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 JOANNA TANNOUS

le vendredi 27 mars 2015

Titre :

PATULINE, MYCOTOXINE DE PENICILLIUM EXPANSUM, PRINCIPAL PATHOGENE POST-RECOLTE DES POMMES: NOUVELLES DONNEES SUR SA BIOSYNTHESE ET DEVELOPPEMENT D'APPROCHES PREVENTIVES

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

TOXALIM

Directeur(s) de Thèse :

MME ISABELLE OSWALD

M. ROGER LTEIF

Rapporteurs :

M. BASSAM BADRAN, UNIVERSITE LIBANAISE BEYROUTH

Mme LIEVE HERMAN, ILVO

Membre(s) du jury :

M. BASSAM BADRAN, UNIVERSITE LIBANAISE BEYROUTH, Président

M. ALI ATAOUI, UNIVERSITE LIBANAISE BEYROUTH, Membre

M. ANDRE EL KHOURY, UNIVERSITE ST JOSEPH DE BEYROUTH LIBAN, Membre

Mme ISABELLE OSWALD, INRA TOULOUSE, Membre

M. OLIVIER PUEL, INRA TOULOUSE, Membre

M. ROGER LTEIF, UNIVERSITE ST JOSEPH DE BEYROUTH LIBAN, Membre

Je dédie le fruit de ces longues années d'études…

~ A la mémoire de mon cher père disparu trop tôt…

A celle qui m'a transmis la vie, l'amour et le courage… Maman, l'arbre que tu as cultivé a maintenant produit ~

Remerciements

Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent
du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers
par qui nos âmes sont fleuries.
~Marcel Proust ~

Cette thèse a été pour moi une riche expérience qui ne peut se couronner sans remercier toutes les personnes qui m'ont encadrée, dirigée, aidée et soutenue au cours de ces trois dernières années et ont rendu possible l'avènement de ce travail de thèse. Il m'est aujourd'hui difficile de n'en oublier aucune personne, pour cela je tiens à remercier par avance ceux dont le nom n'apparait pas dans ces pages.

Mes pensées se dirigent tout d'abord à mes deux directeurs de thèse. Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à ***Mme. Isabelle Oswald*** *pour m'avoir tout d'abord accueilli au sein de son équipe, pour la confiance qu'elle m'a toujours accordée, pour ses brillantes idées et pour sa disponibilité malgré ses nombreuses autres occupations. Votre compétence, votre clairvoyance et votre oeil critique de directrice m'ont beaucoup appris ! Un grand merci à* ***M. Roger Lteif****, dont les grandes qualités professionnelles, mais surtout humaines, m'ont aidée à aller au bout de ce travail ! Votre énergie positive et votre confiance ont été des éléments moteurs pour moi avant chaque grand combat. J'espère avoir été digne de la confiance que vous m'avez accordée et que ce travail est finalement à la hauteur de vos espérances. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec vous !*

" On n'a que peu de reconnaissance pour un maître, quand on reste toujours élève" - Friedrich Nietzsche- . J'aimerais remercier mon encadrant de thèse, ***M. Olivier Puel****, pour m'avoir appris à être moins « bonne élève » et plus autonome tout au long de cette thèse. L'idée de voler de mes propres ailes était au début un peu effrayante, mais j'ai une sensation d'avoir grandi, d'avoir conquis une confiance scientifique grâce à toi ! Merci Olivier pour m'avoir appris l'enthousiasme de la recherche… Merci pour toutes les discussions sur le travail et les manipulations… Merci de m'avoir partagé tes connaissances scientifiques et ton incomparable compétence en biologie moléculaire. Ton esprit de synthèse et ton aptitude à diriger un projet de recherche resteront pour moi un exemple à suivre… Finalement, il manque un grand merci pour le temps précieux que tu as pris pour relire et améliorer la qualité des différentes parties de ce manuscrit ! Je souhaite à tous les futurs doctorants d'avoir un encadrant de cette ampleur !*

Les mots me manquent pour exprimer ma gratitude à mes deux encadrants de thèse au Liban, ***M. André El Khoury*** *et* ***M. Ali Atoui.*** *Je vous remercie d'avoir en tout début cru en mes compétences et de m'avoir donné la chance de réaliser ce rêve… Votre soutien indéfectible, votre attention de tout instant sur mes travaux, vos conseils avisés et votre écoute ont été prépondérants pour la bonne réussite de cette thèse. J'ai beaucoup apprécié travailler à vos côtés*

tant sur le plan scientifique que sur le plan humain ! Cette thèse vous doit beaucoup… Pour tout cela merci !

