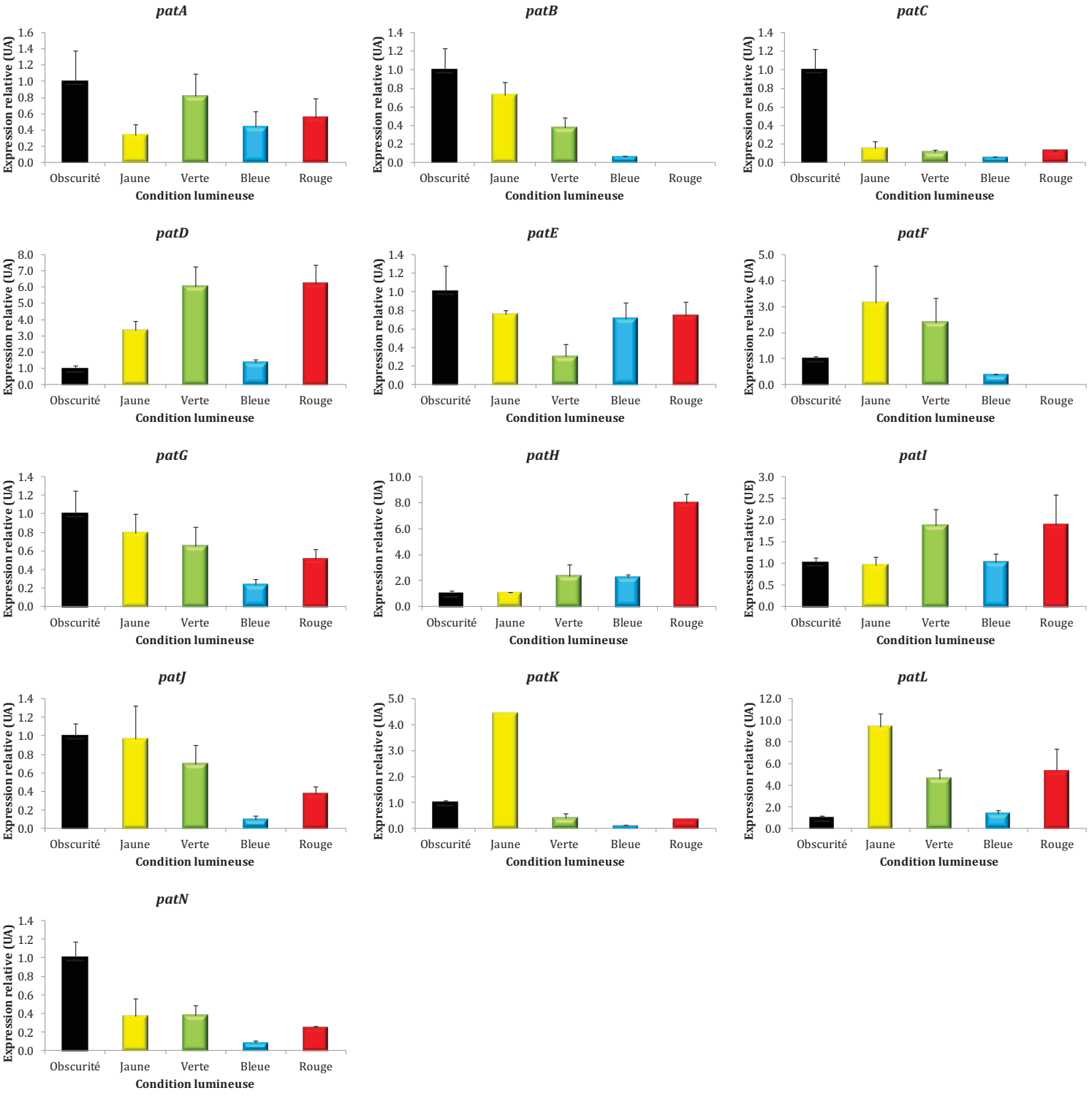


Figure 5 : Niveaux d'expression des gènes du cluster de la voie de biosynthèse de la patuline chez la souche *Penicillium expansum* NRRL 35695 incubée sous différentes conditions lumineuses.
L'expression des gènes a été normalisée par rapport au gène de ménage de la β-tubuline et rapportée à son expression dans la condition contrôle, a savoir l'incubation dans le noir.

Le gène *patL,* codant pour le facteur de régulation spécifique de la voie de biosynthèse de la patuline, est globalement surexprimé dans toutes les conditions lumineuses testées en comparaison à l'obscurité. Le facteur de régulation PATL étant un facteur de régulation positif (Snini en cours de rédaction), l'absence de patuline dans les cultures exposées aux lumières bleue et rouge aurait pu être expliqué par une répression de l'expression du gène *patL.* Il semblerais donc que la régulation de la production de la patuline par les différentes conditions lumineuses passen par une autre cible. Sous les conditions lumineuses bleue et rouge les résultats ne sont pas si évidents. D'une manière générale, dans la condition lumineuse bleue, les gènes sont sous-exprimés sauf pour les gènes *patD*, *patH* et *patI* dont les expressions sont équivalentes à la condition contrôle. Etrangement, ces mêmes gènes sont surexprimés dans la condition lumineuse rouge. Un gène sort du lot, le gène *patK*, codant pour l'acide 6-méthylsalicylique synthase est surexprimé seulement dans la condition lumineuse jaune et sous-exprimé sous les lumières bleue et rouge.

L'absence de patuline dans les extraits de cultures exposées aux lumières bleues et rouges peut s'expliquer par la répression d'un seul gène du cluster, bloquant ainsi la voie de biosynthèse. Il peut y avoir plusieurs candidats à cette répression. Les gènes *patB*, *patF*, *patG*, *patJ* et *patN* semblent être des bons candidats car leur expression est largement diminuée sous ces conditions lumineuses. Le gène *patC* peut être d'ore et déjà éliminé étant donné que son expression est aussi réprimée en condition lumineuse jaune alors que de la patuline est détectée. De plus, à la différence des gènes *patB*, *patF*, *patG*, *patJ* et *patN* directement impliqués dans la voie de biosynthèse de la patuline, *patC* ne semble pas essentiel car il coderait pour un transporteur de type MFS (Major facilitator superfamily) et non pour une enzyme directement impliquée dans la synthèse de la toxine. La génération d'un mutant pour le gène *patC* permettrait de vérifier cette hypothèse.

3.3. Expérience de shift

Après trois jours d'incubation dans le noir les boites de Petri ont été incubées en lumière bleue ou rouge. Inversement, après trois jours d'incubation en lumière bleue ou rouge les boites de Petri ont été incubées dans le noir. Au terme des différentes durées d'incubation les diamètres de croissance ont été mesurés comme décrit précédemment et la production de patuline a été évaluée. La Figure 6 présente les résultats morphologiques obtenus lors de l'expérience de shift.

L'aspect morphologique varie en fonction de la lumière à laquelle est exposée la culture et évolue après le changement d'exposition lumineuse. A la différence de la culture contrôle qui présente un bon développement mycélien et de l'exsudat en surface dès le troisième jour après le shift, les cultures qui ont d'abord été incubées à l'obscurité puis placées en lumière bleue ou rouge voient leur croissance ralentie, une morphologie macroscopique différente et ne présentent aucun exsudat. Par contre, lorsque les cultures ont d'abord été incubées sous les lumières rouge ou bleue puis placées à l'obscurité, elles initient leur réel développement seulement après le shift. C'est une fois placées à l'obscurité que ces cultures prennent un aspect morphologique similaire à la culture témoin et présentent de l'exsudât en surface dès le troisième jour d'incubation après le shift.

Le suivi de la croissance radiale des différentes cultures démontre bien l'influence de l'obscurité et des lumières bleue et rouge. Les courbes de croissance présentées dans la Figure 7 montrent l'effet inhibiteur des lumières bleue et rouge sur la croissance de la souche de *Penicillium expansum*. Cette inhibition est immédiatement levée lorsque les cultures sont replacées à l'obscurité. Elles retrouvent alors une croissance proche de celle de la culture témoin.

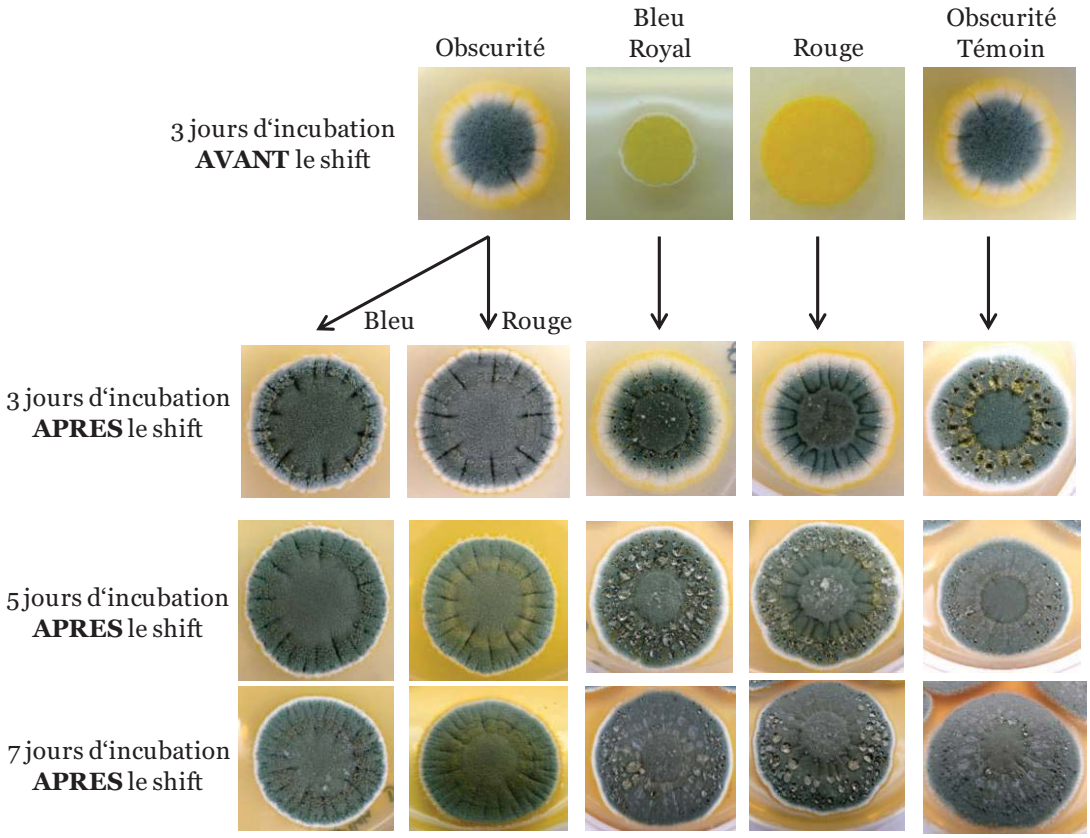


Figure 6 : Suivis de la morphologie de la souche NRRL 35695 lors de l'expérience de shift.
Les cultures ont été réalisées sur PDA à 25°C.

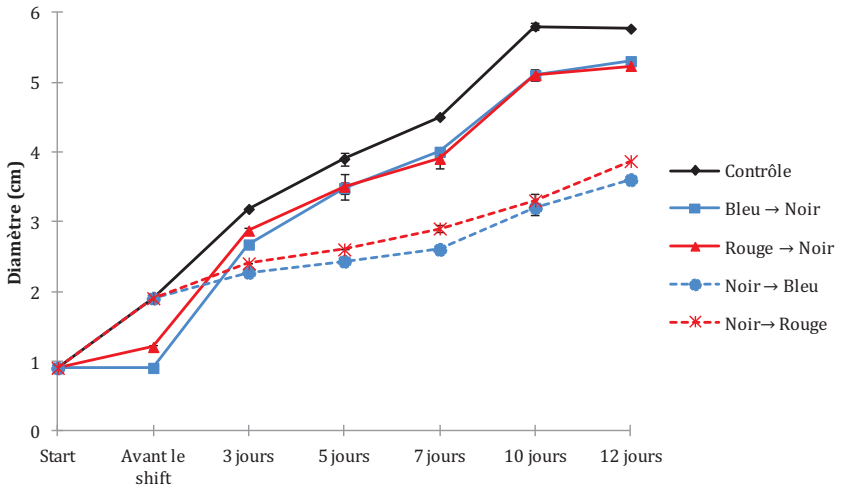


Figure 7 : Suivis de la croissance radiale de la souche NRRL 35695 sur PDA durant la durée de l'expérience de shift.
La culture contrôle a été incubée uniquement à l'obscurité tout le long de l'expérience. Les cultures représentées par des traits pleins ont d'abord été incubées sous la lumière bleue ou sous la lumière rouge avant d'être placée à l'obscurité. Les cultures représentées par des pointillés ont d'abord été incubées à l'obscurité avant d'être placées sous la lumière bleue ou rouge.

Lors de cette expérience de shift, la patuline produite a été extraite des géloses de PDA et quantifiée par HPLC. L'analyse a été réalisée aux différents temps de culture mais aucune répétition de cette expérimentation a été réalisée c'est pourquoi ces résultats sont des résultats préliminaires. Avant le shift, les cultures qui ont été incubées dans l'obscurité présente de la patuline alors qu'aucune trace de patuline n'a été détectée dans les cultures qui ont été incubées sous les lumières bleue et rouge. Cependant, ces dernières une fois placées à l'obscurité présentent de la patuline dès le troisième jour d'incubation après le shift. Il semblerait que *Penicillium expansum* enclenche sa production de patuline dès son passage à l'obscurité.

A l'inverse, les cultures préalablement incubées dans le noir puis placées sous les lumières bleue et rouge présentent une concentration en patuline inférieure à la culture contrôle. Notamment la culture placée sous la lumière rouge, où la concentration en patuline diminue au fur et à mesure de l'exposition (Figure 8)

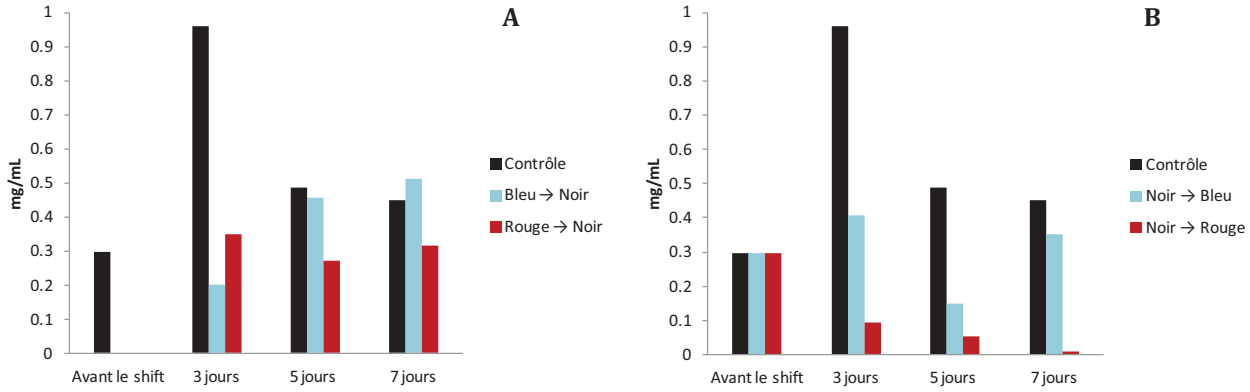


Figure 8 : Suivis de la production de patuline lors de l'expérience de shift.
Après 3 jours d'incubation en lumière bleue ou rouge les cultures ont été incubées à l'obscurité durant 3, 5 et 7 jours supplémentaires (A) ou après 3 jours à l'obscurité les cultures ont été incubées aux lumières bleue et rouge durant 3, 5 et 7 jours supplémentaires (B).

3.4.Etude de la pathogénicité et de la virulence de Penicillium expansum dans les différentes conditions lumineuses

La capacité de *Penicillium expansum* à produire de la patuline dans les différentes conditions lumineuses a été analysée *in vivo* sur des pommes de variété Golden Delicious. L'apparition et le développement des lésions brunes ont été mesurée tout au long de l'incubation et une vitesse de développement a pu être calculée (Figure 9 et Figure 10). Comparée aux pommes qui ont été incubées à l'obscurité, la vitesse de développement des lésions brunes est très réduite pour les pommes qui ont été incubées sous les lumières blanche et rouge avec respectivement 0,02 cm/jour et 0,06 cm/jour. A l'inverse, pour les pommes qui ont été incubées sous la lumière

jaune, la vitesse de développement des lésions brune est plus élevée que pour les pommes incubées dans le noir avec respectivement 0,30 cm/jour et 0,23 cm/jour. Aucunes différences significatives n'ont été observées entre les pommes incubées dans le noir et celles incubées sous les lumières verte et bleue avec respectivement 0,23 cm/jour, 0,21 cm/jour et 0,13 cm/jour. L'aspect des pommes au 6ième jour d'incubation est présenté en Figure 11.

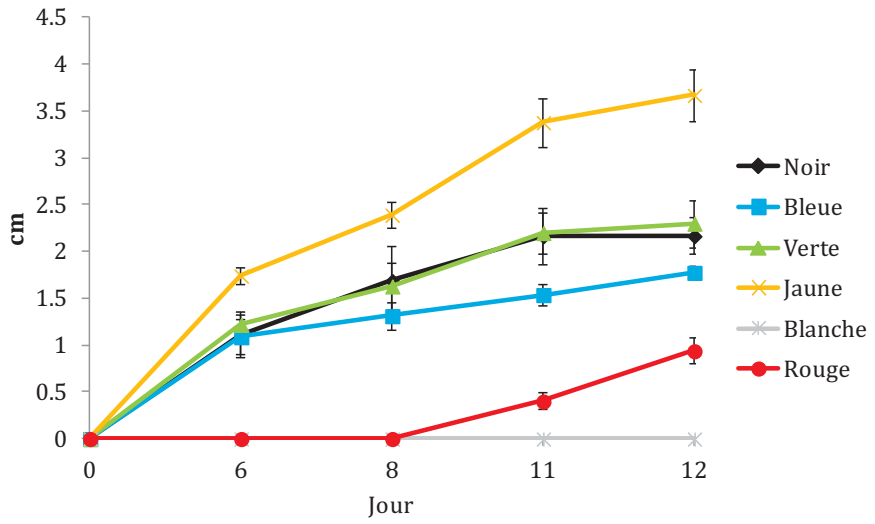


Figure 9 : Suivis de l'apparition des lésions brunes sur les pommes Golden Delicious infectées avec la souche de *Penicillium expansum* NRRL 35695 sous les différentes conditions lumineuses.
Inoculation en un seul point avec 10 µL d'une suspension de spores à 10^4 spores/mL. Les mesures ont été réalisées aux 6ième, 8ième, 11ième et 12ième jour d'incubation.

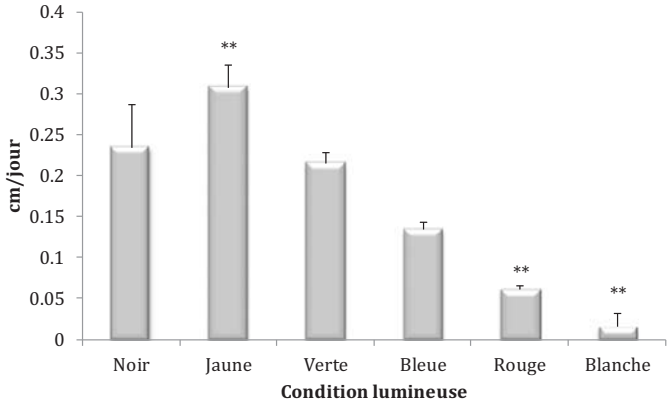


Figure 10 : Vitesse de développement des lésions brunes sur des pommes de la variété Golden Delicious infectées avec la souche de *Penicillium expansum* NRRL 35695.
Les conditions lumineuses ont été comparées à la situation contrôle, à savoir l'incubation dans le noir. Les résultats de l'histogramme sont présentés en moyenne ± erreur type (SEM) avec les seuils de significativités suivant : $p<0,05$ = * ; $p<0,01$ = ** et $p<0,001$ = ***.

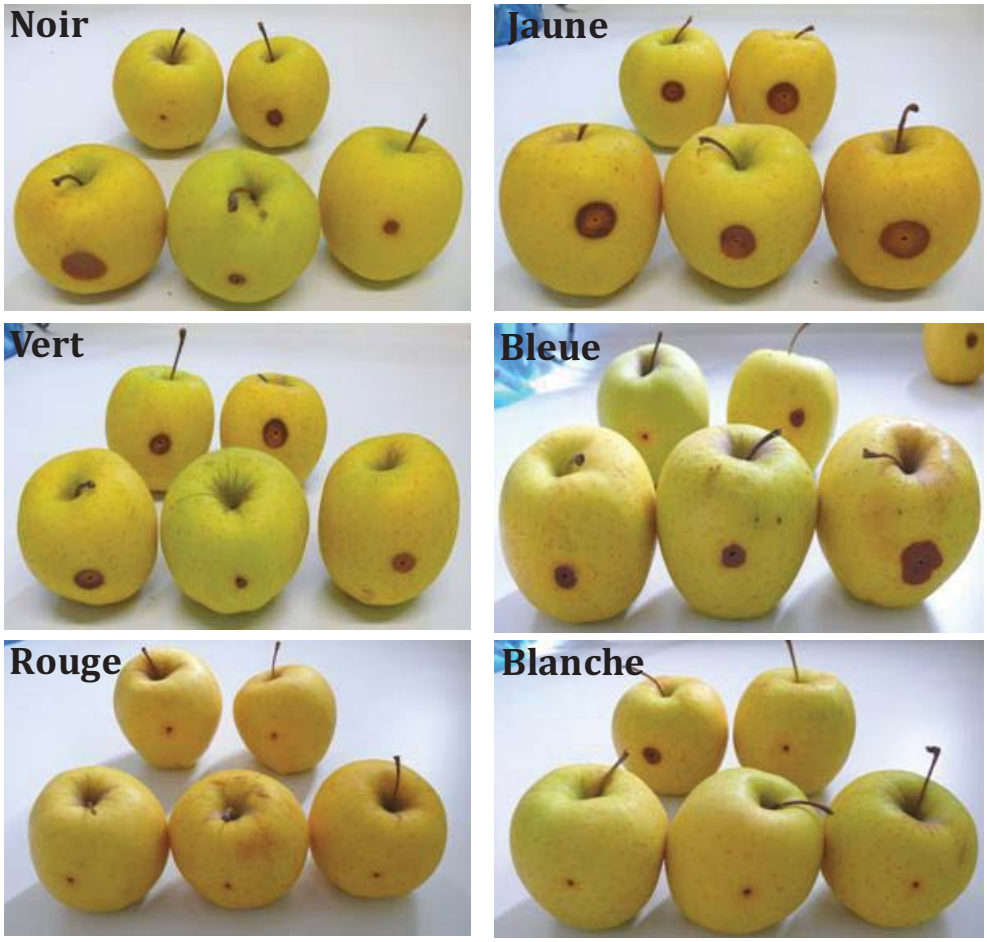


Figure 11 : Aspect des pommes Golden Delicious infectées avec la souche de *Penicillium expansum* NRRL 35695 sous les différentes conditions lumineuses.
Inoculation en un seul point avec 10 µL d'une suspension de spores à 10^4 spores/mL. Les photos ont été prises après 6 jours de culture à 25°C.