Mes remerciements s'adressent aux rapporteurs ***Mme Lieve Herman*** *et* ***M. Bassam Badran*** *et à l'ensemble des membres du jury pour m'avoir fait l'honneur d'examiner cette dissertation doctorale.*

Je tiens à remercier le doyen de la Faculté des Sciences de l'Université Saint-Joseph ***M. Toufic Rizk*** *pour sa bienveillance et son esprit scientifique d'avoir encouragé la recherche au sein de la faculté.*

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans l'aide de différents financeurs qui, à travers leur soutien matériel, ont reconnu mon travail et m'ont fait confiance, je remercie vivement ***le Conseil de l'Université Saint- Joseph, Liban****, l'****Institut Français*** *et le* ***CNRS libanais.***

Au cours de ces trois années de thèse j'ai fait partie de l'équipe 5 « Biosynthèse et toxicité des mycotoxines » du centre INRA de Saint Martin du Touch à Toulouse. Je tiens à exprimer d'abord toute ma reconnaissance à ***M. Bernard Salles****, directeur de l'UMR 1331 TOXALIM pour m'avoir accueilli au sein de l'INRA et pour avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à la réalisation de mes travaux. Au sein de cette équipe, j'ai eu la chance d'avoir une famille de cœur. J'aimerai remercier toutes les personnes formidables avec qui j'ai partagé les plus beaux moments de ces trois années. Un immense merci à «ma So», pour la maman que tu m'as été à tout moment. Pendant les baisses de moral, tu as toujours été présente pour m'épauler et me combler par ton amour et ta tendresse. Ma chère* ***Soraya*** *je ne t'oublierai jamais ! Je pense particulièrement à* ***Joëlle****, je te remercie pour ta gentillesse, ton sourire et ton plaisir à rendre service à tout moment ! J'exprime une reconnaissance particulière à* ***Philippe*** *pour sa précieuse contribution à l'accomplissement des manips de toxicité, qui tout au début étaient quelque chose de mystérieux pour moi ! Une mention spéciale à* ***Jean Denis*** *et* ***Sylviane Bailly*** *pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire. Je vous remercie pour votre disponibilité et votre gentillesse. Je tiens également à adresser un remerciement spécial à* ***Arlette*** *et* ***Alain****, avec qui j'ai eu l'occasion de faire la manip ergostérol à l'école vétérinaire de Toulouse dans d'aussi bonne ambiance ! Je suis très reconnaissante du temps que m'aviez accordé. Une pensée très chaleureuse à toute l'équipe, l'esprit qui nous rassemblait était unique. Les moments passés ensembles resteront gravés dans ma mémoire pour toujours.*

Mes sincères remerciements vont aussi à ***M. Christian Barreau****, examinateur externe de ma thèse qui a fait durant ces trois années partie de mon comité de suivi de thèse.*

Ces remerciements ne peuvent s'achever, sans une pensée pour ceux qui ont croisé ma route et l'ont toujours orné …

… de conseils, d'expériences, de vigilance et d'encouragements. Un grand merci à ***Mme Mireille Kallassy Awad,*** *qui m'a soutenue et encouragée pendant toutes ces années académiques.*

… de générosité, de conseils et de beaucoup de soutien. Mille mercis à ***M. Joseph Yaghi*** *pour le réconfort moral pendant les périodes difficiles de la thèse et surtout pour la confiance qu'il m'a accordé en me conférant l'assistance des TPs chaque année!*

…de coups de main, de contribution et de compétences, Merci à ***M. Charbel Afif*** *pour m'avoir aidé dans les analyses d'HPLC, merci pour ta générosité humaine, ton expérience et ta pertinence scientifique. Merci à* ***M. Dominique Salameh*** *pour sa collaboration dans ce travail, en nous procurant des échantillons de pommes qui ont servi pour certaines analyses. Je n'oublierai pas de mentionner la contribution de* ***M. Ziad Francis*** *qui a consacré un temps précieux à me faire les modélisations en langage C++.*

… de sourires et d'amitié, Je remercie vivement tous mes amis, d'ici et de là-bas. Je pense spécialement à mon amie d'enfance ***Sabine,*** *à* ***Caren, Stéphanie, Rayane, Karl, Youssef*** *et les nombreuses* ***"Lara" Mouaffak, Feghali*** *et* ***Husseiny****. Merci à tous les étudiants stagiaires avec qui j'ai eu le plaisir de faire un bout de chemin :* ***Joanne, Sally, Nader*** *et* ***Elie****. Merci à tous les thésards actuels ou anciens de la faculté des Sciences :* ***Mandy, Farah, Nada, Joyce, Rachelle, Racha, Dayana, Zeinoun, Dana, Séréna, Stéphanie, Léa, Hiba*** *et* ***Jad,*** *pour les moments inoubliables qu'on a passé ensemble et les nombreux fous rires qu'on a échangé dans notre « fameuse salle des doctorants » ! A mes deux chères collègues :* ***Selma*** *et* ***Rhoda****, du ''Team patuline'', un grand merci pour tous les bons moments que nous avons passé ensemble et les manipulations qu'on a partagé… Ils seront de bons souvenirs inoubliables pour moi ! Un grand Merci à tous les stagiaires, thésards et post-doctorants de l'INRA avec qui j'ai partagé une salle, un café, un repas à la cantine :* ***Alix, Sophal, Sabria, Pascal, Delphine, Leticia, Viviane, Amaranta, Patricia, Immourane, Yann, Julie, Isaura, Brankica, Mélanie, Joya, Duncan*** *et* ***Antoine.*** *Ce fut de belles rencontres… Je ne peux que vous souhaitez une bonne continuation !*

La thèse a été une période difficile pour mes proches. Elle est très preneuse de temps ! Et j'avoue ne pas les avoir consacré le temps qu'ils le méritent. J'adresse, enfin et surtout, ma plus profonde gratitude et tout mon amour à quelques personnes chères qui comptent énormément pour moi…

Un remerciement spécial à mes cousins et cousines : ***Jad, Samar, Etienne et Joëlle,*** *à mes tantes et mes grands-mères d'avoir été présents aux côtés de ma mère pendant ces mois que j'ai passé en France ! Merci pour votre amour et votre soutien discret et essentiel.*

*A mon cher fiancé **Khalil**…Je te remercie pour ton soutien quotidien indéfectible, ta patience infinie et ton enthousiasme expansif à l'égard de mes travaux comme de la vie en général. Notre couple a grandi en même temps que mon projet scientifique.*

*Un énorme merci à la fille, l'amie, la sœur dont la bienveillance et le soutien, même à l'autre bout du monde, n'ont jamais défailli ! Ma chère **Romy** les mots me manquent pour te remercier pour ton aide immense, ton amour tout aussi grand, pour toutes ces innombrables choses, petites et grandes que tu as fait pour moi durant ces trois années! Les moments qu'on a passés ensemble pendant tes visites à Toulouse resteront à jamais de très beaux souvenirs gravés dans ma mémoire ! Notre rencontre m'a permis de comprendre enfin tout ce que signifie le mot AMITIÉ!*

*Voilà ! Je suis arrivée au bout et mon dernier remerciement c'est pour toi **Liliane**! Maman, ta présence et tes encouragements ont été pour moi les piliers fondateurs et la source de ce que je suis et de tout ce que je réalise au travail et dans la vie. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ça! J'espère que tu es aujourd'hui fière de moi, de la personne que TU as fait de moi !*

Joanna Tannous

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES viii
TABLE DES ILLUSTRATIONS x
LISTE DES ABRÉVIATIONS xiii

INTRODUCTION

CONTEXTE DE L'ETUDE 1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 3
A. Moisissures, métabolisme secondaire et mycotoxines 4
A.1. Les moisissures: Des champignons filamenteux microscopiques 4
A.2. Les mycotoxines 6
B. *Penicillium expansum* : Le champignon et le pathogène 22
B.1. Classification, morphologie et traits distinctifs 22
B.2. Caractéristiques physiologiques 24
B.3. Habitat et niche écologique 27
B.4. Principaux métabolites secondaires élaborés par *P. expansum* 27
C. La patuline 29
C.1. Aperçu historique 29
C.2. Aspect chimique : Propriétés physico-chimiques 29
C.3. Production de la patuline par les champignons toxinogènes 30
C.4. Occurrence de la patuline dans l´alimentation 32
C.5. Les voies de biosynthèse 35
C.6. Les facteurs régissant la production de patuline par *P. expansum* 43
C.7. Données toxicologiques relatives à la patuline 45
C.8. Règlementations spécifiques à la patuline 53
C.9. Les méthodes de détection et de quantification de la patuline et ses champignons producteurs dans les denrées alimentaires 54
C.10. Incidence mondiale de la contamination par la patuline dans les produits à base de pomme 59

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL

CHAPITRE 1 Caractérisation des conditions physico-chimiques de croissance et de toxinogénèse de Penicillium expansum

1.1. Résumé de l'étude 62
1.2. Article: A study on the physicochemical parameters for *Penicillium expansum* growth and patulin production: Effect of temperature, pH and water activity *(ARTICLE 1)* 63

CHAPITRE 2 Caractérisation du cluster des gènes de la patuline chez Penicillium expansum

2.1. Résumé de l'étude 89

2.2. Article: Sequencing, physical organization and kinetic expression of the patulin biosynthetic gene cluster from *Penicillium expansum (ARTICLE 2)* 90

CHAPITRE 3 Caractérisation biochimique des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la patuline

3.1. Caractérisation du gène patL codant un facteur de transcription spécifique de la voie de biosynthèse de la patuline 109

3.1.1. Résumé de l'étude 109

3.1.2. Article: The disruption of *patL,* the patulin specific transcription factor affects *Penicillium expansum* virulence on apples *(ARTICLE 3)* 111

3.1.3. Analyses complémentaires à l'étude: Etude de l'implication de la patuline dans la virulence de *P. expansum* sur d'autres variétés de pommes 142

3.2. Caractérisation du gène patE codant pour l'enzyme impliquée dans la dernière étape de la voie de biosynthèse de la patuline 158

3.2.1. Résumé de l'étude 158

3.2.2. Article: Targeted disruption of the *patE* gene: Characterization of the final step in the patulin biosynthesis and toxicity assessment of the last two products of this pathway *(ARTICLE 4)* 159

CHAPITRE 4 Développement d'un système qPCR pour la quantification de P.expansum et la patuline dans les pommes

4.1. Résumé de l'étude 187

4.2. Article: Development of a Real-Time PCR assay for *Penicillium expansum* quantification and patulin estimation in apples *(ARTICLE 5)* 188

DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Résultats pertinents de la thèse et améliorations apportées 199

Analyse critique et discussion des résultats 201

Conclusion générale et Perspectives 229

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 232

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

PUBLICATIONS

Joanna Tannous, Ziad Francis, Ali Atoui, André El Khoury, Olivier Puel, Isabelle P. Oswald, Roger Lteif. A study on the physicochemical parameters for *Penicillium expansum* growth and patulin production: Effect of temperature, pH and water activity. "Manuscrit soumis dans *Food Microbiology* ".