Au terme de l'incubation, le volume de pourriture a été estimé selon la méthode décrite par Baert et al. (2007). En comparaison avec les pommes incubées dans le noir, les volumes de pourriture sont largement inférieurs pour les pommes incubées sous les lumières rouge ou blanche. De façon surprenante, les volumes de pourriture dans les pommes incubées sous les lumières verte et jaunes sont supérieurs au volume de pourriture des pommes incubées dans le noir. Aucune différence significative n'a été observée entre les pommes incubées dans le noir et sous lumière bleue (Figure 12).

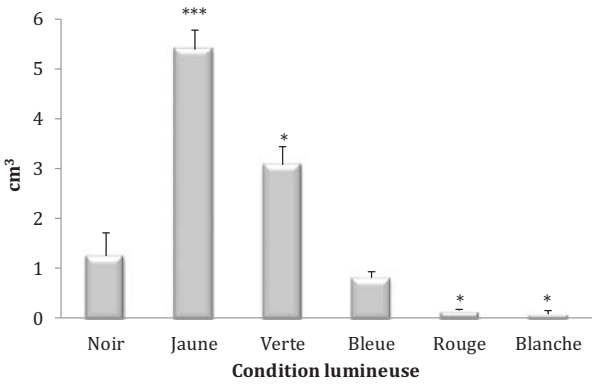


Figure 12 : Volume de pourriture sur des pommes de la variété Golden Delicious infectées avec la souche de *Penicillium expansum* NRRL 35695 et incubées sous différentes conditions lumineuses.
Les conditions lumineuses ont été comparées à la situation contrôle, à savoir l'incubation à l'obscurité. Les résultats de l'histogramme sont présentés en moyenne ± erreur type (SEM) avec les seuils de significativités suivant : p<0,05 = * ; p<0,01 = ** et p<0,001 = ***.

La production de patuline dans les pommes exposées sous les différentes conditions lumineuses a aussi été évaluée (Tableau 1). Aucune trace de patuline n'a été détectée dans les pommes qui ont été incubées sous la lumière rouge. Par contre de la patuline a été détectée dans les pommes incubées dans toutes les autres conditions lumineuses. Les pommes incubées sous lumière jaune présentent la plus forte concentration de patuline avec, en moyenne, 3,97 µg de patuline par gramme de pomme. Cela représente presque le double de la concentration moyenne de patuline détectée dans les pommes incubées à l'obscurité, à savoir 2,01 µg/g. Les concentrations de patuline détectées dans les pommes incubées sous les lumières verte et bleue sont équivalentes, avec respectivement 0,48 et 0,49 µg par gramme de pomme analysé. Malgré un très faible développement des lésions brunes sur les pommes incubées en lumière blanche, 0,35 µg de patuline par gramme de pomme analysé a été détecté.

Tableau 1 : Analyse de la production de patuline dans les pommes infectées par la souche NRRL 35693 de *Penicillium expansum* et incubées sous les différentes conditions lumineuses.
Les résultats sont issus de cinq répétitions et sont présentés en moyenne ± erreur type (SEM).

Condition lumineuse	Patuline (µg/g de pomme)	SEM
Noir	2,01	1,2
Jaune	3,97	1,07
Verte	0,48	0,26
Bleue	0,49	0,16
Rouge	ND	ND
Blanche	0,35	0,11

4. DISCUSSION

La lumière est un facteur abiotique qui est impliqué dans de nombreux mécanismes moléculaires chez les champignons filamenteux et notamment dans la régulation du métabolisme secondaire. Les études de l'influence de la lumière sur le métabolisme secondaire ont commencé il y a une quarantaine d'années avec celle de Joffe and Lisker (1969) qui a démontré que la lumière régulait négativement la production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus*. Depuis, de nombreuses études ont succédé à celle-ci démontrant ainsi les différentes implications de la lumière dans différents mécanismes de régulation. Chez *Alternaria alternata* la lumière inhibe la production d'alternariol et d'alternariol monomethyl ether (Häggblom and Unestam 1997). A l'inverse, une autre étude a démontré que la production d'aflatoxine B1 et d'ochratoxine A par *Aspergillus flavus* ou par *Aspergillus ochraceus* respectivement est favorisée par la lumière (Aziz and Moussa 1997). Les effets de la lumière ont été étudiés chez différents modèles de champignons mais c'est chez *Neurospora crassa* que les mécanismes moléculaires ont été les plus décrits. Chez cette espèce fongique, la lumière induit la biosynthèse de pigments (Zalokar 1954), tels que les caroténoïdes et favorise le développement asexué. Elle permet l'entrainement de l'horloge circadienne, mécanisme qui aide l'organisme a anticiper les changements de son environnement dus au mouvement rotatoire de la Terre (Merrow et al. 2006). Quelques études sur l'influence de la lumière ont été réalisées sur des souches de *Fusarium verticillioides* (Fanelli et al. 2012c), *Fusarium fujikuroi* et *Fusarium proliferatum* (Matic et al. 2013) et sur des souches d'*Aspergillus* et de *Penicillium* respectivement producteurs d'ochratoxine et/ou de citrinine (Schmidt-Heydt et al. 2011). Dans cette dernière étude, l'équipe de chercheurs a démontré qu'en fonction de la longueur d'onde et de l'intensité de la lumière la croissance de ces espèces fongiques et la biosynthèse d'ochratoxine A pouvaient être complètement inhibées. Les lumières rouge et bleue étant les plus inhibitrices. A l'inverse, chez *Penicillium verrucosum* et *Penicillium expansum* la biosynthèse de citrinine est favorisée par la lumière bleue. Ces résultats montrent que la lumière bleue peut avoir un effet inhibiteur ou un effet activateur sur le métabolisme secondaire. L'impact de la lumière semble être dépendant du métabolite secondaire considéré plutôt que de l'espèce productrice. Par exemple, chez *Fusarium verticillioides* (Fanelli et al. 2012c), *Fusarium proliferatum* et *Aspergillus niger* (Fanelli et al. 2012a) la production de fumonisines est induite par la lumière bleue alors que la production d'ochratoxine A est réprimée dans la même souche d'*Aspergillus niger* mais aussi chez *Aspergillus carbonarius*, *Penicillium verrucosum* et *Penicillium nordicum* (Schmidt-Heydt et al. 2011).

Plusieurs espèces de champignons filamenteux utilisent des récepteurs spécifiques à des longueurs d'ondes et tous comportent une molécule organique de faible poids moléculaire

comme une flavine, une retine ou un tetrapyrrole pour la perception des lumières bleue, verte ou rouge respectivement (Rodriguez-Romero et al. 2010).

Jusqu'à ce jour, aucune étude ne démontre l'effet de la lumière sur la croissance, la morphologie ainsi que sur la biosynthèse de patuline de *Penicillium expansum*. Dans cette étude nous avons démontré que la lumière a un effet inhibiteur sur la croissance et la production de métabolites de *Penicillium expansum*. En effet, lors d'incubation sous lumières blanche, bleue et rouge la croissance est ralentie et la sporulation est très faible. Les lumières aux longueurs d'ondes 590-530 nm (jaune-vert) ont un effet moins inhibiteur et n'affectent pas la sporulation. En terme de production de patuline, une inhibition totale est observée pour les cultures incubées sous les lumières blanche, bleue et rouge. Les résultats obtenus *in vivo* (infection des pommes) ne sont pas en accord avec ces derniers. En effet, de la patuline est également détectée dans les pommes incubées sous les lumières bleue et rouge. Nous pouvons facilement imaginer qu'une fois à l'intérieur de la pomme et donc "à l'abri" de la lumière, *Penicillium expansum* enclenche sa production de patuline. A l'inverse, *in vitro*, une induction de la production de citrinine, une autre mycotoxine, est observée sous ces mêmes lumières. Lorsque les colonies sont incubées sous la lumière bleue ou rouge puis qu'elles sont placées dans l'obscurité elles débutent directement leur croissance et enclenchent leur production de patuline indiquant ainsi que les conditions lumineuses utilisées dans cette étude affectent la croissance de la colonie sans la tuer. Ces résultats sont en accord avec ceux de Schmidt-Heydt et al. (2011) qui démontrent aussi que les espèces fongiques du genre *Penicillium* sont très sensibles à la lumière et en particulier à la lumière bleue. Sandven (1998) a posé l'hypothèse que la citrinine pouvait être un composé protecteur de la lumière. Cette hypothèse est appuyée par l'étude de Schmidt-Heydt et al. (2011) où la croissance de *Penicillium expansum* producteur de citrinine est moins affectée que *Penicillium nordicum* non producteur de citrinine.

L'induction de la production de citrinine suite à l'inactivation de la voie de biosynthèse de la patuline par les lumières blanche et rouge laisse penser que les voies de biosynthèses de la citrinine et de la patuline ne répondent pas à la même régulation par la lumière. Une étude précédente démontre cette situation chez *Penicillium verrucosum* où la citrinine est essentiellement produite dans des conditions lumineuses qui inhibent la biosynthèse d'ochratoxine A. Dans cette même étude, cette situation est également décrite chez *Fusarium graminearum* où la production de déoxynivalénol semble être favorisée par exactement les mêmes conditions lumineuses qui inhibent la production d'ochratoxine A (Schmidt-Heydt et al. 2011). Cette hypothèse est appuyée par l'étude précédente où dans certaines conditions de culture, l'inhibition de la voie de biosynthèse de la patuline par disruption du facteur de régulation spécifique *patL*, conduit à la production de citrinine (Snini en cours de rédaction).

L'analyse de l'expression des gènes du cluster de la voie de biosynthèse de la patuline dans les différentes conditions lumineuses ne permet pas de proposer un mécanisme de régulation très clair. Néanmoins, à l'intérieur du cluster des gènes de la voie de biosynthèse de la patuline, *patL* est un interrupteur essentiel pour la production de patuline. En cas de mutation, il n'est plus capable d'induire l'expression des autres gènes du cluster. Cependant, cette étude est la preuve qu'une surexpression de l'expression du gène *patL* ne garanti pas la surexpression des autres gènes du cluster.

Les nombreuses études portant sur l'influence de la lumière sur les espèces fongiques et leur métabolisme secondaire s'accordent sur l'implication d'un complexe protéique dans la réponse à la lumière. Ce complexe largement étudié chez *Neurospora crassa* (Harding and Turner 1981; Innocenti et al. 1983; Ballario et al. 1998) et chez *Aspergillus nidulans* (Bayram et al. 2010) n'a jamais été identifié chez *Penicillium expansum*. Le white collar complexe (WCC) chez *Neurospora crassa* et le système LreA/LreB chez *Aspergillus nidulans* participent à un autre complexe protéique, plus important, dont la protéine centrale est Vea (Calvo 2008). Vea est impliqué dans de nombreux mécanismes de régulations de diverses fonctions cellulaires, incluant le contrôle de la balance entre la reproduction sexuée et asexuée et bien sûr la régulation du métabolisme secondaire (Calvo 2008). Certainement que la recherche des gènes homologues codant pour les différentes protéines impliquées dans ces mécanismes de régulations chez *Penicillium expansum* permettra de proposer un mécanisme de régulation chez cette espèce fongique.

DISCUSSION GÉNÉRALE et PERSPECTIVES

Dans le cadre de cette thèse, nous avons abordé la problématique de la patuline produite par *Penicillium expansum* dans les pommes. Cette thèse présente deux grands aspects. Les deux premières parties des travaux visent à enrichir les connaissances sur la voie de biosynthèse de la patuline ainsi que sur sa propre régulation alors que dans la dernière partie relevant plus de la recherche appliquée, l'effort a été porté sur le développement d'une méthode pouvant limiter la production de patuline par *Penicillium expansum.*

La discussion s'articulera essentiellement autour d'hypothèses qui peuvent être formulées suite au travail présenté dans ce manuscrit. Le séquençage complet et l'analyse du cluster de gènes impliqué dans la voie de biosynthèse de la patuline sont des outils indispensables dans la compréhension des mécanismes mis en jeu lors de la production de cette mycotoxine. Cette analyse ainsi que les données bibliographiques présentées dans la suite nous permettent de proposer une organisation de la voie de biosynthèse de la patuline au sein de la cellule fongique et un mécanisme induit par *Penicillium expansum* lors de l'infection des pommes. Au cours de ces travaux nous nous sommes aperçu que les voies de biosynthèse de la patuline et de la citrinine pouvez être interconnectées, des exemples étayant cette hypothèse seront présentés. Dans une dernière partie, une attention particulière sera tout d'abord portée sur les stratégies de lutte actuellement développées contre *Penicillium expansum.* Quelques méthodes issues du bio-contrôle appliquées sur *Penicillium expansum* seront présentés, puis l'utilisation de la lumière comme réponse à la diminution de l'utilisation de produits chimique sera introduite. Les résultats obtenus dans le contrôle par la lumière de l'infection des pommes par *Penicillium expansum* seront comparés à d'autres études réalisées sur d'autres espèces fongiques infectant d'autres denrées.

Il est important de préciser que certains points de discussion déjà abordés lors de la rédaction des articles ne seront pas repris dans cette partie.

Les conséquences sanitaires et économiques liées à la contamination des aliments par les mycotoxines ont motivé les nombreuses études qui visent à comprendre les mécanismes moléculaires mis en place par les champignons filamenteux pour produire des mycotoxines. En effet, la production de métabolites secondaires par les moisissures peut être très variable et dépend de plusieurs paramètres biotiques et abiotiques. La compréhension la plus complète de ces mécanismes est nécessaire pour développer des stratégies de lutte pertinentes contre ces contaminants.

Parmi les mycotoxines les plus préoccupantes, la patuline majoritairement produite par *Penicillium expansum,* contamine les pommes pendant le stockage. Etant donné sa grande stabilité aux différents traitements technologiques, la patuline peut ensuite être retrouvée dans tous les produits issus de la transformation de cette matière première.

Les études biochimiques et moléculaires menées depuis plusieurs années ont permis l'identification de la majorité des étapes de la voie de biosynthèse de la patuline ainsi que l'identification complète du cluster de gènes chez *Aspergillus clavatus*. Certains gènes du cluster et les enzymes pour lesquelles ils codent, ont été identifiés.

Au cours de cette thèse nous avons souhaité aborder la problématique liée à la contamination des pommes par la patuline à la fois d'un point de vue fondamental mais aussi en développant une recherche appliquée dont l'objectif est d'aboutir à proposer des mesures de lutte contre ce contaminant.

Pour cela, nous nous sommes attachés à caractériser le cluster de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la patuline chez *Penicillium expansum* mais aussi à caractériser de façon précise la seconde étape de cette voie chez *Aspergillus clavatus*, autre organisme producteur de patuline. En parallèle, nous nous sommes attachés à caractériser l'impact de paramètres abiotiques sur la synthèse de la toxine, paramètres qui pourraient être contrôlés et permettre de maîtriser la production de patuline par *Penicillium expansum* au cours du stockage des pommes.

D'un point de vue biochimique, la plus grande partie de la voie de biosynthèse de la patuline a été élucidée chez *Penicillium griseofulvum* dans les années 1960-1970, époque où cet organisme était nommé *Penicillium urticae* ou *Penicillium patulum*. D'un point de vue moléculaire, le cluster de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la patuline a été isolé chez *Aspergillus clavatus* (Artigot et al. 2009). Parmi les 15 gènes le composant, seulement 4 étaient préalablement identifiés (*patH, patI, patK* et *patN)* chez *Penicillium griseofulvum*, *Byssochlamys nivea* ou *Aspergillus clavatus.* Par contre, chez *Penicillium expansum*, l'espèce la plus préoccupante d'un point de vue économique et sanitaire, seules trois études décrivent

partiellement ou totalement les séquences des gènes *patK, patM* et *patN* codant respectivement pour l'acide 6-méthylsalicylique synthase, un ABC transporteur et l'isoépoxydon deshydrogénase (White et al. 2006; Dombrink-Kurtzman 2007; Sanzani et al. 2012). A ce jour, la fonction du transporteur n'a pas encore été identifiée.

L'intérêt du séquençage des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des mycotoxines réside dans le développement potentiel de méthodes de détection rapide et spécifique des espèces productrices.

D'une manière générale, les gènes codant pour les enzymes impliquées dans des voies de biosynthèse sont regroupés sous forme de cluster (Keller and Hohn 1997). Cette organisation sous forme de cluster a pour avantage d'identifier assez rapidement l'ensemble des gènes impliqués dans des voies de biosynthèse et de développer des méthodes de détection basées sur les séquences de ces gènes.

Les premiers travaux de cette thèse ont porté sur l'élucidation du cluster de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la patuline chez *Penicillium expansum*.

La difficulté de ce travail résidait dans l'absence de séquences de *Penicillium expansum* disponibles dans les bases de données. L'utilisation des séquences orthologues dans les génomes d'*Aspergillus clavatus, Penicillium griseofulvum* et *Penicillium chrysogenum* a largement aiguillée nos recherches. La publication du génome de *Penicillium digitatum*, contaminant naturel des agrumes, a aussi permis au cours de ces travaux d'isoler et de séquencer des gènes du cluster de la voie de biosynthèse de la patuline chez *Penicillium expansum* absents chez *Penicillium chrysogenum* (Marcet-Houben et al. 2012). Le séquençage, l'annotation complète de ce cluster et la mise à disposition des séquences dans les banques de données ouvrent un large champ d'études touchant aussi bien le domaine de la recherche fondamentale (compréhension des mécanismes de production, de régulation...) que la recherche appliquée (développement de stratégies de détection et/ou de lutte contre les champignons producteurs de patuline).

EVOLUTION DU CLUSTER DE LA PATULINE

L'analyse des clusters de gènes est un véritable outil dans l'étude de l'évolution des espèces fongiques. En effet, plusieurs espèces fongiques différentes peuvent produire la même mycotoxine. Cela sous-entend que ces différentes espèces présentent le même cluster de gènes. Toutefois, l'organisation interne de ces clusters peut varier en fonction des espèces.
L'exemple de l'aflatoxine peut en témoigner. *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus,* tous deux producteurs d'aflatoxine, présentent le même cluster mais avec une organisation des gènes un peu différente. *Aspergillus nidulans* présente la plupart des gènes de ce cluster conduisant non pas à la synthèse d'aflatoxine mais la stérigmatocystine, l'avant-dernier précurseur de l'aflatoxine (Keller and Adams 1995). Par conséquent, l'analyse fine de ces clusters de gènes dans différentes espèces peut permettre de comprendre l'évolution d'une espèce à l'autre et les spécificités physiologiques qui en découlent.

En ce qui concerne la patuline, *Penicillium expansum* partage avec *Aspergillus clavatus,* autre producteur de patuline, l'ensemble des gènes du cluster. Néanmoins, les différences observées s'articulent autour de trois îlots de gènes dans lesquels l'organisation et l'orientation des gènes sont conservées. Chez *Penicillium griseofulvum* et *Byssochlamys nivea,* producteurs de patuline, quelques gènes impliqués dans la production de patuline ont été identifiés. Finalement, il est communément admis qu'il existe des espèces productrices de patuline dans seulement trois genres différents de la famille des *Trichocomaceae : Aspergillus, Penicillium* et *Byssochlamys.*

D'autres espèces, non productrices, présentent un « cluster fossile » composé de quelques gènes présents chez *Aspergillus clavatus* et *Penicilium expansum.* C'est le cas de *Penicillium chrysogenum* qui présente sept gènes du cluster de la voie de biosynthèse de la patuline. Les gènes présents chez *Penicillium chrysogenum* sont organisés et orientés de la même façon que chez *Penicillium expansum*. *Penicillium digitatum*, pathogène des agrumes et phylogénétiquement proche de *Penicillium expansum*, présente dix gènes du cluster spécifique de la voie de biosynthèse de la patuline sur deux "scaffold" différents (Marcet-Houben et al. 2012). Dans ce cas, les gènes sont organisés et orientés de façon opposée par rapport à *Penicillium expansum* et il semblerait qu'une translocation des huit gènes se situant entre *patH* et *patK* ait eu lieu, les cinq autres ayant été perdus chez *Penicillium digitatum*. *Aspergillus terreus*, champignon tellurique, présente quatre gènes du cluster spécifique de la voie de biosynthèse de la patuline homologues aux gènes *patK*, *patJ*, *patI* et *patL*. Chez cette dernière espèce, le cluster contenant ces quatre gènes était suspecté d'être impliqué dans la synthèse de l'acide térréique, un composé structuralement proche de la phyllostine, un précurseur de la patuline (Puel et al. 2010; Boruta and Bizukojc 2014). Dans une étude tout juste publiée, des mutants pour chacun des gènes potentiellement impliqués dans ce cluster ont été générés chez *Aspergillus terreus.*

L'absence d'acide térréique dans les extraits de culture de ces mutants confirme l'hypothèse précédente (Guo et al. 2014).

Très récemment, le génome de *Penicillium roqueforti* a été séquencé et publié (Cheeseman et al. 2014). Cette espèce est très intéressante puisque cette dernière est incapable de synthétiser de la patuline tandis que les deux espèces phylogénétiquement les plus proches, *Penicillium carneum* et *Penicillium paneum* produisent cette toxine. L'analyse du cluster chez *Penicillium roqueforti* montre que chez cette espèce, l'architecture du cluster est identique qu'à celle de *Penicillium expansum*. Les gènes sont organisés dans le même ordre et avec la même orientation. Cette espèce présente une délétion de la région *patE-patF* conduisant à la disparition complète de la séquence codante pour *patF* et la synthèse éventuelle d'une protéine PATE tronquée à ses deux tiers, la partie N-terminale manquant. De même une seconde délétion est survenue, ayant pour conséquence la disparition totale du gène *patB*. L'ensemble de ces anomalies pourrait expliquer pourquoi cette espèce utilisée dans l'industrie fromagère ne produit pas de patuline.

La Figure 1 représente le cluster des gènes de la voie de biosynthèse de la patuline chez *Penicillium expansum* en comparaison avec les espèces fongiques décrites précédemment.

Comme illustré sur la figure, deux autres espèces fongiques éloignées de *Penicillium expansum* présentent quelques gènes homologues à ceux de la voie de biosynthèse de la patuline. Il s'agit de *Macrophomina phaseolina,* phytopathogène qui provoque des symptômes de pourriture charbonneuse chez de nombreuses espèces de plantes et de *Stachybotrys chlorohalonata,* champignon cellulolytique retrouvé dans les végétaux en cours de décomposition.