Joanna Tannous , Rhoda El Khoury, Selma P. Snini, Yannick Lippi, André El Khoury, Ali Atoui, Roger Lteif, Isabelle P. Oswald, Olivier 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.

Selma P. Snini, Joanna Tannous, Pauline Heuillard, Sylviane Bailly, Yannick Lippi, Enric Zehraoui, Christian Barreau, Isabelle P. Oswald, Olivier Puel. The disruption of *patL*, the patulin specific transcription factor affects *Penicillium expansum* virulence on apples. "Manuscrit en préparation".

Joanna Tannous, Leticia Murate, Philippe Pinton, Thierry Gauthier, Selma P. Snini, André El Khoury, Ali Atoui, Ting Zhou, Roger Lteif, Isabelle P. Oswald, Olivier Puel. Targeted disruption of the *patE* gene: Characterization of the final step in the patulin biosynthesis and toxicity assessment of the last two products of this pathway "Manuscrit en préparation".

Joanna Tannous, Ali Atoui, André El Khoury, Sally Kantar, Nader Chdid, Isabelle P. Oswald , Olivier Puel, Roger Lteif. Development of a Real-Time PCR assay for *Penicillium expansum* quantification and patulin estimation in apples. *Food Microbiology* 50, 28-37.

COMMUNICATIONS ORALES

Joanna Tannous, André El Khoury, Ali Atoui, Olivier Puel, Isabelle P. Oswald, Roger Lteif, 2014. Development of a Real-Time PCR assay for *Penicillium expansum* quantification and patulin estimation in apple samples. *20th Annual LAAS Conference*. 27-29 March. Hadath, Lebanon.

Joanna Tannous , Selma P. Snini , Rhoda El Khoury , Yannick Lippi , André El Khoury, Ali Atoui, Roger Lteif, Isabelle P. Oswald, Olivier Puel, 2014. Caractérisation du cluster de gènes impliqués dans la biosynthèse de la patuline chez *Penicillium expansum. 5ème journée Mycotoxines*. 5-6 Juin. Montpellier, France.

Joanna Tannous, Selma P. Snini, Rhoda El Khoury, Yannick Lippi, André El Khoury, Ali Atoui, Roger Lteif, Isabelle P. Oswald, Olivier Puel, 2014. Patulin is significantly involved in the development of blue mold decay on apples. *14th Congress Mediterranean Phytopathological Union & International Society of Mycotoxicology*. August 25-29. Istanbul, Turkey.

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

Joanna Tannous, Rhoda El Khoury, Selma P. Snini, Yannick Lippi, André El Khoury, Ali Atoui, Roger Lteif, Isabelle P. Oswald, Olivier Puel, 2014. Sequencing, physical organization and kinetic expression of the patulin biosynthetic gene cluster from *Penicillium expansum*. *36th Mycotoxin Workshop*. June 16-18. Göttingen, Germany.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

TABLE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1 : Les structures chimiques des mycotoxines majeures 8
Figure 2 : Les origines biosynthétiques des mycotoxines majeures. 12
Figure 3 : Schéma hypothétique du fonctionnement de l'acide 6-méthylsalicylique synthase synthétisant le polycétide 6-MSA, précurseur de la patuline. 16
Figure 4 : Organisation des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des aflatoxines au sein d'un cluster de 70-kb chez Aspergillus flavus. 18
Figure 5 : Protéines régulatrices globales impliquées dans la régulation des clusters de gènes impliqués dans la production de divers métabolites secondaires fongiques. 21
Figure 6 : Structures morphologiques de Penicillium expansum 22
Figure 7 : Observations macroscopiques de Penicillium expansum. 24
Figure 8 : Structure chimique et modèle moléculaire de la patuline 30
Figure 9 : (a) Voie biochimique de la biosynthèse de la patuline et (b) Cluster des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la patuline chez Aspergillus clavatus NRRL1. 37
Figure 10 : Schéma illustratif des principales applications de dosage et de détection de la patuline et ses champignons producteurs dans les denrées alimentaire. 58

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL

Chapitre 1:

A study on the physicochemical parameters for Penicillium expansum growth and patulin production: Effect of temperature, pH and water activity

Figure 1 : Growth curves (A), radial growth rates (cm/day) (B) and patulin production (ppm) of Penicillium expansum NRRL 35695 on Czapek glucose agar medium under different temperatures. 75
Figure 2 : The colony appearance (surface and reverse) of P. expansum isolate NRRL 35695 after fourteen days of growth on Czapek glucose agar media under a wide range of temperatures 75
Figure 3 : Growth curves (A), radial growth rates (cm/day) (B) and patulin production (ppm) of Penicillium expansum NRRL 35695 on Czapek glucose agar medium under modified water activity. 77
Figure 4 : Growth curves (A), radial growth rates (cm/day) (B) and patulin production (ppm) of Penicillium expansum NRRL 35695 on Czapek glucose agar medium under modified pH. 78
Figure 5 : Three-dimensional response surfaces showing the expected growth rates (cm/day) determined by the developed model as a function between temperature and a_W (A), temperature and pH (B) and pH and a_W (C). ... 80
Figure 6 : Comparison of the predicted and the observed P. expansum growth responses on apples. 81

Chapitre 3:

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

Figure 1 : Construction of PeΔpatL mutant. 125
Figure 2 : Southern blot analysis of the genomic DNA of the wild-type, the PeΔpatL1 transformant and the complemented transformant PeΔpatL: patL. 125

Figure 3 : Morphological aspect of NRRL 35695, PeΔpatL1 and complemented strains after 7 days of culture at 25 °C on PDA and MEA. ... *127*
Figure 4 : Patulin production on APAM medium and on Golden Delicious apples. ... *129*
Figure 5 : HPLC analysis of the wild-type strain NRRL 35695 and the mutant strain PeΔpatL1 extracts from Czapek agar medium. ... *129*
Figure 6 : Growth curves of the rotten spots and growth rates. ... *130*
Figure 7 : Volume of the rot on Golden Delicious apples. ... *130*
Figure 8 : Kinetic of the patulin production on apples. ... *131*
Figure 9 : Expressions of the patulin biosynthesis genes in the wild-type strain NRRL 35695, the mutant strain PeΔpatL1 and the complemented strain PeΔpatL: patL. ... *132*
Figure S1: Strategy employed to construct the deletion cassette PeΔpatL. ... *173*

Analyses complémentaires à l'étude: Etude de l'implication de la patuline dans la virulence de *P. expansum* sur d'autres variétés de pommes
Figure 10 : Schéma de la mesure du pH des pommes à l'aide du pH-mètre à électrode spécialement conçue pour la mesure du pH des produits alimentaires. ... *143*
Figure 11 : Photo montrant le tissu infecté d'une pomme avec les différentes variables utilisées pour le calcul du volume de la pourriture. ... *144*
Figure 12 : Lésions dues à la pourriture bleue sur différentes variétés de pommes infectées par la souche sauvage de Penicillium expansum NRRL 35695 et la souche mutante PeΔpatL1. ... *146*
Figure 13 : De gauche à droite : Graphiques montrant l'évolution régulière des lésions brunes, Histogrammes montrant les vitesses de développement de ces lésions brunes et les volumes de pourriture pour les différentes variétés de pommes à couteau infectées par la souche sauvage de P. expansum (NRRL 35695) et la souche mutante (PeΔpatL1). ... *147*
Figure 14 : Teneurs en patuline exprimées en µg/g de pommes dans les différentes variétés de pommes infectées simultanément par la souche sauvage de P. expansum NRRL 35695 et la souche mutante PeΔpatL1. ... *150*
Figure 15 : Représentation schématique des mécanismes de défense impliqués dans l'inhibition de la pénétration fongique. ... *157*

Targeted disruption of the *patE* gene: Characterization of the final step in the patulin biosynthesis and toxicity assessment of the last two products of this pathway
Figure 1 : The suggested biosynthetic pathway from acetyl-CoA and malonyl-CoA building blocks to patulin. .. *164*
Figure 2 : Schematic representation to scale of the patE gene disruption in Penicillium expansum. ... *168*
Figure 3 : Cyclization of versiconal hemiacetal to versicolorin B and ascladiol to patulin. ... *171*
Figure 4 : High-performance liquid chromatography (HPLC)-UV chromatograms of the ascladiol standard solution (A), the wild-type NRRL 35695 extract (B) and the PeΔpatE19 extract (C). ... *173*
Figure 5 : Confirmation of the PeΔpatE19 deletion mutant by PCR and Southern blotting... *174*
Figure 6 : (A) High-performance liquid chromatography (HPLC)-UV chromatograms of the PeΔpatE19 purified metabolite and (B) High resolution MS/MS spectra of ascladiol... *175*
Figure 7 : Percentage of proliferation of Caco-2 cells treated with increasing patulin and ascladiol concentrations determined by CellTiter-Glo assay. ... *178*
Figure S1: Strategy employed to construct the deletion cassette PeΔpatE.... *173*

DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSION ET PERSPÉCTIVES

Figure 1 : Stucture du cluster des gènes impliqués dans la voie de biosynthèe de la patuline chez P. expansum et analyse comparée de l'organisation des gènes orthologues présents dans d'autres génomes fongiques. ... *204*
Figure 2 : Arbres phylogénétiques déduits des séquences partielles des gènes patK (A), patH et patI (B) du cluster de la patuline chez P. expansum ainsi que leurs gènes orthologues chez d'autres espèces fongiques, sélectionnées dans la banque de référence GenBank. ... *207*
Figure 3 : Résultats de l'analyse BLAST des séquences des gènes du cluster de la patuline chez P. expansum. *227*