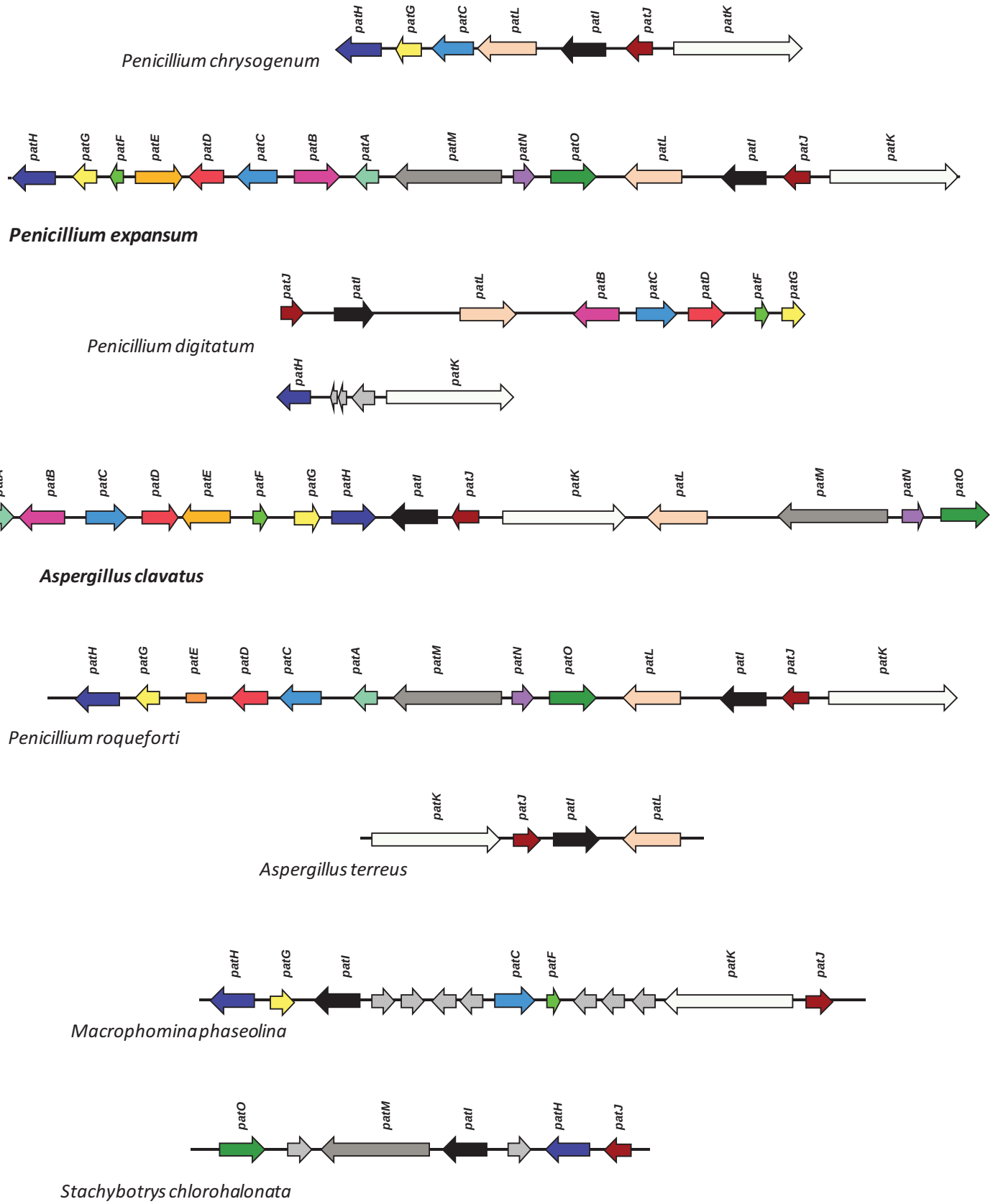


Figure 1 : Représentation schématique du cluster de la voie de biosynthèse de la patuline chez *Penicillium expansum* et comparaison de l'organisation des gènes avec d'autres espèces fongiques. Les espèces productrices sont notées en gras et les gènes hachurés n'appartiennent pas au cluster de la voie de biosynthèse de la patuline.

La conservation de l'organisation et de l'orientation des gènes entre les différentes espèces productrices et non productrices de patuline témoigne de l'évolution des différentes espèces. Les différences observées entre espèces proches et éloignées peuvent être la résultante de transfert horizontal de gènes aux cours de l'évolution.

Le transfert horizontal de gènes, processus par lequel un organisme intègre du matériel génétique provenant d'un autre organisme sans en être le descendant, pourrait expliquer la présence des clusters de gènes. Des analyses comparatives de génomes fongiques ont démontré l'importance du rôle du transfert horizontal de gènes dans l'évolution des champignons filamenteux. Actuellement, seules quelques études décrivent le transfert horizontal de gènes chez les espèces fongiques. Par exemple, Slot et Rokas (2011) ont récemment démontré le transfert d'une région de 57 kb contenant 23 gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la stérigmatocystine d'*Aspergillus nidulans* vers un autre ascomycète, *Podospora anserina.* D'autres exemples de transfert ont été décrits et sont regroupés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Exemples de transfert horizontaux de gènes, d'après Fitzpatrick (2012).

Receveur	Donneur	Chromosome/Gène	Références
Nectria haematococca	*Fusarium oxyporum*	Cluster de gènes de pathogénicité	(Temporini and VanEtten 2004)
Podospora anserina	*Aspergillus nidulans*	Cluster stérigmatocystine	(Slot and Rokas 2011)
Aspergillus clavatus	*Magnaporthe grisea*	Cluster cytochalasines	(Khaldi et al. 2008)
Aspergillus niger	*Fusarium verticillioides*	Cluster fumonisine	(Khaldi and Wolfe 2011)

D'un point de vue plus appliqué, la mise à disposition des séquences des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des mycotoxines ouvre un large champ d'applications possibles dans le domaine du diagnostic. En effet, dans la perspective éventuelle d'un développement d'une méthode de détection par PCR des espèces productrices, l'identification des gènes impliqués est un préalable indispensable. Ensuite le choix du gène cible est aussi crucial pour l'efficacité du test. La logique voudrait que l'on choisisse un gène codant pour une enzyme très spécifique de la voie de biosynthèse de la patuline. Cependant, le choix du gène dépend aussi de la richesse des bases de données telles que GenBank, banques qui à l'heure actuelle ne regroupent qu'une infime partie des gènes impliqués dans ce type de voie métabolique (une goutte d'eau au regard de la diversité du vivant).

Le Tableau 2 représente les résultats obtenus lors d'une analyse par BLAST de chacune des séquences nucléiques du cluster de la voie de biosynthèse de la patuline. D'après cette analyse les gènes *patE* et *patF* seraient éligibles. Bien que le rôle de *patF* ne soit pas encore identifié, ce gène semble être un candidat idéal comme cible de test de diagnostic. En effet, une analyse BLAST révèle un nombre limité de séquences homologues (78 séquences chez 57 espèces), essentiellement d'origine bactérienne. Seulement une dizaine est d'origine fongique. De même, il est intéressant de relever que le gène *patF* est absent du génome de *Penicillium roqueforti* expliquant entre autres pourquoi ce champignon utilisé dans l'industrie fromagère ne produit pas de patuline. Le gène *patN* semble aussi être un bon candidat. D'après l'analyse BLAST, la majorité des séquences qui présentent les plus hauts scores correspondent majoritairement à des espèces productrices de patuline.

D'ailleurs, les méthodes PCR qui sont actuellement développées utilisent ce gène comme gène cible (Paterson 2004).

Par conséquent, l'élucidation du cluster de la voie de biosynthèse de la patuline chez *Penicillium expansum* ouvre un large champ de perspectives dans le domaine du diagnostic.

Tableau 2 : Analyse BLAST des séquences des gènes du cluster de la voie de biosynthèse de la patuline

En gras sont présentées les espèces productrices de patuline.

Gène	Organisme	Identité	Gène	Organisme	Identité
patA	***P. griseofulvum***	**81 %**	***patI***	*P. roqueforti*	85 %
	P. roqueforti	80 %		*P. camemberti*	83 %
	A. clavatus	**67 %**		*P. chrysogenum*	83 %
				P. digitatum	83 %
				P. griseofulvum	**81 %**
				A. clavatus	**77 %**
patB	***P. griseofulvum***	**82 %**	***patJ***	*P. roqueforti*	86 %
	P. digitatum	80 %		*P. chrysogenum*	84 %
	A. clavatus	**69 %**		*P. digitatum*	83 %
	P. chrysogenum	60 %		***A. clavatus***	**80 %**
	A. oryzae	60 %			
	A. flavus	60 %			
patC	*P. camemberti*	88 %	***patK***	*P. roqueforti*	88 %
	P. griseofulvum	**86 %**		*P. chrysogenum*	87 %
	P. roqueforti	85 %		***P. griseofulvum***	**86 %**
	P. digitatum	84 %		***A. clavatus***	**73 %**
	P. chrysogenum	77 %		***B. nivea***	**69 %**
	A. clavatus	**76 %**			
patD	*P. camemberti*	84 %	***patL***	*P. camemberti*	90 %
	P. roqueforti	79 %		*P. digitatum*	89 %
	P. digitatum	78 %		*P. roqueforti*	88 %
	A. clavatus	**70 %**		*P. chrysogenum*	84 %
	P. paxilli	69 %		***P. griseofulvum***	**84 %**
				A. clavatus	**71 %**
patE	***A. clavatus***	**73 %**	***patM***	*P. camemberti*	87 %
	A. niger	63 %		***P. griseofulvum***	**85 %**
				P. roqueforti	84 %
				P. chrysogenum	72 %
				A. clavatus	**62 %**
patF	*P. digitatum*	85 %	***patN***	*P. camemberti*	88 %
	A. clavatus	**74 %**		*P. roqueforti*	88 %
	P. chrysogenum	72 %		***P. vulpinum***	**88 %**
				P. sclerotigenum	**88 %**
				P. carneum	**87 %**
				P. concentricum	**87 %**
patG	*P. camemberti*	87 %	***patO***	*P. roqueforti*	81 %
	P. digitatum	84 %		***P. griseofulvum***	**80 %**
	P. chrysogenum	83 %		*P. digitatum*	80 %
	P. roqueforti	83 %		***A. clavatus***	**67 %**
	A. clavatus	**72 %**			
	A. oryzae	61 %			
patH	*P. roqueforti*	87 %			
	P. camemberti	86 %			
	P. chrysogenum	86 %			
	P. digitatum	82 %			
	A. clavatus	**75 %**			

HYPOTHESES SUR LA FONCTION DES GENES, L'ORGANISATION SPACIALE ET LA COMPARTIMENTATION DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE DE LA PATULINE

Suite à ces premiers travaux et notamment à la caractérisation du cluster de gènes impliqué dans la voie de biosynthèse de la patuline, nous nous sommes intéressés à l'aspect régulation de la production de patuline par *Penicillium expansum*.

La caractérisation du gène *patL* chez *Penicillium expansum* permet de valider l'implication de chacun des gènes du cluster dans la voie de biosynthèse de la patuline. En effet, tous les gènes qui répondent au facteur de régulation spécifique d'un cluster font partie de ce même cluster. L'inactivation de ce facteur de transcription conduit à une extinction totale de l'expression des gènes appartenant au cluster accompagné d'une absence de production de patuline. Afin de valider les bordes de ce cluster, une étude complémentaire, non présentée dans cette thèse, a été conduite chez *Aspergillus clavatus*. Une analyse par SMURF (Khaldi et al. 2010) du gènome d'*Aspergillus clavatus* a permis d'identifier le premier (*patA*) et le dernier (*patO*) gène du cluster. En conséquence, tous les gènes se situant entre ces deux gènes appartiennent au cluster de la voie de biosynthèse de la patuline. Dans le but de valider cette analyse *in silico*, l'invalidation du gène *patL* chez *Aspergillus clavatus* a été réalisée (souche AcΔ*patL*) puis l'expression de tous les gènes du cluster ainsi que ceux se situant aux bornes droite et gauche a été analysé. Chez cette souche mutante, tous les gènes se localisant entre *patA* et *patO* ont leur expression complètement éteinte alors que les gènes se trouvant respectivement à gauche de *patA* et à droite de *patO* s'expriment toujours, indiquant ainsi leur non-appartenance au cluster de la voie de biosynthèse de la patuline (Figure 2). Suite à cette expérimentation, les bornes du cluster sont clairement identifiées ainsi que le nombre de gènes le composant. Le même travail à été réalisé chez *Penicillium expansum* confirmant que le cluster de la voie de biosynthèse de la patuline est composé de 15 gènes.

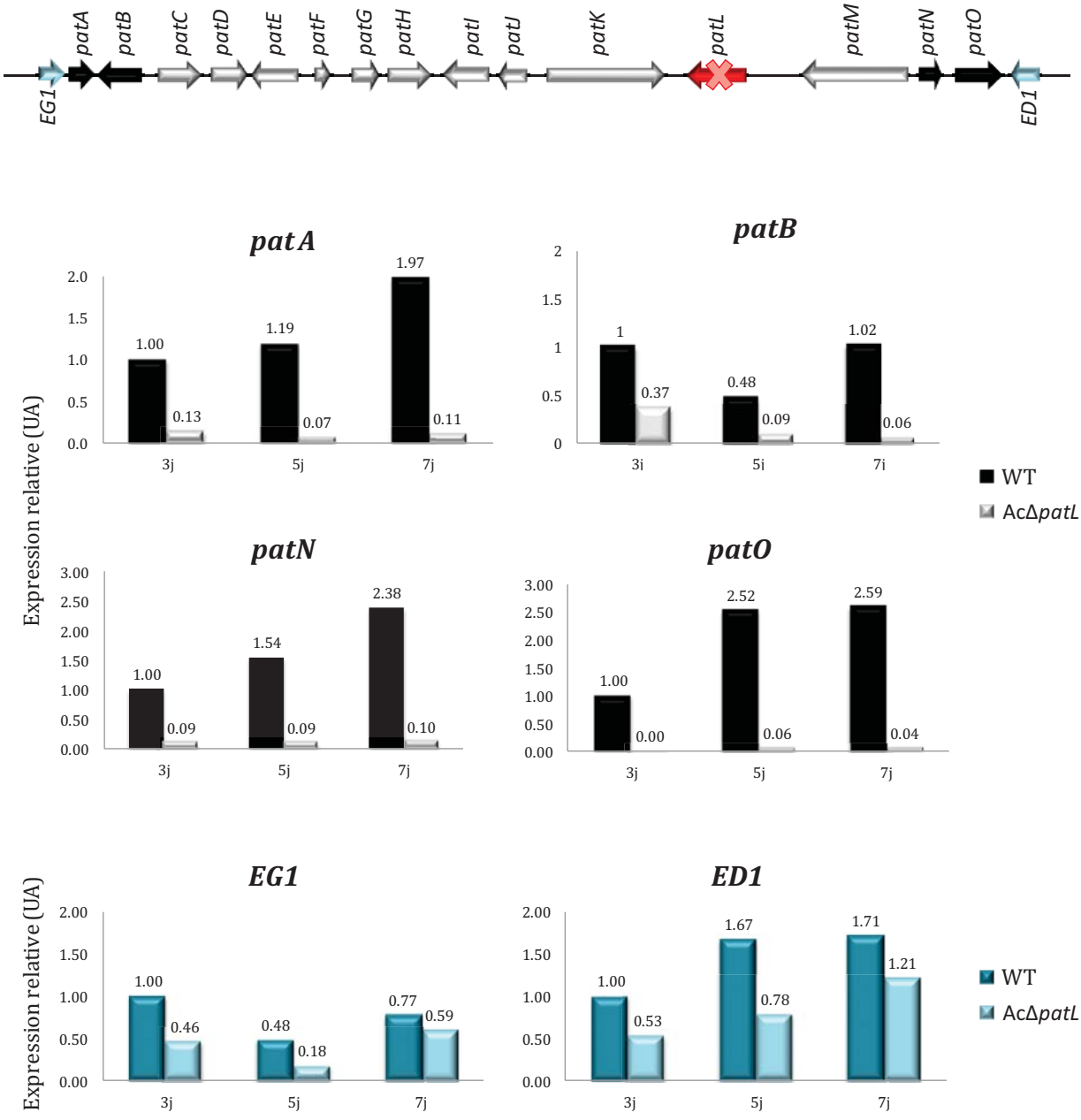


Figure 2 : Analyse de l'expression des gènes aux bornes du cluster de la voie de biosynthèse de la patuline chez *Aspergillus clavatus*

Les gènes *patA* et *patB* de l'extrémité gauche ainsi que les gènes *patN* et *patO* de l'extrémité droite ont leur expression très fortement diminuée chez la souche mutante pour le gène *patL* d'*Aspergillus clavatus* (AcΔ*patL*). Les expressions des gènes *EG1* (extrémité gauche) et *ED1* (extrémité droite) ne sont pas ou très peu impactées par le mutation du gène *patL* indiquant ainsi qu'ils n'appartiennent pas au cluster.

Dans de cette thèse nous avons également élucidé la seconde étape de la voie de biosynthèse de la patuline. Cette seconde étape est réalisée par l'acide 6-méthylsalicylique décarboxylase qui catalyse la décarboxylation de l'acide 6-méthylsalicylique en *m*-crésol. Ces travaux complètent des études bien antérieures menées dans les années 1960-1970, qui avaient mis en évidence la conversion du *m*-crésol en patuline (Scott and Yalpani 1967) et permis l'isolation et la purification de cette enzyme (Light 1969). Cette dernière est très spécifique de l'acide 6-méthylsalicylique comme cela a été démontré par les résultats négatifs des expériences de bioconversions réalisées sur des substrats présentant des structures similaires. L'analyse de la séquence protéique par BLAST révèle sans surprise une forte homologie avec des protéines de la même famille chez *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium roqueforti* mais aussi avec YANB impliquée dans la synthèse de la yanuthone D chez *Aspergillus niger* (Holm et al. 2014). Les autres séquences identifiées par le logiciel ne présentent pas d'homologie significative indiquant ainsi la spécificité de cette enzyme. Néanmoins, une autre façon de décarboxyler l'acide 6-méthylsalicylique est décrite dans la voie de biosynthèse de l'acide térréique chez *Aspergillus terreus*. L'acide 6-méthylsalicylique est pris en charge par une enzyme qui présente 30 % d'homologie avec une salicylate 1-monooxygenase d'*Aspergillus nidulans*. Cette enzyme catalyse la décarboxylation/hydroxylation de l'acide 6-méthylsalicylique en 3-méthylcatechol et non en *m*-crésol (Guo et al. 2014). Grâce à ces travaux les quatre premières étapes de la voie de biosynthèse sont désormais connues. A partir d'acétyl-CoA et de trois unités de malonyl-CoA, l'acide 6-méthylsalicylique synthase forme l'acide 6-méthylsalicylique. Cet acide est ensuite converti en *m*-crésol par l'acide 6-méthylsalicylique décarboxylase. Le *m*-crésol formé est transformé en *m*-hydroxybenzylalcool puis en gentisyl alcool par l'action d'une *m*-crésol hydroxylase puis d'une *m*-hydroxybenzyl alcool hydroxylase.

La mise à disposition des séquences des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la patuline facilite désormais la caractérisation des enzymes codées par ces gènes. L'élucidation du rôle de chacune de ces enzymes via la création de mutants ou par expression hétérologue chez la levure peut maintenant être envisagée. De même, l'analyse de chacune des séquences des gènes du cluster lèvera un peu plus le voile sur le déroulement de la voie de biosynthèse de la patuline au sein des cellules.

Actuellement, le déroulement spatial de la biosynthèse de la patuline au sein des cellules fongiques n'est pas connu mais l'analyse des séquences protéiques grâce à des logiciels de prédiction tels que TMpred et SignalP peut révéler quelques indices. TMpred permet de prédire la présence de domaines transmembranaires ainsi que leur orientation à partir d'une séquence protéique (Hofmann and Stoffel 1993) alors que SignalP permet de rechercher la présence de signal peptide dans une séquence protéique (Petersen et al. 2011).

Sur la base de ces analyses, l'hypothèse que les dernières étapes de la voie de biosynthèse se déroulent dans des vésicules ou hors de l'organisme producteur prend tout son sens. L'excrétion des intermédiaires et de la mycotoxine pourrait être un moyen d'autoprotection des espèces fongiques productrices face à leur propre métabolisme secondaire. Cette hypothèse est soutenue par la présence de deux gènes dans le cluster codant pour deux types de transporteurs membranaires. Les gènes *patC* et *patM* présentent respectivement des domaines conservés, retrouvés dans la famille des MFS transporteurs (Major Facilitator Superfamily) et la famille des ABC transporteurs (ATP Binding Cassette). L'utilisation de ces transporteurs par les espèces fongiques n'est pas très claire et peu étudiée.

Dans le cluster des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des aflatoxines, le gène *aflT* code pour un transporteur de type MFS (Chang et al. 2004). La délétion de ce gène chez *Aspergillus parasiticus* n'empêche pas la synthèse ou l'excrétion d'aflatoxine B1. Il semblerait qu'un autre type de transport pourrait prendre le relais et compenser la fonction de AFLT (Chang et al. 2004). Dans une autre étude, chez *Fusarium sporotrichioides*, la délétion du gène *tri12* provoque une réduction de la croissance sur milieu complexe et une diminution de la production de trichothécènes. Sur un milieu de culture enrichi en trichothécènes, la croissance des mutants Δ*tri12* est inhibée suggérant ainsi que TRI12 joue un rôle dans l'autoprotection de *Fusarium sporotrichioides* face à sa propre production de métabolites secondaires (Alexander et al. 1999). Chez *Aspergillus terreus*, la délétion du gène *atB,* codant pour un transporteur de type MFS, diminue très fortement la production d'acide térréique (Guo et al. 2014).

Pour l'utilisation des ABC transporteurs, nous pouvons citer l'exemple de celui localisé dans le cluster des gènes de la voie de biosynthèse de la sirodesmine chez le phytopathogène *Leptosphaeria maculans* (Gardiner et al. 2005). La mutation du gène *sirA,* codant pour un ABC transporteur, augmente considérablement la sensibilité de cette espèce fongique à la sirodesmine mais aussi à la gliotoxine, une toxine structuralement proche produite par *Aspergillus fumigatus.*

Avec les travaux sur les aflatoxines, il est maintenant connu qu'une des caractéristiques du métabolisme secondaire est que les enzymes, les intermédiaires et les produits finaux des voies de biosynthèses peuvent être localisés dans des organites tels que les vacuoles, les vésicules ou les péroxisomes. La distribution spatiale des enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse requiert la translocation de ces protéines et de leur substrat d'un endroit à un autre. Ce phénomène est couramment appelé le trafic moléculaire. D'après le modèle de la voie de biosynthèse de l'aflatoxine, la première étape se déroulerait dans les péroxisomes où l'acetyl CoA est formé (Chanda et al. 2009). Celle-ci implique comme pour la patuline, l'action d'une polycétide synthase. L'acétate présent dans le cytoplasme est donc transporté dans le

péroxisome afin de permettre la formation d'acétyl-CoA. Sans rentrer dans le détail, les autres étapes de la voie de biosynthèse de l'aflatoxine se déroulent dans des vésicules issues des péroxisomes et des mitochondries qui vont fusionner avec des vacuoles de transport et des vésicules de sécrétion afin de développer les aflatoxisomes (Roze et al. 2011). Dans les vésicules de sécrétion se trouvent les protéines qui présentent un peptide signal. Parmi les gènes du cluster de la voie de biosynthèse de l'aflatoxine seul le gène *aflK* présente un peptide signal et code donc pour une enzyme se localisant au niveau des vésicules de sécrétion de l'appareil de Golgi ou du réticulum endoplasmique.