TABLEAUX

INTRODUCTION

Tableau 1 : Les principales mycotoxines : Moisissures productrices associées, denrées favorables effets toxiques majeurs et valeurs toxicologiques de référence (Cast 2003; AFSSA 2009) 9
Tableau 2 : Clusters de gènes prédits chez 12 espèces fongiques par le logiciel informatique SMURF 13
Tableau 3 : Exemples de facteurs de transcription Zn_2Cys_6 impliqués dans la biosynthèse des mycotoxines 19

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL

Chapitre 1:

A study on the physicochemical parameters for *Penicillium expansum* growth and patulin production: Effect of temperature, pH and water activity

Table 1 : Validation set of conditions of the predictive model for P. expansum growth and patulin production 72

Chapitre 2:

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

Table S1 : Orthologous genes of the patulin metabolic pathway across different fungi used for primer design .. 101
Table S2 : Primers used in this study to amplify the patulin gene cluster in P. expansum 102
Table S3 : Primer sequences used to determine the 3' and 5' extremities by RACE-PCR 105
Table S4 : Primer sequences used in real-time PCR assays 107
Table S5 : Comparison of A. clavatus, P. chrysogenum and P. digitatum nucleotide and amino acid sequences with the orthologs in P. expansum 108

Chapitre 3:

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

Table 1 : Primers used in this study 117

Analyses complémentaires à l'étude: Etude de l'implication de la patuline dans la virulence de *P. expansum* sur d'autres variétés de pommes

Tableau 2 : pH moyen des différentes variétés de pomme. 151

Targeted disruption of the *patE* gene: Characterization of the final step in the patulin biosynthesis and toxicity assessment of the last two products of this pathway

Table 1 : Primers used in this study 166

DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSION ET PERSPÉCTIVES

Tableau 1 : Sites de liaisons potentiels pour des facteurs de régulation identifiés en amont des gènes de la voie de biosynthèse de la patuline chez P. expansum. 211
Tableau 2 : Exemples de métabolites secondaires régulés par l'azote, d'après Tudzynski (2014). 213
Tableau 3 : Exemples de modèles mathématiques développés pour prédire la croissance fongique 225

LISTE DES ABRÉVIATIONS

˚C	Degré Celsius
λ max	Longueur d'onde maximale
µg/Kg/jour	Microgramme par kilogramme de poids corporel par jour
µg/L	Microgramme par litre
ABC	ATP Binding Cassette
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
ALARA	As Low As Reasonnably Achievable
AOAC	Association of Analytical Communities
APAM	Apple Puree Agar Medium
ARS	Agricultural Research Service
ATCC	American Type Culture Collection
a_W	Water activity/Activité de l'eau
a_{Wmin}	Minimal Water activity /Activité de l'eau minimale
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CAST	Council for Agricultural Science and Technology
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance
cm	Centimètre
Ct	Cycle threshold
CYA	Czapek Yeast Agar
DI	Damage Index
DJTP	Dose Journalière Tolérable Provisoire
DL_{50}	Dose létale 50 %
DNA	Deoxyribonucleic acid
DON	Déoxynivalénol
DOM-1	Déoxynivalénol déepoxydé
EPS	Extraction en Phase Solide

FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
g	gram
GMC	Glucose méthanol Choline
GY	Glucose Yeast Extract
HPLC-DAD	High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection
IAC	Internal Amplification Control
IARC	International Agency for Research on Cancer
IFPC	Institut Français des Productions Cidricoles
Ig	Immunoglobuline
ITS	Internal Transcribed Spacer
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
MEA	Malt Extract Agar
MFS	Major Facilitator Superfamily
mg/Kg	Milligramme par kilogramme
min	Minutes
mm	Millimètre
MS	Mass Spectrometry
MSAS	Méthyle Salicylique Synthase
NIV	Nivalénol
nm	nanomètre
NRRL	Northern Regional Research Laboratory
pb/bp	paire de bases/base pair
PCNB	Pentachloronitrobenzene
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
PDAB	Potato Dextrose Agar and Benomyl
PDB	Potato Dextrose Broth
PEG	Polyéthylène Glycol
pH	potential of Hydrogen
PKS	Polyketide Synthase
ppb	Partie Par Billion

ppm	Partie Par Million
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Reactive Oxygen Species
SCF/JECFA	Scientific Committee for Food/Joint Expert Committee on Food Additives
SEM	Standard Error Mean
SMURF	Secondary Metabolite Unknown Region Finder
T	Température
UE/EU	Union Européenne/European Union
UICPA	Union Internationale de la Chimie Pure et Appliquée
US	United states
USFDA	United States Food and Drug Administration
UV	Ultra-violet
v:v	Volume par volume
WT	Wild-type
YES	Yeast Extract with Supplements