En comparaison à ce modèle, avec l'analyse de la présence de domaines transmembranaires et la recherche de peptide signaux, nous pouvons imaginer un système de compartimentation de la voie de biosynthèse de la patuline. L'analyse de la séquence protéique du gène *patA,* codant pour un transporteur d'acétate, met en évidence la présence de 5 domaines transmembranaires suggérant ainsi la localisation du transporteur à une membrane. La formation d'acétyl-CoA se localisant dans les mitochondries et dans les péroxisomes, il est tout à fait logique de penser que ce transporteur se trouve au niveau de la membrane des péroxisomes et/ou des mitochondries. L'acétate présent dans le cytoplasme est puisé afin de permettre la formation d'acétyl-CoA qui est ensuite relargué dans le cytoplasme afin de permettre la suite de la voie de biosynthèse. Les deux autres gènes *patC* et *patM* codant tous les deux pour des transporteurs, respectivement de la famille des MFS transporteurs et des ABC transporteurs.
Actuellement, aucune étude ne décrit le rôle de ces transporteurs dans les cellules fongiques mais l'analyse des séquences protéiques via le logiciel TMprep nous permet de soupçonner une localisation membranaire. Cette localisation membranaire peut aussi bien être au niveau du péroxisome, des vésicules, de la vacuole ou encore de la membrane cellulaire afin de permettre l'excrétion de la patuline. A ce jour, sans étude précise, la fonction de ces transporteurs ne peut être élucidée.
Parmi les autres gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la patuline, seules les enzymes codées par les gènes *patB*, *pat E*, *patF patO*, présentent un peptide signal dans leurs séquences protéiques. Les étapes catalysées par ces enzymes se passeraient donc dans des vésicules issues de l'appareil de Golgi ou du réticulum endoplasmique.
Dans une étude bien antérieure, la néopatuline synthase impliquée dans la conversion de la phyllostine en néopatuline a été purifiée. De plus, la partie N-terminale de la protéine a été séquencée. L'alignement de ce morceau de séquence avec les séquences protéiques des gènes du cluster révéle une forte homologie avec la partie N-terminale de la protéine codée par le gène *patF* (Fedeshko 1992). La Figure 3 présente cet alignement. Il est à noté que le site de clivage du signal peptide prédit par SignalP précède le premier acide aminé déterminé par Fedeshko.

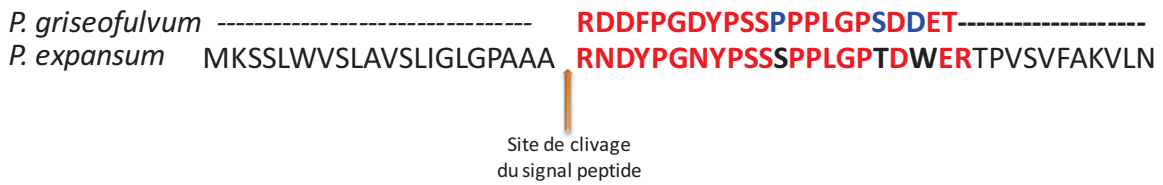


Figure 3 : Alignement de la partie N-terminale de la néopatuline synthase de *Penicillium griseofulvum* avec l'enzyme codée par le gène patF chez *Penicillium expansum*.

Enfin, une étude actuellement réalisée au sein de notre groupe nous permet d'affirmer que le gène *patE* code pour l'enzyme qui catalyse la conversion de l'ascladiol en patuline.

De plus, dans la structure chimique de la patuline, la lactone responsable de la toxicité apparaît lors de la conversion de la phyllostine en néopatuline. Sur la base de ces dernières informations, il semble logique d'affirmer que ce sont les dernières étapes de la voie de biosynthèse qui se déroulent dans les vésicules afin que le champignon soit protégé de la toxicité de son propre métabolite secondaire.

La Figure 4 présente un schéma hypothétique de l'organisation spatiale de la voie de biosynthèse de la patuline dans les cellules fongiques. Ce schéma hypothétique est basé sur le fonctionnement spatial de la voie de biosynthèse de l'aflatoxine et sur les informations relatives à la voie de biosynthèse de la patuline citées précédemment.

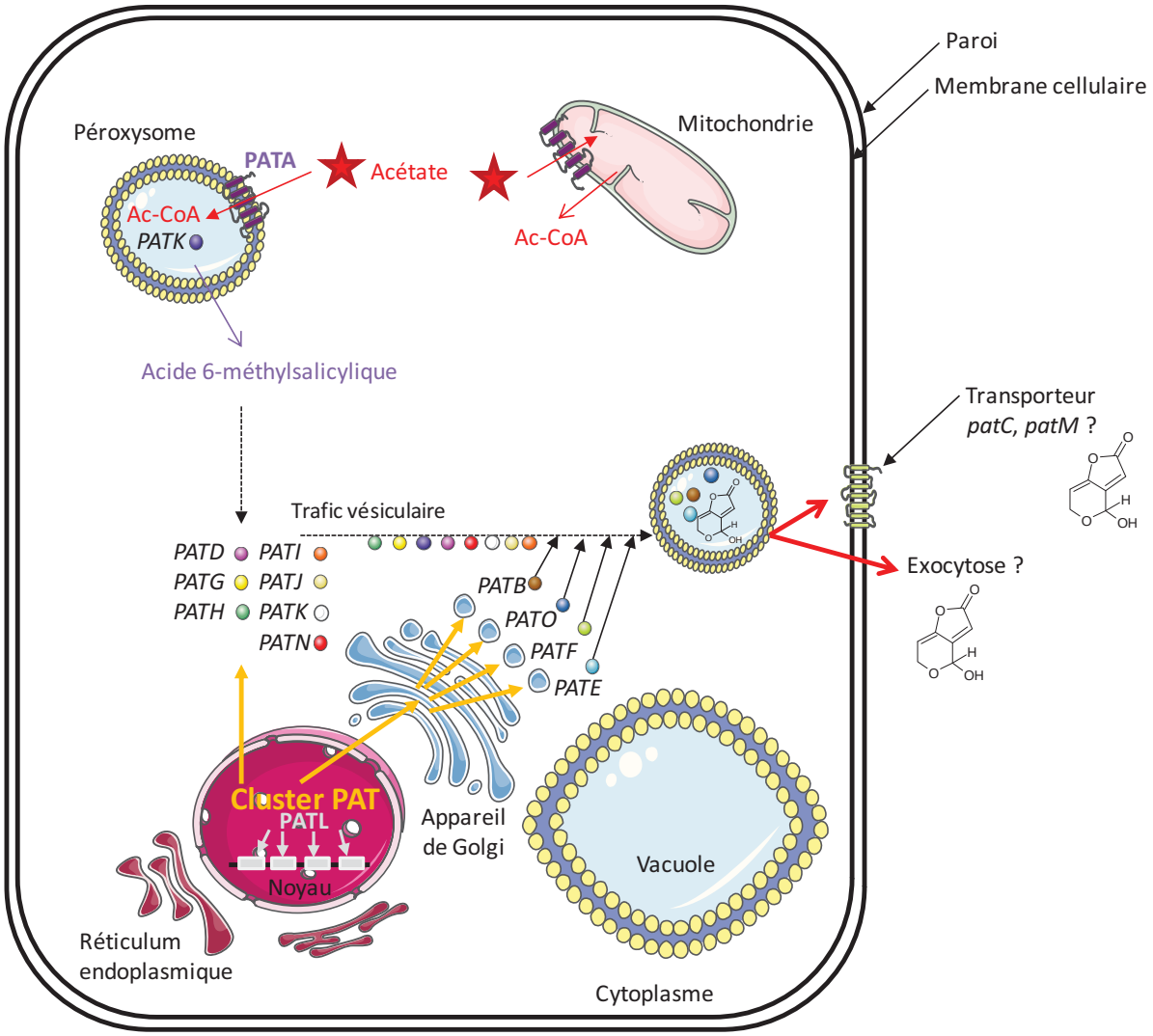


Figure 4 : Schéma hypothétique de l'organisation spatiale de la voie de biosynthèse de la patuline au sein de la cellule fongique.
L'acétate présent dans la cellule est pris en charge par le transporteur d'acétate PATA présent à la membrane du péroxisome puis est transformé en acétyl-CoA à l'intérieur de celui-ci. L'acide 6-méthylsalicylique synthase prend en charge l'acétyl-CoA afin de synthétiser l'acide 6-méthylsalicylique qui est ensuite relargué dans le cytoplasme. Il est pris en charge par les autres enzymes de la voie de biosynthèse de la patuline. Les enzymes ne présentant pas de peptide signal sont certainement localisées dans le cytoplasme et exercent leur activité dans ce dernier. Les dernières étapes de la synthèse de la patuline semblent être réalisées dans des vésicules et par des enzymes qui présentent un peptide signal (PATB, PATO, PATF et PATE). La patuline est ensuite excrétée dans le milieu extérieur.

HYPOTHESE DE L'INTERCONNEXION DES VOIES DE BIOSYNTHESES DE LA PATULINE ET DE LA CITRININE

Chez *Penicillium expansum*, les extraits de culture de la souche mutante pour le gène *patL* présentent de la citrinine, autre mycotoxine produite par cette espèce fongique. La souche sauvage productrice de patuline ne présentant pas de citrinine dans ces extraits de culture, il est possible que les voies de biosynthèses de la patuline et de la citrinine soient interconnectées.

Actuellement, peu d'étude décrit une interconnexion entre deux voies de biosynthèse de mycotoxines. Cependant, plusieurs études issues du même groupe de recherche, décrivent une connexion entre les voies de biosynthèses de la citrinine et de l'ochratoxine chez *Penicillium verrucosum.* En fonction des conditions de culture, *Penicillium verrucosum* est capable d'orienter son métabolisme secondaire vers la production d'une mycotoxine au dépend de la seconde. Une forte concentration en NaCl favorise la production d'ochratoxine au détriment de la production de citrinine (Schmidt-Heydt et al. 2012b). A l'inverse, *Penicillium verrucosum* peut orienter son métabolisme secondaire vers la production de citrinine en présence de conditions de culture qui lui imposent un stress oxydatif. Par exemple, ce stress oxydatif est induit lorsqu'il est exposé à la lumière et plus particulièrement à la lumière bleue (Schmidt-Heydt et al. 2011; Stoll et al. 2014) ou encore lorsqu'il est mis en culture sur un milieu riche en Cu^{2+} (Schmidt-Heydt et al. 2014). Cette interconnexion entre les voies de biosynthèse de la citrinine et de l'ochratoxine a déjà été décrite par Larsen et al; (2001). Ces deux mycotoxines étant des polycétides, elles partagent le même précurseur, l'acétyl-CoA. Si une de ces deux mycotoxines est produite en très grande quantité, cela épuise le stock cellulaire d'acétyl-CoA et limite ainsi la production de l'autre mycotoxine.

Une autre étude décrit une interconnexion entre deux voies de biosynthèse de mycotoxines chez *Penicillium roqueforti* (Hidalgo et al. 2014). Les auteurs ont démontré que la production d'acide mycophénolique était fortement induite chez des souches de *Penicillium roqueforti* dont la voie de biosynthèse de la PR-toxine est éteinte par mutation. L'acide mycophénolique étant de la famille des polycétides alors que la PR-toxine dérive des sesquiterpènes, il est très probable que ces deux voies de biosynthèse ne soient pas liées. Les auteurs proposent alors l'hypothèse que la voie de biosynthèse de la PR-toxine régule la voie de biosynthèse de l'acide mycophénolique.

Dans notre étude, nous nous sommes aperçus que l'extinction de la voie de biosynthèse de la patuline par mutation du gène *patL* conduisait à une induction de production de citrinine dans certaines conditions de culture (milieu gélosé Czapeck). La citrinine et la patuline partageant le même précurseur, l'acétyl-CoA, il est très probable que ces deux voies de biosynthèse soient interconnectées.

Chez la souche sauvage, la patuline étant produite en très large quantité, il est possible que le stock cellulaire d'acétyl-CoA soit épuisé au détriment de la production de citrinine. Cela pourrait s'expliquer par une efficacité enzymatique bien plus élevée chez l'acide 6-méthylsalicylique synthase (première étape de la voie de biosynthèse de la patuline) que chez la polycétide synthase impliquée dans la voie de biosynthèse de la citrinine.

Afin de répondre à cette hypothèse, il serait intéressant de quantifier et de comparer l'expression des gènes codant pour chacune des polycétides synthase respectivement impliquées dans la première étape de chacune des voies de biosynthèse, chez les souches mutante et sauvage.

La mutation du gène *patL* conduit à l'extinction du gène *patA* qui code pour un transporteur d'acétate, certainement responsable de l'épuisement du stock cellulaire d'acétate chez la souche sauvage. Ce gène étant très peu exprimé chez la souche mutante, nous pouvons facilement imaginer que ce transporteur n'est pas présent et donc que l'acétate reste disponible pour la biosynthèse de citrinine.

L'hypothèse du transport de l'acétate dans le péroxysome pour la biosynthèse de la patuline le rendant indisponible pour la synthèse de citrinine est étayée par deux observations faites au niveau du cluster des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la citrinine chez *Monascus aurantiacus* (Li et al. 2012). La première, par analyse BLAST aucun gène ne présente d'homologie avec un transporteur d'acétate, indiquant ainsi que l'acétate utilisé pour la synthèse de l'acétyl-CoA ne serait pas acheminé dans un quelconque compartiment et serait localisé dans le cytoplasme. La seconde, dans ce même cluster, le gène *ctnI* semble coder pour une acétyl-CoA synthase. La séquence protéique issue de ce gène ne présente pas de peptide signal indiquant ainsi sa localisation au niveau du cytoplasme. En y regardant de plus près aucune enzyme codée par les gènes du cluster de la citrinine ne présente de peptide signal. Cette voie de biosynthèse semble donc se dérouler uniquement dans le cytoplasme.

Outre la caractérisation des protéines codées par les gènes des clusters et l'étude de leur implication au niveau moléculaire, la mise à disposition des séquences de tous les gènes d'un cluster facilite l'analyse des régions promotrices pour chacun des gènes. En l'occurrence, la recherche de sites de fixation de facteurs de transcription peut dévoiler des mécanismes de régulations non connus.

ANALYSE DES REGIONS PROMOTRICES DES GENES DU CLUSTER DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE DE LA PATULINE CHEZ PENICILLIUM EXPANSUM.

Chez *Penicillium expansum*, l'analyse des régions promotrices a révélé la présence de sites de fixation potentiels pour les facteurs de régulation suivant : AbaA, BrlA, PacC et NrfA.
AbaA et BrlA sont tous deux impliqués dans la sporulation. Cependant, seul le gène *patL* présente un site de fixation potentiel pour le facteur de transcription BrlA. Ce dernier contrôle le passage de la croissance apicale vers la formation de mycélium aérien conduisant à la formation des conidiophores (Adams et al. 1988). BrlA contrôle l'expression d'*AbaA* qui lui-même contrôle la différentiation des phialides. La présence de ces sites de fixation potentiels est en accord avec une étude précédente. Dans une étude ancienne, les mutants générés n'étaient plus capables de former des conidiophores et produisaient moins de patuline qu'une souche sauvage (Sekiguchi and Gaucher 1977). Actuellement, il n'est pas démontré que BrlA agit directement sur les voies de biosynthèse mais sa délétion chez *Aspergillus fumigatus* affecte la production de trypacidine (Gauthier et al. 2012) et de fumiquinazoline C (Lim et al. 2014). Néanmoins, chez les espèces productrices d'aflatoxine, BrlA est impliqué dans l'activité du promoteur du gène *pksA,* codant pour la polycétide synthase impliquée dans la première étape de la biosynthèse de cette mycotoxine (Ehrlich et al. 2002).

Cette même analyse a révélé la présence de sites de fixation pour le facteur de régulation PacC dans les régions promotrices des gènes *patA* et *patL* mais aussi dans les séquences codantes de plusieurs gènes avec une fréquence anormalement élevée. PacC est un facteur de transcription à doigt de zinc impliqué dans la réponse au pH. La forme active de PacC et sa localisation sont dépendantes du pH. En effet, à pH acide, PacC est sous sa forme inactive et se localise au niveau du cytoplasme. A l'inverse, à pH alcalin, PacC est sous sa forme active et se localise au niveau du noyau (Mingot et al. 2001). Plusieurs études ont démontré que le pH joue un rôle important dans la régulation des voies de biosynthèses des métabolites secondaires. Les connaissances actuelles concernent les productions de fumonisine (Keller et al. 1997b), de stérigmatocystine (Keller et al. 1997a) et des trichothécènes (Merhej et al. 2011) qui nécessitent un pH acide. Au contraire, la production de pénicilline par *Aspergillus nidulans* nécessite un pH alcalin (Espeso et al. 1993).
La présence de site de fixation pour PacC dans les régions promotrices et codantes de plusieurs gènes impliqués dans le voie de biosynthèse de la patuline suggère que la fixation de PacC engendrerait un encombrement empêchant ainsi la transcription des gènes à pH alcalin. L'acidification du milieu permettrait alors le passage de PacC sous sa forme inactive et de lever l'inhibition de la transcription dont il est responsable. De ce point de vue, PacC serait un régulateur négatif de la production de patuline chez *Penicillium expansum*.

Actuellement peu de donnée étayant l'hypothèse précédente existe sur les effets du pH sur la production de patuline. Néanmoins, une étude récente suggère l'implication de PacC dans la régulation de la voie de biosynthèse de la patuline chez *Penicillium expansum* (Barad et al. 2014). Dans cette étude un mutant pour le gène *pacC* généré via la méthode du RNAi présente une production de patuline plus faible que la souche sauvage. De ce point de vue, PacC serait un régulateur positif de la voie de biosynthèse de la patuline chez *Penicillium expansum*. Ceci allant à l'encontre de l'hypothèse présentée précédemment, l'implication de PacC dans la régulation de la voie de biosynthèse de la patuline devrait être clarifiée par la création d'un mutant exprimant de manière constitutive la forme active de PacC.

Des études antérieures à celle-ci mettent en relation l'acidité du milieu et la virulence de *Penicillium expansum* (Prusky et al. 2004; Hadas et al. 2007). En infectant expérimentalement plusieurs variétés de pommes présentant différents pH avec *Penicillium expansum*, le développement des lésions est inversement proportionnel au pH de départ. L'ajout d'acide gluconique ou d'acide citrique au point d'inoculation favorise le développement des lésions brunes chez les pommes de variété Fuji mais pas chez les pommes de variété Golden Delicious (Prusky et al. 2004).

Lors de la colonisation des pommes, *Penicillium expansum* produit et sécrète des acides organiques tels que l'acide gluconique, l'acide citrique, l'acide fumarique et l'acide oxalique. L'acide gluconique est l'acide organique majoritairement produit par *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium italicum* lors de la colonisation des fruits causant ainsi une diminution significative du pH.

Penicillium expansum et *Penicillium digitatum* ont développé un mécanisme parallèle à la production d'acide organique, impliquant la consommation de sel d'ammonium (NH_4^+) présent dans le tissu de la pomme. L'utilisation de l'ammonium comme source azotée conduit à l'excrétion de proton (H^+) acidifiant ainsi le milieu (Roos and Luckner 1984).

La diminution du pH est favorable à la production d'enzymes pectolytiques telles que les polygalacturonases (PGs). Considérées comme des facteurs de colonisation et de virulence, elles sont entre autres responsables de la macération des tissus (Marciano et al. 1983; Prusky et al. 1989; Miyara et al. 2008). La consommation de l'ammonium présent dans les tissus, peut induire la production de patuline par *Penicillium expansum*. En effet, une concentration élevée en composés azotés tels que les sels nitrates et ammonium, inhibe l'initiation de la production de patuline via le facteur de régulation NRFA (nitrogen regulatory factor protein) (Rollins and Gaucher 1994). Il n'est donc pas surprenant de trouver des sites de fixation pour ce facteur de régulation NRFA dans les régions promotrices de tous les gènes du cluster, exceptée la région promotrice du gène *patG*.

L'acide gluconique, produit à partir du glucose présent dans les fruits, s'accompagne d'une production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), impliqué dans le stress oxydatif.

Actuellement aucune donnée ne décrit l'implication de l' H_2O_2 dans la production patuline, mais, quelques études mettent en relation le stress oxydatif et la production de métabolites secondaires. La plupart de ces études concernent la biosynthèse des mycotoxines à l'exception d'une portant sur la production de la vitamine B_2 par *Ashbya gossypii* (Walther and Wendland 2012). La production d'aflatoxine chez *Aspergilllus parasiticus* (Jayashree and Subramanyam 2000; Reverberi et al. 2008), d'ochratoxine A par *Aspergillus ochraceus* (Reverberi et al. 2012) et de trichothécènes B par *Fusarium graminearum* (Ponts et al. 2006) est stimulée par le stress oxydatif. Dans cette dernière étude, l'ajout de péroxyde d'oxygène stimule la production de trichothécènes (Ponts et al. 2006).

Néanmoins, quelques études décrivent l'effet des espèces réactives à l'oxygène (ROS) sur la virulence de *Penicillium expansum.* Ces études s'accordent sur le fait que le peroxyde d'hydrogène produit aussi par l'hôte infecté est un mécanisme de défense visant à réduire la progression de *Penicillium expansum* (Torres et al. 2003; Cerioni et al. 2013; Buron-Moles et al. 2015)

Des études sur l'utilisation des levures comme agent de lutte contre *Penicillium expansum* lors du stockage des pommes permettent d'éclaircir le rôle des ROS lors de l'infection. Le point d'infection (blessure) se caractérise par la présence de ROS et la production d'enzymes telles que les peroxydases et lipoxygénase. La formation de ces ROS est nécessaire pour le renforcement de la paroi cellulaire afin de se protéger de l'infection par le pathogène. Cependant, un excès de ROS durant cette période peut favoriser l'infection fongique et la production de patuline (Tolaini et al. 2010). La co-infection de *Penicillium expansum* avec des levures (*Cryptococcus laurentii* et *Rhodoturula glutinis*) conduit à une diminution de la vitesse de colonisation des pommes. De part leur capacité à produire de forte concentration de superoxyde dismutase et de catalase, ces levures sont capables de se développer dans ce type d'environnement hostile (Castoria et al. 2003; Castoria et al. 2005).

L'implication des ROS et du stress oxydatif au sens large, sur la production de patuline pendant l'infection reste peu claire. Il est nécessaire de développer des expérimentations qui permettront de déterminer l'implication potentielle des ROS dans la production de patuline par *Penicillium expansum* lors de l'infection des pommes. Ces expérimentations devront être conduites *in vitro* et *in vivo*.

La Figure 5 présente un schéma hypothétique du mécanisme induit suite à l'infection des pommes par *Penicillium expansum* qui conduirait à la synthèse de patuline.