INTRODUCTION

CONTEXTE DE L'ETUDE

Depuis la période historique, où l'homme a commencé à pratiquer l'agriculture et à stocker les aliments, la croissance fongique indésirable est devenue une calamité inévitable, conséquence d'un processus de détérioration ou d'une contamination due à une mauvaise manipulation. Le risque microbiologique survenant de « l'attaque » des aliments par ces champignons saprophytes ne se réduit pas simplement à l'occurrence de ces êtres minuscules mais réside aussi en la présence de métabolites toxiques appelés « mycotoxines » qu'ils élaborent dans l'aliment envahi. Le danger est d'autant important que l'élimination de ces toxines reste une tâche laborieuse, coûteuse et limitée à certaines denrées destinées à la consommation animale. Le terme mycotoxine a vu le jour avec la découverte des aflatoxines qui date du début des années 1960. Dès lors, de nombreux pays se sont dotés de règlementations visant à protéger les consommateurs des conséquences néfastes des mycotoxines susceptibles de contaminer les denrées alimentaires et à garantir des pratiques correctes en matière de commerce des produits alimentaires. A la célèbre famille des aflatoxines, s'ajoutent nombreuses molécules identifiées comme mycotoxine en raison de leur implication évidente dans nombreuses intoxications alimentaires. Certaines sont étudiées avec la plus grande attention d'autres sont restées relativement à l'ombre et n'ont fait l'objet d'une règlementation que dernièrement. C'est le cas de la patuline!

Soixante-dix ans, environ l'équivalent de deux générations, nous séparent de la découverte de la patuline faite par Waksman et ses collaborateurs (1942). À cette époque, la patuline était considérée comme un antibiotique prometteur, efficace contre la congestion nasale et le rhume. Cinquante-cinq ans seulement nous séparent de l'intégration « irréversible » de cette molécule dans la classe des mycotoxines fongiques. Dès cette période, la patuline a excité l'intérêt des mycologues qui se sont intéressés particulièrement à la détermination de ses propriétés physico-chimiques, l'élucidation de sa voie de biosynthèse, l'isolement et la caractérisation des espèces fongiques productrices, l'évaluation de son potentiel toxique en s'appuyant sur des études *in vitro* et *in vivo* et au développement des procédés de décontamination ou de détoxication pouvant avoir une application à l'échelle industrielle.

Cependant, réussir à lutter contre l'incidence de la patuline requiert au préalable une connaissance bien définie des principaux facteurs qui contribuent à son apparition. Sur le plan pratique, une meilleure compréhension des exigences écologiques de *Penicillium expansum*, producteur principal de patuline, constitue une étape cruciale et déterminante pour empêcher ou

tout au moins réduire les pertes économiques dues à la colonisation des pommes par ce champignon, étant donné que des connaissances sur la physiologie du champignon en conditions expérimentales contrôlées aideront à comprendre son comportement dans les conditions naturelles. Néanmoins, ces connaissances ne seront pas capables à elles-seules d'éviter l'apparition de la patuline dans la chaine alimentaire sachant que le développement du champignon demeure parfois inévitable dès lors que des conditions favorables se réunissent. La compréhension des mécanismes biochimiques et moléculaires qui stimulent la production de patuline constitue à son tour une priorité pour pouvoir réguler cette production en présence du champignon contaminant. En s'appuyant sur l'ensemble des données de la littérature relatives à la patuline, il semble que la voie de biosynthèse de celle-ci n'aie pas reçu sa part d'attention sur le plan génétique, en comparaison aux 5 grandes familles de mycotoxines règlementées par l'Union Européenne (Aflatoxine, Ochratoxine A, Trichothécènes, Fumonisines et Zéaralénone), bien qu'elle a été relativement bien étudiée du point de vue chimique. Par conséquent, ceci a engendré de nombreuses incertitudes et points d'interrogation qui subsistent jusqu'à nos jours. Il n'y a pas si longtemps, un cluster potentiel regroupant 15 gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la patuline a été identifié chez une souche non productrice d'*Aspergillus clavatus* (NRRL1) (Artigot et al. 2009). Cette découverte aurait était prometteuse si cette dernière espèce était perçue comme un danger sanitaire et économique. Mais le fait que cette espèce fongique ne soit pas capable d'infecter et d'envahir une pomme engendre des limites quant à l'exploitation de ce cluster tant sur le plan de développement de moyens de détection que de la maîtrise de la contamination des pommes par la patuline. Sur les 15 gènes constituant ce cluster, les fonctions de 5 gènes seulement ont été dévoilées dans des espèces fongiques moins problématiques que *P. expansum*, telles que *P. griseofulvum, Byssochlamys nivea* ou *A. clavatus*. La majorité des gènes caractérisés sont impliqués dans les premières étapes de la voie de biosynthèse de la patuline. Il subsiste néanmoins de nettes incertitudes sur les dernières étapes de cette voie, qui nécessitent d'être éliminées.