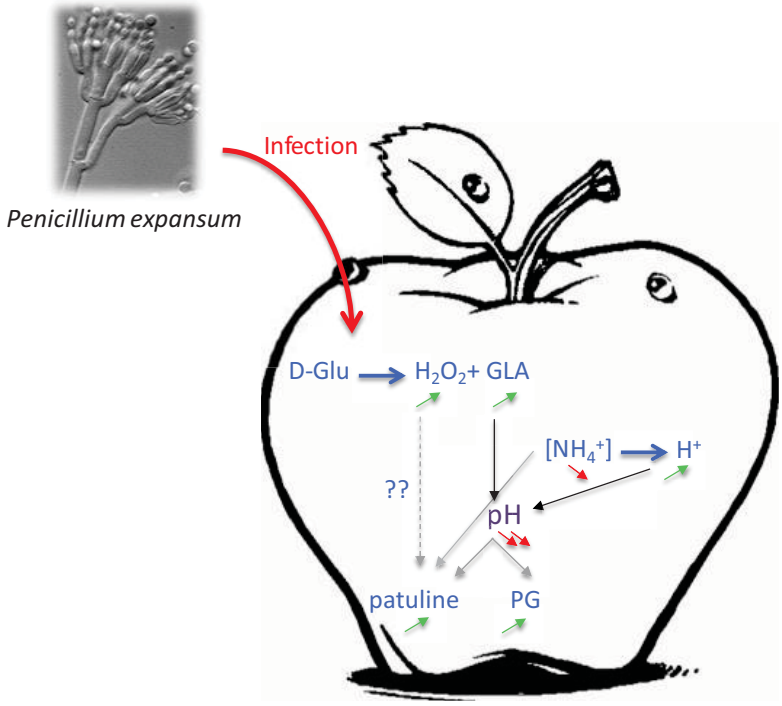


Figure 5 : Schéma hypothétique du mécanisme induit durant l'infection des pommes
Lors de l'infection d'une pomme, *Penicillium expansum* produit de l'acide gluconique et du peroxyde d'hydrogène à partir du glucose présent dans la pomme. En parallèle l'utilisation de l'ammonium comme source azotée conduit à l'excrétion de proton (H^+). La baisse du pH causée par l'augmentation de la concentration d'acide gluconique et de protons induit la production de patuline et de polygalacturonases. L'implication du peroxyde d'hydrogène dans la production de patuline reste à établir.
Abréviations: D-Glu : D-glucose, H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène, GLA : acide gluconique, PG : polygalacturonase.

Au cours des travaux de cette thèse nous avons démontré que la sécrétion de patuline par *Penicillium expansum* pendant l'infection pouvait être un facteur de virulence aidant le champignon dans sa progression au sein des pommes. C'est notamment le cas pour les pommes de variété Golden Delicious, Pink Lady ou Ariane. L'hypothèse serait que le champignon sécrète la patuline qui tuerait le front de cellules, facilitant ainsi sa progression.

Actuellement aucune donné ne décrit la toxicité de la patuline sur les cellules végétales, mais sur la base des études existantes sur l'effet du déoxynivalénol sur ces cellules, nous pouvons imaginer que la patuline puisse agir de la même manière. En effet, du déoxynivalénol a été détecté dans le cytoplasme, les chloroplastes, la paroi, le réticulum endoplasmique et dans des vacuoles témoignant ainsi de la progression de *Fusarium culmorum* au sein des épis de blé (Kang and Buchenauer 1999). Le déoxynivalénol tue les cellules végétales en perturbant la membrane cellulaire, causant une fuite des électrolytes cellulaires et une augmentation de la concentration en ions calcium Ca^{2+} conduisant ainsi un déséquilibre de la balance homéostatique de la cellule (Cossette and Miller 1995; Bushnell et al. 2009).

Actuellement, une seule étude récente fait état de la toxicité de la patuline sur des cellules végétales. Cette étude a été menée sur des cellules de racines de semis de maïs. En comparaison aux cellules non traitées, les cellules ayant été en contact avec la patuline présentent un réticulum endoplasmique détérioré et morcelé en petites vésicules, ainsi qu'une déformation des mitochondries (Ismaiel and Papenbrock 2014).

LES STRATEGIES DE LUTTE CONTRE PENICILLIUM EXPANSUM

Penicillium expansum étant responsable de nombreuses pertes économiques, des stratégies de lutte contre ce pathogène ont été développées. Depuis le début des années 1960, l'utilisation de traitements chimiques tels que les fongicides comme principale méthode de lutte a mené à des résultats satisfaisants. Ces traitements fongicides sont appliqués durant les semaines précédant la récolte et/ou immédiatement après celle-ci. Ces traitements visent à ce que le fongicide soit présent sur les produits récoltés durant la période de conservation afin de prévenir le développement des moisissures. L'utilisation massive de ces fongicides, tels que le thiabendazole, a conduit à l'apparition de souches de *Penicillium expansum* résistantes (Baraldi et al. 2003). Aujourd'hui, la tendance mondiale est de réduire le recours aux fongicides et pesticides en développant des méthodes alternatives afin de réduire les pertes lors des récoltes et du stockage des produits.

Le bio-contrôle, utilisant des microorganismes antagonistes comme les bactéries, les levures ou les champignons, est une de ces méthodes alternatives. Il existe deux approches d'utilisation des microorganismes antagonistes dans le bio-contrôle des maladies post-récolte. La première consiste à utiliser les microorganismes déjà présents sur les fruits en favorisant la croissance de certains par rapport aux autres. La seconde consiste à ajouter artificiellement ces microorganismes qui lutteront contre le pathogène. Le bio-contrôle de la pourriture causée par *Penicillium expansum* chez les pommes et les poires est réalisé avec les microorganismes suivant : *Pseudomonas cepacia* et *Pseudomonas syringae* (Janisiewicz et al. 1992). La pourriture des pommes est aussi contrôlée par l'utilisation de levures, telles que *Candida sake*, *Candida saitona* et *Candida oleophila* (El-Neshawy and Wilson 1997; Vinas et al. 1998; Usall et al. 2000; Morales et al. 2008b). Les modes d'action de ces microorganismes ne sont pas très clairs mais il semblerait qu'ils jouent le rôle de compétiteur avec le pathogène au niveau de l'espace et des sources nutritives (Wisniewski et al. 1991; Ippolito and Nigro 2000). De plus, la production d'antibiotiques, le parasitisme et l'induction de la résistance chez l'hôte par ces microorganismes antagonistes sont d'autres modes d'actions possibles (Naqvi et al. 2004).

En ce qui concerne la lutte contre *Penicillium expansum*, la colonisation des pommes par *Candida saitona* réduit l'apparition de la pourriture bleue (El-Ghaouth et al. 1998).

Metschnikowia pulcherrima, levure utilisée dans la fabrication du vin, ralentit la progression de *Penicillium expansum* en causant un épuisement du fer présent dans le fruit (Saravanakumar et al. 2008). *Pseudomonas cepacia* inhibe la croissance de *Penicillium expansum* dans les pommes en produisant un antibiotique, la pyrrolnitrine (Janisiewicz et al. 1991).

Afin d'augmenter l'efficacité de ces microorganismes plusieurs approches ont été développées. Toujours dans le but de limiter la croissance de *Penicillium expansum* et donc l'apparition de la pourriture bleue, l'addition de L-asparagine ou de L-proline favorise le développement de l'antagoniste *Pseudomonas syringae* cité précédemment. L'efficacité de *Candida sake* contre *Penicillium expansum* est augmentée par l'addition de L-sérine et L-acide aspartique (Janisiewicz et al. 1992). L'utilisation couplée d'un microorganisme antagoniste avec une faible concentration de fongicide peut augmenter l'efficacité du traitement par l'antagoniste. Par exemple, l'ajout de cyprodinil à *Pseudomonas syringae* favorise l'action protectrice de ce microorganisme sur les pommes et les poires (Errampalli and Brubacher 2006; Sugar and Basile 2008).

Le bio-contrôle est une première réponse à la diminution de l'utilisation de produits chimiques tels que les fongicides mais reste une méthode onéreuse qui peut avoir un fort impact sur l'environnement, la faune et la flore. Depuis peu, des études sur l'utilisation de la lumière comme moyen de lutte contre les pathogènes ont été conduites.

En effet, la lumière est utilisée comme source d'informations par les champignons filamenteux et conditionne leur croissance, leur reproduction ou encore leur production de métabolites secondaires. La lumière est une composante majeure dans l'adaptation des champignons filamenteux dans leur environnement. De nombreuses études décrivent l'impact de la lumière sur différentes réponses physiologiques comme la morphologie, la pigmentation et le rythme circadien. Ce dernier régule l'expression des gènes impliqués dans la perception du passage obscurité/lumière. Kato et al. (2003) ont démontré que ces réponses étaient médiées par des chromophores agissant comme des récepteurs dans la transduction du signal lumineux pour la régulation du métabolisme, de la morphologie et de l'expression des gènes.

Les champignons filamenteux possèdent plusieurs mécanismes de perception aux lumières bleue, verte et rouge. Selon le genre et l'espèce fongique considérés les réponses peuvent être très différentes. Actuellement, ces systèmes de régulation ont été largement décrits chez deux modèles de deux genres fongiques différents. Il s'agit de *Neurospora crassa* et d'*Aspergillus nidulans* (Froehlich et al. 2002; Blumenstein et al. 2005; Dunlap and Loros 2006).

L'influence de la lumière sur le métabolisme secondaire et plus précisément sur la production de mycotoxines a été étudiée chez plusieurs espèces fongiques. A titre d'exemple,

Häggblom et Unestam (1997) ont mis en évidence l'inhibition de la production d'alternariol et d'alternariol monométhyl éther par *Alternaria alternata.* Stinnett et al. (2007) ont démontré que la lumière a un impact sur la production de stérigmatocystine chez *Aspergillus nidulans*. Une autre étude menée chez *Fusarium graminearum* montre l'effet inhibiteur de la lumière sur la production de trichothécènes (Kim et al. 2014). Néanmoins, toutes ces études ont été menées sur des substrats synthétiques et en présence de lumière naturelle comparées à une incubation à l'obscurité.

Depuis peu, des études s'intéressent non seulement à l'influence de la lumière naturelle mais aussi des lumières de différentes longueurs d'ondes (donc de différentes couleurs) sur la croissance et le métabolisme secondaire de différentes espèces fongiques. Ces études ont été réalisées sur des substrats synthétiques mais aussi quelques fois sur des substrats naturels.
Plusieurs études, réalisées par le même groupe, ont été conduites sur quatre espèces fongiques productrices d'ochratoxines. Une première étude réalisée *in vitro* démontre que lorsque *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus steynii* et *Penicillium verrucosum* sont incubés sous des lumières bleues aucune trace d'ochratoxine n'est détectée dans les extraits de culture. Chez *Aspergillus niger* et *Penicillium verrucosum* la synthèse d'ochratoxine est également inhibée par les lumières blanche et rouge (Schmidt-Heydt et al. 2011). Deux études sur le genre *Fusarium* par ce même groupe révèlent les différents types de réponses que peuvent présenter deux espèces du même genre incubées sous les mêmes conditions lumineuses. En effet, *Fusarium verticillioides* et *Fusarium proliferatum* ne sont pas sensibles aux mêmes longueurs d'ondes et des phénotypes différents de production de fumonisines sont observés. La croissance de *Fusarium proliferatum* est favorisée par les lumières du spectre, du rouge (627 nm) au bleu (470-455 nm). La production de fumonisine B1 et B2 est largement augmentée par les lumières rouge, verte, bleu et bleu royal (455 nm) (Fanelli et al. 2012b). Chez *Fusarium verticillioides* ces mêmes longueurs d'ondes favorisent la croissance et la production de fumonisines. Seule l'incubation sous une lumière bleue de longueur d'onde très courte (390 nm) à un effet inhibiteur sur la croissance et la production de fumonisines chez cette espèce (Fanelli et al. 2012c).

Dans les derniers travaux de cette thèse nous avons nous avons analysé l'impact de ces diffrérentes lumières sur la croissance *in vitro* de *Penicillium expansum* ainsi que sur sa production de patuline. La croissance de cette espèce fongique est très affectée par les lumières bleue, rouge et blanche. De même que pour l'ochratoxine, la production de patuline est inhibée par la lumière bleue mais aussi par les lumières rouge et blanche.

Récemment, des études ont été réalisées sur des substrats naturels afin d'essayer de développer des moyens de lutte contre les pathogènes. Dans une première étude, la capacité de

la lumière bleue à dégrader l'ochratoxine A produite dans du blé contaminé par *Penicillium verrucosum* a été testée. D'après cette étude la production d'ochratoxine A par *Penicillium verrucosum* est immédiatement stoppée lorsque le blé contaminé est placé sous la lumière bleue. De plus une partie de la production d'ochratoxine A est dégradée par cette même condition lumineuse (Schmidt-Heydt et al. 2012a). Dans cette étude, le blé contaminé a été étalé de manière à obtenir une simple couche afin de permettre une irradiation par la lumière bleue la plus homogène possible. Il faut donc bien garder en tête que la lumière agit seulement à la surface du produit et que les résultats obtenus dépendent des conditions d'expérimentations (intensité de la lumière, température, état de contamination...). Pour toutes ces raisons, aujourd'hui il est difficile d'imaginer mettre en place ce type de traitement comme moyen de lutte contre cette mycotoxine.

Deux autres études conduites sur la mandarine et le citron révèlent l'influence de différentes conditions lumineuses sur l'infection de ces fruits par plusieurs espèces fongiques du genre *Penicillium* proches de *Penicillium expansum*.

Dans la première, les auteurs ont cherché à utiliser certaines conditions lumineuses afin de moduler l'expression de deux gènes impliqués dans la résistance de la plante face à une attaque par un pathogène, *Penicillium digitatum.* La lumière bleue (410 nm – 540 nm) réduit infection des mandarines par cette espèce fongique alors que la lumière rouge la favorise. L'effet inhibiteur de la lumière bleue sur l'infection est corrélé avec une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la résistance de la plante. A l'inverse, la lumière rouge diminue l'expression de ces mêmes gènes et donc favorise l'infection des mandarines par *Penicillium digitatum*. En conséquence, les lumières bleue et rouge ont des effets complètement opposés sur le développement de la maladie causée par *Penicillium digitatum* (Alferez et al. 2012).

Lors des derniers travaux de cette thèse, nous avons mis en évidence l'effet inhibiteur des lumières bleue, rouge et blanche sur la croissance de *Penicillium expansum* et sa production de patuline lorsqu'il infecte des pommes. Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre une incubation des pommes à la lumière bleue ou à la lumière rouge indiquant ainsi que la mandarine et la pomme présentent certainement des mécanismes de défense différents et ne répondant pas aux mêmes stimuli.

Dans la seconde étude, issue du même groupe et réalisée sur le citron, l'effet de la lumière bleue sur le développement des symptômes causés par *Penicillium digitatum* et *Penicillium italicum* a été analysé. Une exposition constante (24h/jour) ou alternée (12h/jour) à la lumière bleue réduit très significativement l'étendue de la zone pourrie. *In vitro*, chez *Penicillium digitatum,* l'exposition à la lumière bleue cause une diminution de l'activité enzymatique d'une polygalacturonase responsable de la lyse des tissus (Liao et al. 2013). *Penicillium digitatum* étant

une espèce fongique très proche de *Penicillium expansum* nous pouvons facilement imaginer retrouver chez cette dernière espèce un système de réponse à la lumière similaire. Or lors de nos travaux, d'un point de vue moléculaire nous nous sommes focalisés sur les gènes du cluster de la voie de biosynthèse de la patuline et non sur les enzymes impliquées lors de l'infection des pommes. Nous n'avons donc pas pu mettre en évidence un système de régulation induit par les différentes conditions lumineuses mais d'après les études précédentes il serait judicieux d'analyser l'expression des gènes impliqués dans la réception des signaux lumineux ou alors d'analyser l'activité des enzymes impliquées dans la virulence du champignon filamenteux ou dans les systèmes de défense de la plante.

Grâce au séquençage récent du génome de *Penicillium expansum,* une analyse BLAST nous permet aujourd'hui d'affirmer que des gènes homologues aux protéines du White Collar Complex (WCC) de *Neurosporra crassa* (réponse à la lumière bleue) et au phytochrome FphA d'*Aspergillus nidulans* (réponse à la lumière rouge) sont présents dans ce gènome indiquant ainsi une possible régulation par la lumière. Dans cette même perspective, l'analyse de l'implication du facteur VeA est la clé de voute du système de régulation par la lumière.

CONCLUSION

L'objectif premier de ce travail entrepris au cours de cette thèse était de caractériser l'ensemble des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la patuline chez *Penicillium expansum*. Ce cluster étant déjà identifié chez *Aspergillus clavatus*, espèce productrice de patuline, l'utilisation des séquences a été un point d'ancrage à la méthode utilisée dans le séquençage de ce même cluster chez *Penicillium expansum*. L'utilisation de séquences homologues retrouvées chez d'autres espèces non productrices de patuline a permis d'optimiser la démarche utilisée. Dans le but de d'identifier l'enzyme impliquée dans le seconde étape de la voie de biosynthèse de la patuline, l'expression hétérologue du gène *patG* a été entreprise chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. L'enzyme codée par ce gène est l'acide 6-méthylsalicylique décarboxylase, responsable de la conversion de l'acide 6-méthylsalicylique en *m*-crésol. Ces premiers travaux complètent les connaissances actuelles sur la voie de biosynthèse de la patuline.

Le second objectif de ce travail a consister à étudier la régulation de la voie de biosynthèse de la patuline et de déterminer le rôle de la patuline pour *Penicillium expansum* lors de l'infection de pommes. La régulation de la production de patuline chez *Penicillium expansum* a été appréhendée uniquement au niveau du cluster. La caractérisation de *patL*, facteur spécifique de cette voie de biosynthèse nous permet aujourd'hui d'affirmer que la patuline est un facteur de virulence lorsque *Penicillium expansum* infecte certaines variétés de pommes. par contre la patuline ne constitue pas un facteur de pathogénicité indispensable car la souche mutante, non productrice de patuline est capable d'infecter toutes les variétés de pommes testées dans ces travaux. Les variétés de pommes sur lesquelles la patuline est une facteur de virulence, augmentant ainsi la vitesse de développement des symptômes, partagent un fond génétique commun apporté par la Golden Delicious. Il serait intéressant d'étendre les essais sur un échantillonage de variétés plus large de pommes à couteau mais aussi de pommes à cidre.
L'étude des séquences des gènes du cluster ainsi que l'étude de la régulation de la voie de biosynthèse de la patuline nous permettent de proposer un mécanisme de compartimentation des différentes étapes. La présence de quatre enzymes présentant un peptide signal semble être un phénomène assez rare et mériterait d'être élucidé.

Dans la dernière partie de cette thèse, l'utilisation de la lumière comme facteur influençant la croissance de *Penicillium expansum* et sa production de patuline a été analysée. Les résultats préliminaires obtenus sont prometteurs. Les lumières bleue, rouge et blanche ont présenté des résultats satisfaisant *in vitro* et *in vivo*. L'utilisation de ces lumières comme moyen pour limiter la production de patuline pour *Penicillium expansum* semble être une bonne alternative à l'utilisation des fongicides.

En définitive, les travaux présentés dans cette thèse ouvrent un large champ de recherche en terme de compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la production de patuline par *Penicillium expansum*. Le developpement de moyens de détection de *Penicillium expansum* et de lutte contre cette espèce fongique permettront une meilleure maîtrise des la contamination des pommes par la patuline.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Adams, T. H., M. T. Boylan and W. E. Timberlake (1988). "brlA is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*." Cell **54**(3): 353-362.

Adjovi, Y. C. S., S. Bailly, B. J. G. Gnonlonfin, S. Tadrist, A. Querin, A. Sanni, I. P. Oswald, O. Puel and J. D. Bailly (2014). "Analysis of the contrast between natural occurrence of toxigenic *Aspergilli* of the *Flavi* section and aflatoxin B1 in cassava." Food Microbiology **38**(0): 151-159.

Ahamed, S., J. S. Foster, A. Bukovsky and J. Wimalasena (2001). "Signal transduction through the Ras/Erk pathway is essential for the mycoestrogen zearalenone-induced cell-cycle progression in MCF-7 cells." Mol Carcinog **30**(2): 88-98.

Alexander, N. J., S. P. McCormick and T. M. Hohn (1999). "TRI12, a trichothecene efflux pump from *Fusarium sporotrichioides*: gene isolation and expression in yeast." Mol Gen Genet **261**(6): 977-84.

Alferez, F., H.-L. Liao and J. K. Burns (2012). "Blue light alters infection by *Penicillium digitatum* in tangerines." Postharvest Biology and Technology **63**(1): 11-15.

Aronson, B. D., K. A. Johnson and J. C. Dunlap (1994). "Circadian clock locus frequency: protein encoded by a single open reading frame defines period length and temperature compensation." PNAS **91**(16): 7683-7687.

Artigot, M. P., N. Loiseau, J. Laffitte, L. Mas-Reguieg, S. Tadrist, I. P. Oswald and O. Puel (2009). "Molecular cloning and functional characterization of two CYP619 cytochrome P450s involved in biosynthesis of patulin in *Aspergillus clavatus*." Microbiology **155**(Pt 5): 1738-47.

Aziz, N. H. and L. A. E. Moussa (1997). "Influence of white light, near-UV irradiation and other environmental conditions on production of aflatoxin B1 by *Aspergillus flavus* and ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus*." Food/Nahrung **41**(3): 150-154.

Azziz-Baumgartner, E., K. Lindblade, K. Gieseker, H. S. Rogers, S. Kieszak, H. Njapau, R. Schleicher, L. F. McCoy, A. Misore and K. DeCock (2005). "Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004." Environmental Health Perspectives: 1779-1783.

B

Baert, K., F. Devlieghere, H. Flyps, M. Oosterlinck, M. M. Ahmed, A. Rajković, B. Verlinden, B. Nicolaï, J. Debevere and B. De Meulenaer (2007). "Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*." International journal of food microbiology **119**(3): 170-181.

Bai, G. H., R. Plattner, A. Desjardins, F. Kolb and R. A. McIntosh (2001). "Resistance to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat." Plant Breeding **120**(1): 1-6.

Bailly, J. D., C. Tabuc, A. Querin and P. Guerre (2005). "Production and stability of patulin, ochratoxin A, citrinin, and cyclopiazonic acid on dry cured ham." Journal of Food Protection **68**(7): 1516-1520.

Ballario, P., C. Talora, D. Galli, H. Linden and G. Macino (1998). "Roles in dimerization and blue light photoresponse of the PAS and LOV domains of *Neurospora crassa* white collar proteins." Molecular Microbiology **29**(3): 719-729.

Ballario, P., P. Vittorioso, A. Magrelli, C. Talora, A. Cabibbo and G. Macino (1996). "White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein." The EMBO journal **15**(7): 1650.

Barad, S., S. B. Horowitz, I. Kobiler, A. Sherman and D. Prusky (2014). "Accumulation of the mycotoxin patulin in the presence of gluconic acid contributes to pathogenicity of *Penicillium expansum*." Molecular Plant-Microbe Interactions **27**(1): 66-77.

Baraldi, E., M. Mari, E. Chierici, M. Pondrelli, P. Bertolini and G. C. Pratella (2003). "Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears: pathogenic fitness and genetic characterization." Plant pathology **52**(3): 362-370.

Bassett, E. W. and S. W. Tanenbaum (1958). "The biosynthesis of patulin: II. The general physiology of several strains of *Penicillium patulum*." Biochimica et biophysica acta **28**: 247-260.

Bassett, E. W. and S. W. Tanenbaum (1960). "Acetyl-coenzyme A in patulin biosynthesis." Biochimica et biophysica acta **40**: 535-537.

Bateman, D. F. and S. V. Beer (1965). "Silmutaneous production ans synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*." Phytopathology **55**: 204-11.

Battilani, P. and A. Pietri (2002). Ochratoxin A in grapes and wine. Mycotoxins in Plant Disease, Springer**:** 639-643.

Bayram, Ö., G. H. Braus, R. Fischer and J. Rodriguez-Romero (2010). "Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems." Fungal Genetics and Biology **47**(11): 900-908.

Bayram, O., S. Krappmann, M. Ni, J. W. Bok, K. Helmstaedt, O. Valerius, S. Braus-Stromeyer, N.-J. Kwon, N. P. Keller and J.-H. Yu (2008a). "VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism." Science **320**(5882): 1504-1506.

Bayram, Ö., S. Krappmann, S. Seiler, N. Vogt and G. H. Braus (2008b). "*Neurospora crassa ve-1 a*ffects asexual conidiation." Fungal Genetics and Biology **45**(2): 127-138.

Becci, P. J., F. G. Hess, W. D. Johnson, M. A. Gallo, J. G. Babish, R. E. Dailey and R. A. Parent (1981). "Long-term carcinogenicity and toxicity studies of patulin in the rat." Journal of Applied Toxicology **1**(5): 256-261.

Bechet, J., M. Grenson and J. M. Wiame (1970). "Mutations affecting the repressibility of arginine biosynthetic enzymes in *Sacchromyces cerevisiae*." European Journal of Biochemistry **12**(1): 31-39.

Beck, J., S. Ripka, A. Siegner, E. Schiltz and E. Schweizer (1990). "The multifunctional 6-methylsalicylic acid synthase gene of *Penicillium patulum*. Its gene structure relative to that of other polyketide synthases." European Journal of Biochemistry **192**(2): 487-98.

Birch, A. J., G. E. Blance and H. Smith (1958). "924. Studies in relation to biosynthesis. Part XVIII. Penicillic acid." Journal of the Chemical Society 4582-4583.

Birkinshaw, J. H., A. Bracken and H. Raistrick (1943). "Studies in the biochemistry of micro-organisms: 72. Gentisyl alcohol (2: 5-dihydroxybenzyl alcohol), a metabolic product of *Penicillium patulum* Bainier." Biochemical Journal **37**(6): 726.

Blumenstein, A., K. Vienken, R. Tasler, J. Purschwitz, D. Veith, N. Frankenberg-Dinkel and R. Fischer (2005). "The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light." Current Biology **15**(20): 1833-1838.

Boddu, J., S. Cho and G. J. Muehlbauer (2007). "Transcriptome analysis of trichothecene-induced gene expression in barley." Molecular Plant-Microbe Interactions **20**(11): 1364-75.

Boenisch, M. J. and W. Schäfer (2011). "Fusarium graminearum forms mycotoxin producing infection structures on wheat." BMC plant biology **11**(1): 110.

Boettger, D. and C. Hertweck (2013). "Molecular diversity sculpted by fungal PKS-NRPS hybrids." ChemBioChem **14**(1): 28-42.

Bojja, R. S., R. L. Cerny, R. H. Proctor and L. Du (2004). "Determining the biosynthetic sequence in the early steps of the fumonisin pathway by use of three gene-disruption mutants of *Fusarium verticillioides*." Journal of agricultural and food chemistry **52**(10): 2855-2860.

Bok, J. W. and N. P. Keller (2004). "LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus spp*." Eukaryotic cell **3**(2): 527-535.

Bok, J. W., D. Noordermeer, S. P. Kale and N. P. Keller (2006). "Secondary metabolic gene cluster silencing in *Aspergillus nidulans*." Molecular Microbiology **61**(6): 1636-1645.

Bondy, G. S. and J. J. Pestka (2000). "Immunomodulation by fungal toxins." Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews **3**(2): 109-143.

Boruta, T. and M. Bizukojc (2014). "Culture-based and sequence-based insights into biosynthesis of secondary metabolites by *Aspergillus terreus* ATCC 20542." J Biotechnol **175**: 53-62.

Brakhage, A. A. (2013). "Regulation of fungal secondary metabolism." Nature Reviews Microbiology **11**(1): 21-32.

Brown, D. W., J. H. Yu, H. S. Kelkar, M. Fernandes, T. C. Nesbitt, N. P. Keller, T. H. Adams and T. J. Leonard (1996). "Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*." PNAS **93**(4): 1418-1422.

Bu'Lock, J. D. (1980). Mycotoxins as secondary metabolites, Academic Press, Inc., New York.

Bu'Lock, J. D., D. Hamilton, M. A. Hulme, A. J. Powell, H. M. Smalley, D. Shepherd and G. N. Smith (1965). "Metabolic development and secondary biosynthesis in *Penicillium urticae*." Canadian journal of microbiology **11**(5): 765-778.

Bui-Klimke, T. and F. Wu (2014a). "Evaluating weight of evidence in the mystery of Balkan Endemic Nephropathy." Risk Analysis.

Bui-Klimke, T. R. and F. Wu (2014b). "Ochratoxin A and human health risk: A review of the evidence Critical Reviews in Food Science and Nutrition." Critical reviews in food science and nutrition(just-accepted).

Bullerman, L. B. and F. J. Olivigni (1974). "Mycotoxin producing potential of molds isolated from cheddad cheese." Journal of Food Science **39**(6): 1166-1168.

Buron-Moles, G., R. Torres, N. Teixido, J. Usall, L. Vilanova and I. Viñas (2015). "Characterisation of H2O2 production to study compatible and non-host pathogen interactions in orange and apple fruit at different maturity stages." Postharvest Biology and Technology **99**: 27-36.

Bushnell, W. R., P. Perkins-Veazie, V. M. Russo, J. Collins and T. M. Seeland (2009). "Effects of deoxynivalenol on content of chloroplast pigments in barley leaf tissues." Phytopathology **100**(1): 33-41.

C

Calvo, A. M. (2008). "The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi." Fungal Genetics and Biology **45**(7): 1053-1061.

Calvo, A. M., J. Bok, W. Brooks and N. P. Keller (2004). "veA is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*." Applied and Environmental Microbiology **70**(8): 4733-4739.

Cary, J. W. and A. M. Calvo (2008). "Regulation of *Aspergillus* mycotoxin biosynthesis." Toxin Reviews **27**(3-4): 347-370.

Casas-Flores, S., M. Rios-Momberg, T. Rosales-Saavedra, P. Martinez-Hernandez, V. Olmedo-Monfil and A. Herrera-Estrella (2006). "Cross talk between a fungal blue-light perception system and the cyclic AMP signaling pathway." Eukaryotic cell **5**(3): 499-506.

Castoria, R., L. Caputo, F. De Curtis and V. De Cicco (2003). "Resistance of postharvest biocontrol yeasts to oxidative stress: A possible new mechanism of action." Phytopathology **93**(5): 564-572.

Castoria, R., V. Morena, L. Caputo, G. Panfili, F. De Curtis and V. De Cicco (2005). "Effect of the biocontrol yeast *Rhodotorula glutinis* strain LS11 on patulin accumulation in stored apples." Phytopathology **95**(11): 1271-1278.

Cerioni, L., L. Lazarte Mde, J. M. Villegas, L. Rodriguez-Montelongo and S. I. Volentini (2013). "Inhibition of *Penicillium expansum* by an oxidative treatment." Food Microbiol **33**(2): 298-301.

Chanda, A., L. V. Roze, S. Kang, K. A. Artymovich, G. R. Hicks, N. V. Raikhel, A. M. Calvo and J. E. Linz (2009). "A key role for vesicles in fungal secondary metabolism." PNAS **106**(46): 19533-8.

Chang, P.-K., J. Yu, D. Bhatnagar and T. E. Cleveland (2000). "Characterization of the *Aspergillus parasiticus* major nitrogen regulatory gene, *areA*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression **1491**(1): 263-266.

Chang, P.-K., J. Yu and J.-H. Yu (2004). "aflT, a MFS transporter-encoding gene located in the aflatoxin gene cluster, does not have a significant role in aflatoxin secretion." Fungal Genetics and Biology **41**(10): 911-920.

Chang, P. K., J. W. Cary, D. Bhatnagar, T. E. Cleveland, J. W. Bennett, J. E. Linz, C. P. Woloshuk and G. A. Payne (1993). "Cloning of the *Aspergillus parasiticus* apa-2 gene associated with the

regulation of aflatoxin biosynthesis." Applied and Environmental Microbiology **59**(10): 3273-9.

Chang, P. K., L. L. Scharfenstein, M. Luo, N. Mahoney, R. J. Molyneux, J. Yu, R. L. Brown and B. C. Campbell (2011). "Loss of msnA, a putative stress regulatory gene, in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* increased production of conidia, aflatoxins and kojic acid." Toxins (Basel) **3**(1): 82-104.

Cheeseman, K., J. Ropars, P. Renault, J. Dupont, J. Gouzy, A. Branca, A.-L. Abraham, M. Ceppi, E. Conseiller and R. Debuchy (2014). "Multiple recent horizontal transfers of a large genomic region in cheese making fungi." Nature communications **5**.

Coleman, J. E. (1992). "Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins." Annu Rev Biochem **61**: 897-946.

Colot, H. V., G. Park, G. E. Turner, C. Ringelberg, C. M. Crew, L. Litvinkova, R. L. Weiss, K. A. Borkovich and J. C. Dunlap (2006). "A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors." PNAS **103**(27): 10352-7.

Comera, C., K. Andre, J. Laffitte, X. Collet, P. Galtier and I. Maridonneau-Parini (2007). "Gliotoxin from *Aspergillus fumigatus* affects phagocytosis and the organization of the actin cytoskeleton by distinct signalling pathways in human neutrophils." Microbes Infect **9**(1): 47-54.

Cossette, F. and J. D. Miller (1995). "Phytotoxic effect of deoxynivalenol and gibberella ear rot resistance of com." Natural toxins **3**(5): 383-388.

Craciun, E. C. and I. Rosculescu (1970). "On Danubian endemic familial nephropathy (Balkan nephropathy): Some problems." The American journal of medicine **49**(6): 774-779.

Crosthwaite, S. K., J. J. Loros and J. C. Dunlap (1995). "Light-induced resetting of a circadian clock is mediated by a rapid increase in *frequency* transcript." Cell **81**(7): 1003-1012.

D

Desjardins, A. E., G. P. Munkvold, R. D. Plattner and R. H. Proctor (2002). "FUM1-a gene required for fumonisin biosynthesis but not for maize ear rot and ear infection by *Gibberella moniliformis* in field tests." Molecular Plant-Microbe Interactions **15**(11): 1157-1164.

Desjardins, A. E., R. D. Plattner, M. Lu and L. E. Claflin (1998). "Distribution of fumonisins in maize ears infected with strains of *Fusarium moniliforme* that differ in fumonisin production." Plant Disease **82**(8): 953-958.

Desjardins, A. E., R. D. Plattner, T. C. Nelsen and J. F. Leslie (1995). "Genetic analysis of fumonisin production and virulence of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*) on maize (Zea mays) seedlings." Applied and Environmental Microbiology **61**(1): 79-86.

Devaraj, H. and N. Devaraj (1987). "Rat intestinal lipid changes in patulin toxicity." Indian journal of experimental biology **25**(9): 637.

Dimroth, P., E. Ringelmann and F. Lynen (1976). "6-Methylsalicylic acid synthetase from *Penicillium patulum*. Some catalytic properties of the enzyme and its relation to fatty acid synthetase." European Journal of Biochemistry **68**(2): 591-6.

Dombrink-Kurtzman, M. A. (2007). "The sequence of the isoepoxydon dehydrogenase gene of the patulin biosynthetic pathway in *Penicillium* species." Antonie Van Leeuwenhoek **91**(2): 179-89.

Dombrink-Kurtzman, M. A. (2008). "A gene having sequence homology to isoamyl alcohol oxidase is transcribed during patulin production in *Penicillium griseofulvum*." Current Microbiology **56**(3): 224-8.

Dombrink-Kurtzman, M. A. and A. E. Engberg (2006). "*Byssochlamys nivea* with patulin-producing capability has an isoepoxydon dehydrogenase gene (idh) with sequence homology to *Penicillium expansum* and *P. griseofulvum*." Mycological research **110**(Pt 9): 1111-8.

Dowzer, C. E. and J. M. Kelly (1991). "Analysis of the creA gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*." Molecular and cellular biology **11**(11): 5701-5709.

Dowzer, C. E. A. and J. M. Kelly (1989). "Cloning of the creA gene from *Aspergillus nidulans*: a gene involved in carbon catabolite repression." Current genetics **15**(6): 457-459.

Du, W., G. R. Obrian and G. A. Payne (2007). "Function and regulation of aflJ in the accumulation of aflatoxin early pathway intermediate in *Aspergillus flavus*." Food additives and contaminants **24**(10): 1043-1050.

Dunlap, J. C. and J. J. Loros (2006). "How fungi keep time: circadian system in *Neurospora* and other fungi." Curr Opin Microbiol **9**(6): 579-87.

Duran, R. M., J. W. Cary and A. M. Calvo (2007). "Production of cyclopiazonic acid, aflatrem, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by veA, a gene necessary for sclerotial formation." Applied and Environmental Microbiology **73**(5): 1158-68.

Dutton, M. F. (2009). "The African fusarium/maize disease." Mycotoxin research **25**(1): 29-39.

E

Ehrlich, K. C., J. W. Cary and B. G. Montalbano (1999a). "Characterization of the promoter for the gene encoding the aflatoxin biosynthetic pathway regulatory protein AFLR." Biochim Biophys Acta **1444**(3): 412-7.

Ehrlich, K. C., B. G. Montalbano and J. W. Cary (1999b). "Binding of the C6-zinc cluster protein, AFLR, to the promoters of aflatoxin pathway biosynthesis genes in *Aspergillus parasiticus*." Gene **230**(2): 249-57.

Ehrlich, K. C., B. G. Montalbano, J. W. Cary and P. J. Cotty (2002). "Promoter elements in the aflatoxin pathway polyketide synthase gene." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression **1576**(1): 171-175.

El-Ghaouth, A., C. L. Wilson and M. Wisniewski (1998). "Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit." Phytopathology **88**(4): 282-91.

El-Neshawy, S. M. and C. L. Wilson (1997). "Nisin enhancement of biocontrol of postharvest diseases of apple with *Candida oleophila*." Postharvest Biology and Technology **10**(1): 9-14.

Errampalli, D. and N. R. Brubacher (2006). "Biological and integrated control of postharvest blue mold (*Penicillium expansum*) of apples by *Pseudomonas syringae* and cyprodinil." Biological Control **36**(1): 49-56.

Escoula, L. (1977). "Moisissures des ensilages et conséquences toxicologiques." Fourrages **69**: 97-114.

Escoula, L. and G. Henry (1974). "Moisissures toxinogènes des fourrages ensilés. I - présence de patuline dans les fronts de coupe d'ensilages." Annales de Recherches Vétérinaires **5**: 423-432.

Eshel, D., I. Miyara, T. Ailing, A. Dinoor and D. Prusky (2002). "pH regulates endoglucanase expression and virulence of *Alternaria alternata* in persimmon fruit." Molecular Plant-Microbe Interactions **15**(8): 774-9.

Espeso, E. A., J. Tilburn, H. N. Arst, Jr. and M. A. Peñalva (1993). "pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene." The EMBO journal **12**(10): 3947-56.

F

Fanelli, F., M. Schmidt-Heydt, M. Haidukowski, R. Geisen, A. Logrieco and G. Mulè (2012a). "Influence of light on growth, conidiation and the mutual regulation of fumonisin B 2 and ochratoxin A biosynthesis by *Aspergillus niger*." World Mycotoxin Journal **5**(2): 169-176.

Fanelli, F., M. Schmidt-Heydt, M. Haidukowski, R. Geisen, A. Logrieco and G. Mulè (2012b). "Influence of light on growth, fumonisin biosynthesis and FUM1 gene expression by *Fusarium proliferatum*." International journal of food microbiology **153**(1-2): 148-153.

Fanelli, F., M. Schmidt-Heydt, M. Haidukowski, A. Susca, R. Geisen, A. Logrieco and G. Mulè (2012c). "Influence of light on growth, conidiation and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*." Fungal biology **116**(2): 241-248.

Fedeshko (1992). Thesis: Polyketide enzymes and genes in *Penicillium urticae*.

Fernandes, M., N. P. Keller and T. H. Adams (1998). "Sequence-specific binding by *Aspergillus nidulans* AflR, a C6 zinc cluster protein regulating mycotoxin biosynthesis." Molecular Microbiology **28**(6): 1355-1365.

Fitzpatrick, D. A. (2012). "Horizontal gene transfer in fungi." FEMS Microbiol Lett **329**(1): 1-8.

Flaherty, J. E. and G. A. Payne (1997). "Overexpression of aflR leads to upregulation of pathway gene transcription and increased aflatoxin production in *Aspergillus flavus*." Applied and Environmental Microbiology **63**(10): 3995-4000.

Flaherty, J. E. and C. P. Woloshuk (2004). "Regulation of fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides* by a zinc binuclear cluster-type gene, ZFR1." Applied and Environmental Microbiology **70**(5): 2653-9.

Forrester, P. I. and G. M. Gaucher (1972). "Conversion of 6-methylsalicylic acid into patulin by *Penicillium urticae*." Biochemistry **11**(6): 1102-1107.

Frisvad, J. C., J. M. Frank, J. Houbraken, A. F. A. Kuijpers and R. A. Samson (2004a). "New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*." Studies in Mycology **50**(1): 23-43.

Frisvad, J. C., J. Smedsgaard, T. O. Larsen and R. A. Samson (2004b). "Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*." Studies in Mycology **49**: 201-241.

Froehlich, A. C., Y. Liu, J. J. Loros and J. C. Dunlap (2002). "White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter." Science **297**(5582): 815-819.

G

Gardiner, D. M., R. S. Jarvis and B. J. Howlett (2005). "The ABC transporter gene in the sirodesmin biosynthetic gene cluster of Leptosphaeria maculans is not essential for sirodesmin production but facilitates self-protection." Fungal Genetics and Biology **42**(3): 257-63.

Gauthier, T., X. Wang, J. Sifuentes Dos Santos, A. Fysikopoulos, S. Tadrist, C. Canlet, M. P. Artigot, N. Loiseau, I. P. Oswald and O. Puel (2012). "Trypacidin, a spore-borne toxin from *Aspergillus fumigatus*, is cytotoxic to lung cells." PLoS One **7**(2): e29906.

Glenn, A. E., N. C. Zitomer, A. M. Zimeri, L. D. Williams, R. T. Riley and R. H. Proctor (2008). "Transformation-mediated complementation of a FUM gene cluster deletion in *Fusarium verticillioides* restores both fumonisin production and pathogenicity on maize seedlings." Molecular Plant-Microbe Interactions **21**(1): 87-97.

Grove, J. F. (1988). "Non-macrocyclic trichothecenes." Natural Product Reports **5**(2): 187-209.

Grove, J. F. (1993). "Macrocyclic trichothecenes." Natural Product Reports **10**(5): 429-448.

Guo, C. J., W. W. Sun, K. S. Bruno and C. C. Wang (2014). "Molecular genetic characterization of terreic acid pathway in *Aspergillus terreus*." Organic Letters.

H

Hadas, Y., I. Goldberg, O. Pines and D. Prusky (2007). "Involvement of gluconic acid and glucose oxidase in the pathogenicity of *Penicillium expansum* in apples." Phytopathology **97**(3): 384-90.

Häggblom, P. and T. Unestam (1997). "Blue light inhibits mycotoxin production and increases total lipids and pigmentation in *Alternaria alternata*." Applied and Environmental Microbiology **38**(6): 1074-1077.

Han, K.-H., J. H. Kim, H. Moon, S. Kim, S.-S. Lee, D.-M. Han, K.-Y. Jahng and K.-S. Chae (2008). "The *Aspergillus nidulans esdC* (early sexual development) gene is necessary for sexual development and is controlled by *veA* and a heterotrimeric G protein." Fungal Genetics and Biology **45**(3): 310-318.

Harding, R. W. and R. V. Turner (1981). "Photoregulation of the carotenoid biosynthetic pathway in albino and white collar mutants of *Neurospora crassa*." Plant physiology **68**(3): 745-749.

Heintzen, C., J. J. Loros and J. C. Dunlap (2001). "The PAS Protein VIVID Defines a Clock-Associated Feedback Loop that Represses Light Input, Modulates Gating, and Regulates Clock Resetting." Cell **104**(3): 453-464.

Hidalgo, P. I., R. V. Ullan, S. M. Albillos, O. Montero, M. A. Fernandez-Bodega, C. Garcia-Estrada, M. Fernandez-Aguado and J.-F. Martin (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.

Hof, H. (2008). "Mycotoxins: pathogenicity factors or virulence factors?" Mycoses **51**(2): 93-94.

Hoff, B., J. Kamerewerd, C. Sigl, R. Mitterbauer, I. Zadra, H. Kürnsteiner and U. Kück (2010). "Two components of a velvet-like complex control hyphal morphogenesis, conidiophore development, and penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*." Eukaryotic cell **9**(8): 1236-1250.

Hofmann, K. and W. Stoffel (1993). "TMbase - A database of membrane spanning proteins segments." Biol. Chem. Hoppe-Seyler **374**(166).

Holm, D. K., L. M. Petersen, A. Klitgaard, P. B. Knudsen, Z. D. Jarczynska, K. F. Nielsen, C. H. Gotfredsen, T. O. Larsen and U. H. Mortensen (2014). "Molecular and chemical characterization of the biosynthesis of the 6-MSA-derived meroterpenoid yanuthone D in *Aspergillus niger*." Chem Biol **21**(4): 519-29.

Hua, S.-S., O.-K. Grosjean and J. L. Baker (1999). "Inhibition of aflatoxin biosynthesis by phenolic compounds." Letters in applied microbiology **29**(5): 289-291.

Huffman, J., R. Gerber and L. Du (2010). "Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins." Biopolymers **93**(9): 764-76.

Hynes, M. J. (1975). "Amide utilization in *Aspergillus nidulans*: evidence for a third amidase enzyme." Journal of general microbiology **91**(1): 99-109.

I

Iamanaka, B. T., M. H. Taniwaki, H. C. Menezes, E. Vicente and M. H. P. Fungaro (2005). "Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil." Food additives and contaminants **22**(12): 1258-1263.

IARC (1987). "Some naturally occuring and synthetic food components, furocournarins and ultraviolet radiation." IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum **40**.

IARC (1997). "Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins." IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum **56**.

IARC (2002). "Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene." IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum **82**.

Iijima, H., Y. Ebizuka and U. Sankawa (1986). "Biosynthesis of patulin; in vitro conversion of gentisyl alcohol into patulin by microsomal enzyme(s) and retention of one of the carbinol protons in this reaction." Chem Pharm Bull (Tokyo) **34**(8): 3534-7.

Innocenti, F. D., U. Pohl and V. E. A. Russo (1983). "Photoinduction of protoperithecia in *Neurospora crassa* by blue light." Photochemistry and photobiology **37**(1): 49-51.

Ippolito, A. and F. Nigro (2000). "Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables." Crop Protection **19**(8): 715-723.

Ismaiel, A. and J. Papenbrock (2014). "The effects of patulin from *Penicillium vulpinum* on seedling growth, root tip ultrastructure and glutathione content of maize." European Journal of Plant Pathology **139**(3): 497-509.

J

Janisiewicz, W., L. Yourman, J. Roitman and N. Mahoney (1991). "Postharvest control of blue mold and gray mold of apples and pears by dip treatment with pyrrolnitrin, a metabolite of *Pseudomonas cepacia*." Plant Disease **75**(5): 490-494.

Janisiewicz, W. J., J. Usall and B. Bors (1992). "Nutritional enhancement of biocontrol of blue mold on apples." Phytopathology **82**(11): 1364-1370.

Jayashree, T. and C. Subramanyam (2000). "Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*." Free Radical Biology and Medicine **29**(10): 981-985.

Joffe, A. Z. and N. Lisker (1969). "Effects of light, temperature, and pH value on aflatoxin production in vitro." Applied microbiology **18**(3): 517-518.

K

Käfer, E. (1965). "Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*." Genetics **52**(1): 217.

Kang, Z. and H. Buchenauer (1999). "Immunocytochemical localization of fusarium toxins in infected wheat spikes by *Fusarium culmorum*." Physiological and Molecular Plant Pathology **55**(5): 275-288.

Karolewiez, A. and R. Geisen (2005). "Cloning a part of the ochratoxin A biosynthetic gene cluster of< i> Penicillium nordicum</i> and characterization of the ochratoxin polyketide synthase gene." Systematic and applied microbiology **28**(7): 588-595.

Kato, N., W. Brooks and A. M. Calvo (2003). "The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by veA, a gene required for sexual development." Eukaryotic cell **2**(6): 1178-1186.

Katzman, P. A., E. E. Hays, C. K. Cain, J. J. Van Wyk, F. J. Reithel, S. A. Thayer, E. A. Doisy, W. L. Gaby, C. J. Carroll and R. D. Muir (1944). "Clavacin, an antibiotic substance from *Aspergillus clavatus*." Journal of Biological Chemistry **154**(2): 475-486.

Keller, N. P. and T. H. Adams (1995). "Analysis of a mycotoxin gene cluster in *Aspergillus nidulans*." SAAS Bull Biochem Biotechnol **8**: 14-21.

Keller, N. P. and T. M. Hohn (1997). "Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi." Fungal Genetics Biology **21**(1): 17-29.

Keller, N. P., C. Nesbitt, B. Sarr, T. D. Phillips and G. B. Burow (1997a). "pH regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus* spp." Phytopathology **87**(6): 643-8.

Keller, N. P., G. Turner and J. W. Bennett (2005). "Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics." Nature Reviews Microbiology **3**(12): 937-47.

Keller, S. E., T. M. Sullivan and S. Chirtel (1997b). "Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B1: oxygen and pH." J Ind Microbiol Biotechnol **19**(4): 305-9.

Khaldi, N., J. Collemare, M.-H. Lebrun and K. H. Wolfe (2008). "Evidence for horizontal transfer of a secondary metabolite gene cluster between fungi." Genome Biol **9**(1): R18.

Khaldi, N., F. T. Seifuddin, G. Turner, D. Haft, W. C. Nierman, K. H. Wolfe and N. D. Fedorova (2010). "SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters." Fungal Genetics Biology **47**(9): 736-41.

Khaldi, N. and K. H. Wolfe (2011). "Evolutionary origins of the fumonisin secondary metabolite gene cluster in *Fusarium verticillioides* and *Aspergillus niger*." International Journal of Evolutionary Biology **2011**.

Kim, H.-S., K.-Y. Han, K.-J. Kim, D.-M. Han, K.-Y. Jahng and K.-S. Chae (2002). "The veA gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*." Fungal Genetics and Biology **37**(1): 72-80.

Kim, H., H. Son and Y. Lee (2014). "Effects of light on secondary metabolism and fungal development of *Fusarium graminearum*." Journal of applied microbiology **116**(2): 380-389.

Kim, H. and C. P. Woloshuk (2008). "Role of *AREA*, a regulator of nitrogen metabolism, during colonization of maize kernels and fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*." Fungal Genetics and Biology **45**(6): 947-953.

Kimura, M., T. Tokai, N. Takahashi-Ando, S. Ohsato and M. Fujimura (2007). "Molecular and genetic studies of *fusarium* trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution." Biosci Biotechnol Biochem **71**(9): 2105-23.

Kupferschmidt, K. (2012). "Attack of the Clones." Science **337**(6095): 636-638.

L

Lam, K. S., J. O. Neway and G. M. Gaucher (1988). "In vitro stabilization of 6-methylsalicylic acid synthetase from *Penicillium urticae*." Canadian journal of microbiology **34**(1): 30-37.

Langfelder, K., B. Jahn, H. Gehringer, A. Schmidt, G. Wanner and A. A. Brakhage (1998). "Identification of a polyketide synthase gene (pksP) of *Aspergillus fumigatus* involved in conidial pigment biosynthesis and virulence." Medical microbiology and immunology **187**(2): 79-89.

Larsen, T. O., A. Svendsen and J. r. Smedsgaard (2001). "Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*." Applied and Environmental Microbiology **67**(8): 3630-3635.

Leblanc, J. C., A. Tard, J. L. Volatier and P. Verger (2005). "Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from the first french total diet study." Food additives and contaminants **22**(7): 652-672.

Lee, D. B., L. H. Kim, J. P. Kim, K. H. Han and D. M. Han (2011). "Isolation and characterization of self-fertile suppressors from the sterile nsdD deletion mutant of *Aspergillus nidulans*." J Microbiol **49**(6): 1054-7.

Lewis, L., M. Onsongo, H. Njapau, H. Schurz-Rogers, G. Luber, S. Kieszak, J. Nyamongo, L. Backer, A. M. Dahiye and A. Misore (2005). "Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya." Environmental Health Perspectives: 1763-1767.

Li, S., K. Myung, D. Guse, B. Donkin, R. H. Proctor, W. S. Grayburn and A. M. Calvo (2006). "FvVE1 regulates filamentous growth, the ratio of microconidia to macroconidia and cell wall formation in *Fusarium verticillioides*." Molecular Microbiology **62**(5): 1418-1432.

Li, Y. P., Y. Xu and Z. B. Huang (2012). "Isolation and characterization of the citrinin biosynthetic gene cluster from *Monascus aurantiacus*." Biotechnol Lett **34**(1): 131-6.

Liao, H.-L., F. Alferez and J. K. Burns (2013). "Assessment of blue light treatments on citrus postharvest diseases." Postharvest Biology and Technology **81**(0): 81-88.

Light, R. J. (1969). "6-Methylsalicylic acid decarboxylase from *Penicillium patulum*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology **191**(2): 430-438.

Lim, F. Y., B. Ames, C. T. Walsh and N. P. Keller (2014). "Co-ordination between BrlA regulation and secretion of the oxidoreductase FmqD directs selective accumulation of fumiquinazoline C to conidial tissues in *Aspergillus fumigatus*." Cell Microbiol **16**(8): 1267-83.

Linden, H. and G. Macino (1997). "White collar 2, a partner in blue light signal transduction, controlling expression of light regulated genes in *Neurospora crassa*." The EMBO journal **16**(1): 98-109.

Lopez-diaz, T. M. and B. Flannigan (1997). "Production of patulin and cytochalasin E by *Aspergillus clavatus* during malting of barley and wheat." International journal of food microbiology **35**(2): 129-136.

M

MacDonald, S., M. Long, J. Gilbert and I. Felgueiras (2000). "Liquid chromatographic method for determination of patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree: collaborative study." Journal of AOAC International **83**(6): 1387-1394.

Maier, F. J., T. Miedaner, B. Hadeler, A. Felk, S. Salomon, M. Lemmens, H. Kassner and W. Schaefer (2006). "Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (Tri5) gene in three field isolates of different chemotype and virulence." Molecular plant pathology **7**(6): 449-461.

Manteau, S., S. Abouna, B. Lambert and L. Legendre (2003). "Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*." FEMS Microbiol Ecol **43**(3): 359-66.

Marasas, W. F. (2001). "Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective." Environmental Health Perspectives **109**(Suppl 2): 239.

Marasas, W. F. O. (1996). Fumonisins: history, world-wide occurrence and impact. Fumonisins in food, Springer**:** 1-17.

Marcet-Houben, M., A. R. Ballester, B. de la Fuente, E. Harries, J. F. Marcos, L. Gonzalez-Candelas and T. Gabaldon (2012). "Genome sequence of the necrotrophic fungus *Penicillium digitatum*, the main postharvest pathogen of citrus." BMC Genomics **13**: 646.

Marciano, P., P. Di Lenna and P. Magro (1983). "Oxalic acid, cell wall-degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower." Physiological Plant Pathology **22**(3): 339-345.

Maresca, M. (2013). "From the gut to the brain: Journey and pathophysiological effects of the food-associated trichothecene mycotoxin deoxynivalenol." Toxins **5**(4): 784-820.

Marin, S., H. Morales, H. A. Hasan, A. J. Ramos and V. Sanchis (2006). "Patulin distribution in Fuji and Golden apples contaminated with *Penicillium expansum*." Food Additives and Contaminants **23**(12): 1316-22.

Marin, S., A. J. Ramos, G. Cano-Sancho and V. Sanchis (2013). "Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment." Food and Chemical Toxicology **60**: 218-237.

Marsh, P. B., E. E. Taylor and L. M. Bassler (1959). A Guide to the literature on certain effects of light on fungi: reproduction, morphology, pigmentation, and photoropic phenomena, Crops Research Division, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture.

Martin, J. F. (2000). "Molecular control of expression of penicillin biosynthesis genes in fungi: regulatory proteins interact with a bidirectional promoter region." Journal of bacteriology **182**(9): 2355-2362.

Matic, S., D. Spadaro, A. Prelle, M. L. Gullino and A. Garibaldi (2013). "Light affects fumonisin production in strains of *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium proliferatum*, and *Fusarium verticillioides* isolated from rice." International journal of food microbiology **166**(3): 515-523.

McCallum, J. L., R. Tsao and T. Zhou (2002). "Factors affecting patulin production by *Penicillium expansum*." Journal of Food Protection® **65**(12): 1937-1942.

McGonigle, T. P. (2007). "Effects of Animals Grazing on Fungi." IV-Environmental and microbial relationships. **4**: 201.

McKinley, E. R. and W. W. Carlton (1980). "Patulin mycotoxicosis in Swiss ICR mice." Food Cosmet Toxicol **18**(2): 181-7.

Meissonnier, G. M., P. Pinton, J. Laffitte, A.-M. Cossalter, Y. Y. Gong, C. P. Wild, G. Bertin, P. Galtier and I. P. Oswald (2008). "Immunotoxicity of aflatoxin B1: impairment of the cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression." Toxicology and applied pharmacology **231**(2): 142-149.

Merhej, J., F. Richard-Forget and C. Barreau (2011). "The pH regulatory factor Pac1 regulates *Tri* gene expression and trichothecene production in *Fusarium graminearum*." Fungal Genetics and Biology **48**(3): 275-284.

Merhej, J., M. Urban, M. Dufresne, K. E. Hammond-Kosack, F. Richard-Forget and C. Barreau (2012). "The velvet gene, FgVe1, affects fungal development and positively regulates trichothecene biosynthesis and pathogenicity in *Fusarium graminearum*." Molecular plant pathology **13**(4): 363-374.

Merrow, M., C. Boesl, J. Ricken, M. Messerschmitt, M. Goedel and T. Roenneberg (2006). "Entrainment of the *Neurospora* circadian clock." Chronobiology international **23**(1-2): 71-80.

Messenguy, F. and E. Dubois (1988). "The yeast ARGRII regulatory protein has homology with various RNases and DNA binding proteins." Molecular and General Genetics MGG **211**(1): 102-105.

Meyers, D. M., G. Obrian, W. L. Du, D. Bhatnagar and G. A. Payne (1998). "Characterization of aflJ, a gene required for conversion of pathway intermediates to aflatoxin." Applied and Environmental Microbiology **64**(10): 3713-3717.

Mingot, J. M., E. A. Espeso, E. Diez and M. A. Penalva (2001). "Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor." Mol Cell Biol **21**(5): 1688-99.

Miyara, I., H. Shafran, H. Kramer Haimovich, J. Rollins, A. Sherman and D. Prusky (2008). "Multi-factor regulation of pectate lyase secretion by *Colletotrichum gloeosporioides* pathogenic on avocado fruits." Molecular Plant Pathology **9**(3): 281-91.

Moake, M. M., O. I. Padillaâ€Zakour and R. W. Worobo (2005). "Comprehensive review of patulin control methods in foods." Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **4**(1): 8-21.

Mooney, J. L. and L. N. Yager (1990). "Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*." Genes & development **4**(9): 1473-1482.

Morales, H., G. Barros, S. Marìn, S. Chulze, A. J. Ramos and V. Sanchis (2008a). "Effects of apple and pear varieties and pH on patulin accumulation by *Penicillium expansum*." Journal of the Science of Food and Agriculture **88**(15): 2738-2743.

Morales, H., S. Marin, A. Rovira, A. J. Ramos and V. Sanchis (2007). "Patulin accumulation in apples by *Penicillium expansum* during postharvest stages." Letters in applied microbiology **44**(1): 30-35.

Morales, H., V. Sanchis, J. Usall, A. J. Ramos and S. Marin (2008b). "Effect of biocontrol agents *Candida sake* and *Pantoea agglomerans* on *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in apples." International journal of food microbiology **122**(1-2): 61-67.

Murphy, G. and F. Lynen (1975). "Patulin biosynthesis: the metabolism of m-hydroxybenzyl alcohol and m-hydroxybenzaldehyde by particulate preparations from *Penicillium patulum*." European Journal of Biochemistry **58**(2): 467-75.

Myung, K., N. C. Zitomer, M. Duvall, A. E. Glenn, R. T. Riley and A. M. Calvo (2012). "The conserved global regulator VeA is necessary for symptom production and mycotoxin synthesis in maize seedlings by *Fusarium verticillioides*." Plant pathology **61**(1): 152-160.

N

Naqvi, S. A. M. H., A. El Ghaouth, C. Wilson and M. Wisniewski (2004). Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases of fruit and vegetables. Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II, Springer Netherlands**:** 511-535.

Nasmith, C. G., S. Walkowiak, L. Wang, W. W. Y. Leung, Y. Gong, A. Johnston, L. J. Harris, D. S. Guttman and R. Subramaniam (2011). "Tri6 is a global transcription regulator in the phytopathogen *Fusarium graminearum*." PLoS pathogens **7**(9): e1002266.

Neri, F., I. Donati, F. Veronesi, D. Mazzoni and M. Mari (2010). "Evaluation of *Penicillium expansum* isolates for aggressiveness, growth and patulin accumulation in usual and less common fruit hosts." International journal of food microbiology **143**(3): 109-17.

O

Olivigni, F. J. and L. B. Bullerman (1977). "Simultaneous production of penicillic acid and patulin by a *Penicillium* species isolated from cheddar cheese." Journal of Food Science **42**(6): 1654-1657.

Olivigni, F. J. and L. B. Bullerman (1978). "Production of penicillic acid and patulin by an atypical *Penicillium roqueforti* isolate." Applied and Environmental Microbiology **35**(2): 435-438.

Ortuño, A., A. Bidez, P. Gomez, M. C. Arcas, I. Porras, A. Garcia-Lidon and J. A. D. Rio (2006). "*Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*." Food Chemistry **98**(2): 351-358.

P

Palmer, J. M. and N. P. Keller (2010). "Secondary metabolism in fungi: does chromosomal location matter?" Current opinion in microbiology **13**(4): 431-436.

Palumbo, J. D., T. L. O'Keeffe and N. E. Mahoney (2007). "Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant compounds." Mycopathologia **164**(5): 241-248.

Paterson, R. R. (2004). "The isoepoxydon dehydrogenase gene of patulin biosynthesis in cultures and secondary metabolites as candidate PCR inhibitors." Mycological research **108**(Pt 12): 1431-7.

Paterson, R. R. M. (2006). "Fungi and fungal toxins as weapons." Mycological research **110**(9): 1003-1010.

Payne, G. A., G. J. Nystrom, D. Bhatnagar, T. E. Cleveland and C. P. Woloshuk (1993). "Cloning of the afl-2 gene involved in aflatoxin biosynthesis from *Aspergillus flavus*." Applied and Environmental Microbiology **59**(1): 156-62.

Petersen, T. N., S. Brunak, G. von Heijne and H. Nielsen (2011). "SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions." Nature Methods **8**(10): 785-786.

Pfeiffer, E., K. GroÃŸ and M. Metzler (1998). "Aneuploidogenic and clastogenic potential of the mycotoxins citrinin and patulin." Carcinogenesis **19**(7): 1313-1318.

Pfohl-Leszkowicz, A. (1999). Les mycotoxines dans l'alimentation. Evaluation et gestion du risque. Paris.

Pistol, G. C., M. A. Gras, D. E. Marin, F. Israel-Roming, M. Stancu and I. Taranu (2014). "Natural feed contaminant zearalenone decreases the expressions of important pro-and anti-inflammatory mediators and mitogen-activated protein kinase/NF-ÎºB signalling molecules in pigs." British Journal of Nutrition **111**(03): 452-464.

Ponts, N., L. Pinson-Gadais, A.-L. Boutigny, C. Barreau and F. Richard-Forget (2011). "Cinnamic-derived acids significantly affect *Fusarium graminearum* growth and in vitro synthesis of type B trichothecenes." Phytopathology **101**(8): 929-934.

Ponts, N., L. Pinson-Gadais, M.-N. Verdal-Bonnin, C. Barreau and F. Richard-Forget (2006). "Accumulation of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated by oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum*." FEMS microbiology letters **258**(1): 102-107.

Price, M. S., J. Yu, W. C. Nierman, H. S. Kim, B. Pritchard, C. A. Jacobus, D. Bhatnagar, T. E. Cleveland and G. A. Payne (2006). "The aflatoxin pathway regulator AflR induces gene transcription inside and outside of the aflatoxin biosynthetic cluster." FEMS Microbiol Lett **255**(2): 275-9.

Probst, C., H. Njapau and P. J. Cotty (2007). "Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: identification of the causal agent." Applied and Environmental Microbiology **73**(8): 2762-2764.

Proctor, R. H., D. W. Brown, R. D. Plattner and A. E. Desjardins (2003). "Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*." Fungal Genetics and Biology **38**(2): 237-49.

Proctor, R. H., A. E. Desjardins, S. P. McCormick, R. D. Plattner, N. J. Alexander and D. W. Brown (2002). Genetic analysis of the role of trichothecene and fumonisin mycotoxins in the virulence of *Fusarium*. Mycotoxins in Plant Disease, Springer**:** 691-698.

Proctor, R. H., T. M. Hohn, S. P. McCormick and A. E. Desjardins (1995). "Tri6 encodes an unusual zinc finger protein involved in regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides*." Applied and Environmental Microbiology **61**(5): 1923-30.

Proctor, R. H., F. Van Hove, A. Susca, G. Stea, M. Busman, T. Lee, C. Waalwijk, A. Moretti and T. J. Ward (2013). "Birth, death and horizontal transfer of the fumonisin biosynthetic gene cluster during the evolutionary diversification of *Fusarium*." Molecular Microbiology **90**(2): 290-306.

Prusky, D., S. Gold and N. T. Keen (1989). "Purification and characterization of an endopolygalacturonase produced by *Colletotrichum gloeosporioides*." Physiological and Molecular Plant Pathology **35**(2): 121-133.

Prusky, D., J. L. McEvoy, B. Leverentz and W. S. Conway (2001). "Local modulation of host pH by *Colletotrichum species* as a mechanism to increase virulence." Molecular Plant-Microbe Interactions **14**(9): 1105-13.

Prusky, D., J. L. McEvoy, R. Saftner, W. S. Conway and R. Jones (2004). "Relationship between host acidification and virulence of *Penicillium s*pp. on apple and citrus fruit." Phytopathology **94**(1): 44-51.

Prusky, D. and N. Yakoby (2003). "Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH?" Molecular Plant Pathology **4**(6): 509-16.

Puel, O. (2007). Thèse : Bases moléculaires de la voie de biosynthèse de la patuline, mycotoxine produite par *Byssochlamys nivea* et *Penicillium griseofulvum*. Toulouse.

Puel, O., P. Galtier and I. P. Oswald (2010). "Biosynthesis and toxicological effects of patulin." Toxins (Basel) **2**(4): 613-31.

Puel, O., S. Tadrist, M. Delaforge, I. P. Oswald and A. Lebrihi (2007). "The inability of *Byssochlamys fulva* to produce patulin is related to absence of 6-methylsalicylic acid synthase and isoepoxydon dehydrogenase genes." International journal of food microbiology **115**(2): 131-9.

Puel, O., S. Tadrist, P. Galtier, I. P. Oswald and M. Delaforge (2005). "*Byssochlamys nivea* as a source of mycophenolic acid." Applied and Environmental Microbiology **71**(1): 550-3.

Purschwitz, J., S. Müller, C. Kastner and R. Fischer (2006). "Seeing the rainbow: light sensing in fungi." Current opinion in microbiology **9**(6): 566-571.

Purschwitz, J., S. Müller, C. Kastner, M. Schöser, H. Haas, E. A. Espeso, A. Atoui, A. M. Calvo and R. Fischer (2008). "Functional and physical interaction of blue-and red-Light sensors in *Aspergillus nidulans*." Current Biology **18**(4): 255-259.

R

Reddy, L. and K. Bhoola (2010). "Ochratoxins - Food contaminants: Impact on human health." Toxins **2**(4): 771-779.

Reverberi, M., K. Gazzetti, F. Punelli, M. Scarpari, S. Zjalic, A. Ricelli, A. A. Fabbri and C. Fanelli (2012). "Aoyap1 regulates OTA synthesis by controlling cell redox balance in *Aspergillus ochraceus*." Applied microbiology and biotechnology **95**(5): 1293-1304.

Reverberi, M., S. Zjalic, A. Ricelli, F. Punelli, E. Camera, C. Fabbri, M. Picardo, C. Fanelli and A. A. Fabbri (2008). "Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: a role for the ApyapA gene." Eukaryotic cell **7**(6): 988-1000.

Reyes-Dominguez, Y., J. W. Bok, H. Berger, E. K. Shwab, A. Basheer, A. Gallmetzer, C. Scazzocchio, N. Keller and J. Strauss (2010). "Heterochromatic marks are associated with the repression of secondary metabolism clusters in *Aspergillus nidulans*." Molecular Microbiology **76**(6): 1376-1386.

Riley, R. T., K. A. Voss, H.-S. C. A. Yool and A. H. Merrill (1994). "Mechanism of fumonisin toxicity and carcinogenesis." Journal of Food Protection **57**(6): 528-535.

Rocha, O., K. Ansari and F. M. Doohan (2005). "Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review." Food additives and contaminants **22**(4): 369-378.

Rodriguez-Romero, J., M. Hedtke, C. Kastner, S. Müller and R. Fischer (2010). "Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference." Annual review of microbiology **64**: 585-610.

Rohlfs, M. (2005). "Density-dependent insect-mold interactions: effects on fungal growth and spore production." Mycologia **97**(5): 996-1001.

Rohlfs, M., M. Albert, N. P. Keller and F. Kempken (2007). "Secondary chemicals protect mould from fungivory." Biology Letters **3**(5): 523-525.

Rollins, M. J. and G. M. Gaucher (1994). "Ammonium repression of antibiotic and intracellular proteinase production in *Penicillium urticae*." Appl Microbiol Biotechnol **41**(4): 447-55.

Romero, S. M., M. R. Alberto, M. C. Manca de Nadra and G. Vaamonde (2009). "Inhibition of growth and ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius* by flavonoid and nonflavonoid compounds." Mycotoxin research **25**(3): 165-170.

Roos, W. and M. Luckner (1984). "Relationships between proton extrusion and fluxes of ammonium ions and organic acids in *Penicillium cyclopium*." Journal of general microbiology **130**(4): 1007-1014.

Roze, L. V., A. Chanda and J. E. Linz (2011). "Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes." Fungal Genetics and Biology **48**(1): 35-48.

Rubin-Bejerano, I., S. Mandel, K. Robzyk and Y. Kassir (1996). "Induction of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae* depends on conversion of the transcriptional represssor Ume6 to a positive regulator by its regulated association with the transcriptional activator Ime1." Molecular and cellular biology **16**(5): 2518-2526.

Rychlik, M. and P. Schieberle (2001). "Model studies on the diffusion behavior of the mycotoxin patulin in apples, tomatoes, and wheat bread." European Food Research and Technology **212**(3): 274-278.

S

Samson, R. A., J. Houbraken, J. Varga and J. C. Frisvad (2009). "Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssochlamys* and its *Paecilomyces* anamorphs." Persoonia **22**: 14.

Sandven, P. (1998). "Does the mycotoxin citrinin function as a sun protectant in conidia from *Penicillium verrucosum*." Mycopathologia **142**(1): 43-47.

Sanzani, S. M., A. De Girolamo, L. Schena, M. Solfrizzo, A. Ippolito and A. Visconti (2009). "Control of *Penicillium expansum* and patulin accumulation on apples by quercetin and umbelliferone." European Food Research and Technology **228**(3): 381-389.

Sanzani, S. M., M. Reverberi, M. Punelli, A. Ippolito and C. Fanelli (2012). "Study on the role of patulin on pathogenicity and virulence of *Penicillium expansum*." International journal of food microbiology **153**(3): 323-331.

Saravanakumar, D., A. Ciavorella, D. Spadaro, A. Garibaldi and M. L. Gullino (2008). "*Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion." Postharvest Biology and Technology **49**(1): 121-128.

Sargent, M. L. and W. R. Briggs (1967). "The effects of light on a circadian rhythm of conidiation in *Neurospora*." Plant physiology **42**(11): 1504-1510.

Scharf, D. H., T. Heinekamp and A. A. Brakhage (2014). "Human and plant fungal pathogens: the role of secondary metabolites." PLoS Pathog **10**(1): e1003859.

Schmidt-Heydt, M., B. Cramer, I. Graf, S. Lerch, H.-U. Humpf and R. Geisen (2012a). "Wavelength-dependent degradation of ochratoxin and citrinin by light in vitro and in vivo and its implications on *Penicillium*." Toxins **4**(12): 1535-1551.

Schmidt-Heydt, M., E. Graf, D. Stoll and R. Geisen (2012b). "The biosynthesis of ochratoxin A by *Penicillium* as one mechanism for adaptation to NaCl rich foods." Food Microbiology **29**(2): 233-241.

Schmidt-Heydt, M., C. Rüfer, F. Raupp, A. Bruchmann, G. Perrone and R. Geisen (2011). "Influence of light on food relevant fungi with emphasis on ochratoxin producing species." International journal of food microbiology **145**(1): 229-237.

Schmidt-Heydt, M., D. Stoll, P. Schütz and R. Geisen (2014). "Oxidative stress induces the biosynthesis of citrinin by *Penicillium verrucosum* at the expense of ochratoxin." International journal of food microbiology.

Schmoll, M., L. Franchi and C. P. Kubicek (2005). "Envoy, a PAS/LOV domain protein of *Hypocrea jecorina* (Anamorph *Trichoderma reesei*), modulates cellulase gene transcription in response to light." Eukaryotic cell **4**(12): 1998-2007.

Schwerdtfeger, C. and H. Linden (2003). "VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation." The EMBO journal **22**(18): 4846-4855.

Scott, A. I. and M. Yalpani (1967). "A mass-spectrometric study of biosynthesis: conversion of deutero-m-cresol into patulin." Chem. Commun.(London)(18): 945-946.

Scott, P. M. (1974). Patulin. Mycotoxins. E. S. P. Company. Amsterdam**:** 383-403.

Sekiguchi, J. and G. M. Gaucher (1977). "Conidiogenesis and secondary metabolism in *Penicillium urticae*." Applied and Environmental Microbiology **33**(1): 147-58.

Sekiguchi, J. and G. M. Gaucher (1978). "Identification of phyllostine as an intermediate of the patulin pathway in *Penicillium urticae*." Biochemistry **17**(9): 1785-1791.

Sekiguchi, J. and G. M. Gaucher (1979a). "Isoepoxydon, a new metabolite of the patulin pathway in *Penicillium urticae*." Biochem J **182**(2): 445-53.

Sekiguchi, J. and G. M. Gaucher (1979b). "Patulin biosynthesis: the metabolism of phyllostine and isoepoxydon by cell-free preparations from *Pencillium urticae*." Can J Microbiol **25**(8): 881-7.

Sekiguchi, J., T. Shimamoto, Y. Yamada and G. M. Gaucher (1983). "Patulin biosynthesis: enzymatic and nonenzymatic transformations of the mycotoxin (E)-ascladiol." Applied and Environmental Microbiology **45**(6): 1939-42.

Selmanoglu, G. and E. A. Koçkaya (2004). "Investigation of the effects of patulin on thyroid and testis, and hormone levels in growing male rats." Food and Chemical Toxicology **42**(5): 721-727.

Seo, J. A., R. H. Proctor and R. D. Plattner (2001). "Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*." Fungal Genetics and Biology **34**(3): 155-65.

Seong, K. Y., M. Pasquali, X. Zhou, J. Song, K. Hilburn, S. McCormick, Y. Dong, J. R. Xu and H. C. Kistler (2009). "Global gene regulation by *Fusarium* transcription factors Tri6 and Tri10 reveals adaptations for toxin biosynthesis." Molecular Microbiology **72**(2): 354-367.

Slot, J. C. and A. Rokas (2011). "Horizontal transfer of a large and highly toxic secondary metabolic gene cluster between fungi." Current Biology **21**(2): 134-139.

Snini, S. P., S. Tadrist, J. Laffitte, E. L. Jamin, I. P. Oswald and O. Puel (2014). "The gene *PatG* involved in the biosynthesis pathway of patulin, a food-borne mycotoxin, encodes a 6-methylsalicylic acid decarboxylase." International journal of food microbiology **171**: 77-83.

Sommer, N. F., J. R. Buchanan and R. J. Fortlage (1974). "Production of patulin by *Penicillium expansum*." Applied microbiology **28**(4): 589-593.

Speijers, G. J., M. A. Franken and F. X. van Leeuwen (1988). "Subacute toxicity study of patulin in the rat: effects on the kidney and the gastro-intestinal tract." Food Chem Toxicol **26**(1): 23-30.

Stinnett, S. M., E. A. Espeso, L. Cobeño, L. Araujo□Bazan and A. M. Calvo (2007). "*Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin-carrier and on light." Molecular Microbiology **63**(1): 242-255.

Stinson, E. E., S. F. Osman, C. N. Huhtanen and D. D. Bills (1978). "Disappearance of patulin during alcoholic fermentation of apple juice." Applied and Environmental Microbiology **36**(4): 620-622.

Stoll, D. A., S. Link, S. Kulling, R. Geisen and M. Schmidt-Heydt (2014). "Comparative proteome analysis of Penicillium verrucosum grown under light of short wavelength shows an induction of stress-related proteins associated with modified mycotoxin biosynthesis." International journal of food microbiology **175**(0): 20-29.

Streit, E., K. Naehrer, I. Rodrigues and G. Schatzmayr (2013). "Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: long-term analysis with special focus on Europe and Asia." Journal of the Science of Food and Agriculture **93**(12): 2892-2899.

Strich, R., R. T. Surosky, C. Steber, E. Dubois, F. Messenguy and R. E. Esposito (1994). "UME6 is a key regulator of nitrogen repression and meiotic development." Genes & development **8**(7): 796-810.

Sugar, D. and S. R. Basile (2008). "Timing and sequence of postharvest fungicide and biocontrol agent applications for control of pear decay." Postharvest Biology and Technology **49**(1): 107-112.

Sun, G., S. Wang, X. Hu, J. Su, T. Huang, J. Yu, L. Tang, W. Gao and J.-S. Wang (2007). "Fumonisin B1 contamination of home-grown corn in high-risk areas for esophageal and liver cancer in China." Food additives and contaminants **24**(2): 181-185.

T

Tannous, J., R. El Khoury, S. P. Snini, Y. Lippi, A. El Khoury, A. Atoui, R. Lteif, I. P. Oswald and O. Puel (2014). "Sequencing, physical organization and kinetic expression of the patulin biosynthetic gene cluster from *Penicillium expansum*." International journal of food microbiology **189**: 51-60.

Tejada-Simon, M. V., L. T. Marovatsanga and J. J. Pestka (1995). "Comparative detection of fumonisin by HPLC, ELISA, and immunocytochemical localization in *Fusarium* cultures." Journal of Food Protection® **58**(6): 666-672.

Temporini, E. D. and H. D. VanEtten (2004). "An analysis of the phylogenetic distribution of the pea pathogenicity genes of *Nectria haematococca* MPVI supports the hypothesis of their origin by horizontal transfer and uncovers a potentially new pathogen of garden pea: *Neocosmospora boniensis*." Current Genetics **46**(1): 29-36.

Tilburn, J., S. Sarkar, D. A. Widdick, E. A. Espeso, M. Orejas, J. Mungroo, M. A. Penalva and H. N. Arst Jr (1995). "The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid-and alkaline-expressed genes by ambient pH." The EMBO journal **14**(4): 779.

Todd, R. B. and A. Andrianopoulos (1997). "Evolution of a fungal regulatory gene family: the Zn(II)2Cys6 binuclear cluster DNA binding motif." Fungal Genetics and Biology **21**(3): 388-405.

Tolaini, V., S. Zjalic, M. Reverberi, C. Fanelli, A. A. Fabbri, A. Del Fiore, P. De Rossi and A. Ricelli (2010). "*Lentinula edodes* enhances the biocontrol activity of *Cryptococcus laurentii* against *Penicillium expansum* contamination and patulin production in apple fruits." International journal of food microbiology **138**(3): 243-9.

Torres, R., M. C. Valentines, J. Usall, I. Viñas and C. Larrigaudiere (2003). "Possible involvement of hydrogen peroxide in the development of resistance mechanisms in Golden Delicious apple fruit." Postharvest Biology and Technology **27**(3): 235-242.

Trienens, M., N. P. Keller and M. Rohlfs (2010). "Fruit, flies and filamentous fungi-experimental analysis of animal-microbe competition using *Drosophila melanogaster* and *Aspergillus* mould as a model system." Oikos **119**(11): 1765-1775.

Tsai, H.-F., Y. C. Chang, R. G. Washburn, M. H. Wheeler and K. J. Kwon-Chung (1998). "The developmentally regulated alb1 gene of *Aspergillus fumigatus*: Its role in modulation of conidial morphology and virulence." Journal of bacteriology **180**(12): 3031-3038.

Tsitsigiannis, D. I., R. Zarnowski and N. P. Keller (2004). "The lipid body protein, PpoA, coordinates sexual and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*." J Biol Chem **279**(12): 11344-53.

U

Urbano, G. R., M. H. Taniwaki, M. d. F. Leitao and M. C. Vicentini (2001). "Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw brazilian coffee." Journal of Food Protection **64**(8): 1226-1230.

Usall, J., N. Teixido, E. Fons and I. Viñas (2000). "Biological control of blue mould on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions." International journal of food microbiology **58**(1-2): 83-92.

V

Vansteelandt, M., I. Kerzaon, E. Blanchet, O. Fossi Tankoua, T. Robiou Du Pont, Y. Joubert, F. Monteau, B. Le Bizec, J. C. Frisvad, Y. F. Pouchus and O. Grovel (2012). "Patulin and

secondary metabolite production by marine-derived *Penicillium* strains." Fungal biology **116**(9): 954-61.

Varga, J., M. Due, J. C. Frisvad and R. A. Samson (2007). "Taxonomic revision of *Aspergillus* section *Clavati* based on molecular, morphological and physiological data." Studies in Mycology **59**: 89-106.

Varga, J., J. C. Frisvad and R. A. Samson (2011). "Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*." Studies in Mycology **69**: 57-80.

Vesonder, R. F., A. Ciegler, A. H. Jensen, W. K. Rohwedder and D. Weisleder (1976). "Co-identity of the refusal and emetic principle from *Fusarium*-infected corn." Applied and Environmental Microbiology **31**(2): 280-285.

Vienken, K., M. Scherer and R. Fischer (2005). "The Zn(II)2Cys6 putative *Aspergillus nidulans* transcription factor repressor of sexual development inhibits sexual development under low-carbon conditions and in submersed culture." Genetics **169**(2): 619-30.

Vilanova, L., I. Viñas, R. Torres, J. Usall, G. Buron-Moles and N. Teixido (2014). "Acidification of apple and orange hosts by *Penicillium digitatum* and *Penicillium expansum*." International journal of food microbiology **178**(0): 39-49.

Vinas, I., J. Usall, N. Teixido and V. Sanchis (1998). "Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*." International journal of food microbiology **40**(1): 9-16.

Voss, K. A., R. T. Riley, C. W. Bacon, W. J. Chamberlain and W. P. Norred (1996). "Subchronic toxic effects of *Fusarium moniliforme* and fumonisin B1 in rats and mice." Natural toxins **4**(1): 16-23.

W

Waksman, S. A. and E. S. Horning (1943). "Distribution of antagonistic fungi in nature and their antibiotic action." Mycologia: 47-65.

Walther, A. and J. Wendland (2012). "Yap1-dependent oxidative stress response provides a link to riboflavin production in *Ashbya gossypii*." Fungal Genetics and Biology **49**(9): 697-707.

Wang, I.-K., C. Reeves and G. M. Gaucher (1991). "Isolation and sequencing of a genomic DNA clone containing the 3'terminus of the 6-methylsalicylic acid polyketide synthetase gene of *Penicillium urticae*." Canadian journal of microbiology **37**(1): 86-95.

White, S., J. O'Callaghan and A. D. Dobson (2006). "Cloning and molecular characterization of *Penicillium expansum* genes upregulated under conditions permissive for patulin biosynthesis." FEMS Microbiol Lett **255**(1): 17-26.

Wiemann, P., D. W. Brown, K. Kleigrewe, J. W. Bok, N. P. Keller, H.-U. Humpf and B. Tudzynski (2010). "FfVel1 and FfLae1, components of a velvet-like complex in *Fusarium fujikuroi*, affect differentiation, secondary metabolism and virulence." Molecular Microbiology **77**(4): 972-994.

Wiemann, P., C. J. Guo, J. M. Palmer, R. Sekonyela, C. C. Wang and N. P. Keller (2013). "Prototype of an intertwined secondary-metabolite supercluster." PNAS **110**(42): 17065-70.

Williams, L. D., A. E. Glenn, A. M. Zimeri, C. W. Bacon, M. A. Smith and R. T. Riley (2007). "Fumonisin disruption of ceramide biosynthesis in maize roots and the effects on plant development and *Fusarium verticillioides*-induced seedling disease." Journal of agricultural and food chemistry **55**(8): 2937-2946.

Wisniewski, M., C. Biles, S. Droby, R. McLaughlin, C. Wilson and E. Chalutz (1991). "Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii.* I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*." Physiological and Molecular Plant Pathology **39**(4): 245-258.

Woloshuk, C. P., K. R. Foutz, J. F. Brewer, D. Bhatnagar, T. E. Cleveland and G. A. Payne (1994). "Molecular characterization of aflR, a regulatory locus for aflatoxin biosynthesis." Appl Environ Microbiol **60**(7): 2408-14.

Woloshuk, C. P., H. D. Sisler, M. C. Tokousbalides and S. R. Dutky (1980). "Melanin biosynthesis in *Pyricularia oryzae*: Site of tricyclazole inhibition and pathogenicity of melanin-deficient mutants." Pesticide Biochemistry and Physiology **14**(3): 256-264.

Y

Yager, L. N. (1992). "Early developmental events during asexual and sexual sporulation in *Aspergillus nidulans*." Biotechnology (USA).

Yiannikouris, A. and J.-P. Jouany (2002). "Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review." Animal Research **51**(2): 81-100.

Yoder, O. C. (1980). "Toxins in pathogenesis." Annual Review of Phytopathology **18**(1): 103-129.

Yu, J. (2012). "Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination." Toxins **4**(11): 1024-1057.

Yu, J., P.-K. Chang, J. W. Cary, M. Wright, D. Bhatnagar, T. E. Cleveland, G. A. Payne and J. E. Linz (1995). "Comparative mapping of aflatoxin pathway gene clusters in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*." Applied and Environmental Microbiology **61**(6): 2365-2371.

Yu, J., P. K. Chang, K. C. Ehrlich, J. W. Cary, D. Bhatnagar, T. E. Cleveland, G. A. Payne, J. E. Linz, C. P. Woloshuk and J. W. Bennett (2004). "Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis." Applied and Environmental Microbiology **70**(3): 1253-62.

Yu, J. H., R. A. Butchko, M. Fernandes, N. P. Keller, T. J. Leonard and T. H. Adams (1996). "Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene aflR from *Aspergillus nidulans* and *A. flavus*." Current Genetics **29**(6): 549-55.

Z

Zalokar, M. (1954). "Studies on biosynthesis of carotenoids in *Neurospora crassa*." Archives of biochemistry and biophysics **50**(1): 71-80.

Zamir, L. O. (1980). "The biosynthesis of patulin and penicillic acid." The Biosynthesis of Mycotoxins: A Study in Secondary Metabolism: 223-68.

Zinedine, A., J. M. Soriano, J. C. Molto and J. Manes (2007). "Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin." Food and Chemical Toxicology **45**(1): 1-18.

SNINI S.P. 2014

Elucidation of a mycotoxin biosynthesis pathway, the patulin: Gene cluster characterization and study of its regulation

Supervised by: Dr. Isabelle OSWALD and Dr. Jean-Denis BAILLY

Abstract

Penicillium expansum is the common contaminant of apples and the causal agent of blue mold rot. This fungus is the main patulin producer in apple based products. Actually, the patulin biosynthesis is partially elucidates and the gene cluster has been elucidated in *Aspergillus clavatus,* a telluric fungi unable to grow on apples. The molecular characterization of the patulin biosynthetic pathway is the key step for a better understanding of the mechanisms leading to patulin production and will help to define strategies to reduce its presence in apple products. The first objective of this thesis was the characterization of the patulin gene cluster in *Penicillium expansum*. The latter includes the same 15 genes as in *Aspergillus clavatus* but in a different order and orientation. Then, the second step of this biosynthetic pathway has been characterized and the *patG* gene encode for the 6-methylsalicylic decarboxylase involved in the 6- methylsalicylic acid conversion into m-cresol. The second objective consists of the study of the patulin regulation. For that, a *patL* mutated strain was generated and the patulin production and the patulin gene cluster expression were assessed. The mutation of this gene results in a down-regulation of the rest of the genes in the cluster associated with a lack of patulin production. Pathogenicity tests on apples revealed that patulin could act as a virulence factor in some apple varieties, like Golden Delicious or Pink Lady. In the last part of this thesis, the influence of different wavelength lights on the growth and the patulin production by *Penicillium expansum* were assessed *in vitro* and *in vivo*. In both cases, growth and patulin production were significantly affected under white, blue and red lights. Consequently, the apple storage under these lights could be a good alternative to the storage in the dark. In conclusion, this thesis presents a fundamental aspect that consist in the characterization of the patulin gene cluster in *Penicillium expansum* and the characterization of the second step of this pathway. An applied aspect is also provided by the use of the different wavelength lights to prevent the *Penicillium expansum* contamination during apple storage.

Key word
Penicillium expansum, patulin, biosynthesis, regulation, pathogenicity, apple, light.

Discipline
Pathology, Toxicology, Genetic and Nutrition

Heading and adress of the laboratory
Institut National de la Recherche Agronomique - INRA
Unité Toxalim - UMR 1331
Laboratoire Biosynthèse et Toxicologie des Mycotoxines
180, chemin de Tournefeuille - B.P. 93173
31027 Toulouse cedex 9 - France
SNINI S.P. 2014

SNINI S.P. 2014

Elucidation de la voie de biosynthèse d'une mycotoxine, la patuline : Caractérisation du cluster de gènes et étude de la régulation.

Sous la direction de : Dr. Isabelle OSWALD et Dr. Jean-Denis BAILLY

Résumé
Penicillium expansum est un contaminant commun des *pomaceae* (pommes et poires) causant la pourriture bleue. Ce champignon est le principal responsable de la présence de patuline dans les pommes et ses produits dérivés. Actuellement, la voie de biosynthèse de la patuline n'est que partiellement élucidée et le cluster de gènes correspondant n'est décrit que chez *Aspergillus clavatus*, champignon tellurique incapable de se développer dans les pommes. La caractérisation moléculaire de la voie de biosynthèse de la patuline est la condition *sine qua none* à toute étude visant à comprendre la régulation de la biosynthèse de la patuline, mais également à toute action permettant de limiter sa synthèse. C'est pourquoi le premier objectif de cette thèse a été de caractériser le cluster de gènes spécifique de la voie de biosynthèse chez *Penicillium expansum.* Celui-ci est caractérisé par un taille de 40 kb et contient les 15 mêmes gènes qu'*Aspergillus clavatus,* les seules différences résidant dans l'organisation et l'orientation des gènes. La caractérisation de la seconde étape de la voie de biosynthèse de la patuline a été ensuite entreprise chez *Aspergillus clavatus*, organisme modèle. Le gène *patG* code pour l'acide 6-méthylsalicylique décarboxylase responsable de la conversion de l'acide 6-méthylsalicylique en *m*-crésol. Pour faire suite au premier objectif, la régulation de la voie de biosynthèse de la patuline a été étudié. Pour cela, une souche mutante pour le facteur de régulation spécifique à la patuline *patL* a été généré puis la production de patuline ainsi que l'expression des gènes du cluster analysés. Les résultats de cette étude ont montré que le gène *patL* joue le rôle d'interrupteur au sein du cluster. L'absence de *patL* conduit à une extinction totale de l'expression des gènes du cluster et à une abscence de production de patuline par *Penicillium expansum*. Dans cette même étude, des tests de pathogénicité ont été entrepris sur des pommes de différentes variétés démontrant ainsi que la patuline peut être un facteur de virulence facilitant l'infection de certaines variétés de pommes telles que la Golden Delicious ou la Pink Lady. Enfin, l'influence de la lumière a été évalué en analysant l'impact de différentes longueurs d'ondes sur la croissance et la production de patuline de *Penicillium expansum*. Que ce soit *in-vitro* ou *in-vivo,* la croissance et la production de patuline sont très affectés par les lumières blanche, bleue et rouge. Favoriser le stockage des pommes sous les lumières blanche, bleue ou rouge plutôt qu'à l'obscurité pourrait devenir un moyen de prévention contre la contamination par *Penicillium expansum*. En conclusion, cette thèse présente un aspect fondamental avec la caractérisation du cluster de gènes chez *Penicillium expansum* et la caractérisation de la seconde étape de la voie de biosynthèse de la patuline ; mais aussi un aspect appliqué avec l'utilisation des lumières de différentes couleurs comme méthode de prévention contre *Penicillium expansum* durant le stockage des pommes.

Mots clés
Penicillium expansum, patuline, biosynthèse, régulation, pathogénicité, pommes, lumière

Discipline
Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Intitulé et adresse du laboratoire
Institut National de la Recherche Agronomique - INRA
Unité Toxalim - UMR 1331
Laboratoire Biosynthèse et Toxicologie des Mycotoxines
180, chemin de Tournefeuille - B.P. 93173
31027 Toulouse cedex 9 - France