C'est dans ce contexte-là que s'inscrit la présente thèse. Elle vise dans un premier temps à caractériser les exigences écologiques de l'espèce *P. expansum* et étudier sa capacité de croissance et son pouvoir toxinogène en réponse à des facteurs physico-chimiques clés. En deuxième temps, pour clarifier nombreux points encore en suspens de la voie de biosynthèse de la patuline est présenté le cluster de la patuline de *P. expansum*, espèce la plus problématique du point de vue économique. Le rôle biochimique de certains gènes d'intérêt a été également élucidé. Les résultats obtenus ont motivé, par la suite, le développement d'une méthode moléculaire de détection et de quantification spécifique de *P. expansum* dans les pommes.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

L'étude bibliographique réalisée au cours de cette thèse expose une analyse critique de la littérature et met en relief les principales problématiques traitées dans la suite de ce manuscrit. Cette revue bibliographique est structurée en trois grandes parties ; **Dans un premier temps**, elle consistera en un aperçu des principaux champignons filamenteux et de leurs métabolites secondaires en s'intéressant particulièrement aux mycotoxines. Les connaissances sur l'origine biosynthétique de ces molécules toxiques et l'organisation moléculaire pour leur synthèse ont été succinctement passées en revue. **La deuxième partie** exposera l'état de l'art sur l'espèce *P. expansum* en se focalisant sur les caractéristiques physiologiques, les traits morphologiques et les principaux métabolites élaborés par ce champignon dont la patuline occupe une place toute particulière. **Dans la dernière partie** de cette synthèse bibliographique nous retracerons l'histoire de la patuline depuis sa découverte, en évoquant ses propriétés physico-chimiques, les espèces connues productrices, son aspect toxique et sa prise en compte par la règlementation. L'accent sera particulièrement mis sur la voie de biosynthèse de la patuline sur le plan chimique ainsi que moléculaire. Cette analyse bibliographique tient en compte également de l'occurrence et l'incidence de la patuline dans l'alimentation, des méthodes d'extraction et de détection élaborées pour détecter non seulement sa présence mais aussi son producteur majeur dans les matrices alimentaires.

A. Moisissures, métabolisme secondaire et mycotoxines

De nos jours, la sécurité alimentaire est devenue une préoccupation majeure depuis que les contaminants chimiques d'origine anthropique sont de plus en plus présents dans notre environnement. L´alimentation représente la voie majeure d'exposition à des contaminants comme les dioxines, les mycotoxines, les métaux lourds, les pesticides, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les médicaments et les hormones (Barreira et al. 2010). Parmi tous ces contaminants, ce sont désormais les mycotoxines fongiques qui remportent la palme en matière de menace potentielle en ce qui concerne la sécurité sanitaire des aliments, en raison de leur présence dans une grande partie de l'approvisionnement alimentaire. Ces toxines éveillent aujourd'hui un intérêt croissant et retiennent l´attention des milliers de chercheurs dans le monde entier, qui sont sans cesse en train de mener des études sur leur origine, leur toxicité, leur voie de biosynthèse, les stratégies de contrôle de cette biosynthèse mais aussi de défricher d'autres pistes de recherche.

A.1. Les moisissures: Des champignons filamenteux microscopiques

Les champignons ou mycètes sont des organismes eucaryotes uni- ou pluricellulaires qui étaient traditionnellement classés dans le règne végétal. Plus tard, ces organismes ont été exclus de ce vaste règne et constituent actuellement un groupe à part : « le règne des Mycètes » ou autrement dit le règne des « *Fungi* », car ils se différencient des plantes particulièrement par leur paroi renfermant de la cellulose et de la chitine (Méheust 2012), par l'absence de la chlorophylle et en conséquence par leur incapacité à produire leurs propres aliments (Berger and Guss 2005). Les champignons sont hétérotrophes vis-à-vis du carbone ainsi qu'organotrophes, se nourrissant habituellement par décomposition de la matière organique, ce qui crée une excellente opportunité pour leur croissance dans les aliments.

Le règne fongique est caractérisé par une grande diversité estimée à plus de 1,5 million d'espèces, bien que 70 000 espèces « uniquement » aient été nommées (Paterson 2006). Ce règne regroupe entre autres des espèces macroscopiques (macromycètes) et d'autres microscopiques (micromycètes) ayant un aspect filamenteux beaucoup plus connus par le terme trivial : « moisissures ». Ces derniers ne sont pas perceptibles par l´œil qu'une fois que leur développement devient important (Tabuc 2007). Il s'agit d'organismes ubiquitaires, pouvant naturellement proliférés dans l´environnement intérieur et extérieur (Muro-Cacho et al. 2003) si certaines conditions physico-chimiques telles que le niveau d'humidité, la température et la présence de substrats organiques et inorganiques sont réunies (Aydogdu and Gucer 2009). Deux groupes de

champignons microscopiques peuvent être particulièrement distingués selon le moment où ils prolifèrent dans la chaine alimentaire. Le premier, regroupe les champignons qui envahissent leur substrat et élaborent leurs toxines au niveau du champ : il sera question de « toxines de champs ». Cependant, le second groupe rassemble les champignons survenant principalement après récolte, sécrétant les « toxines de stockage » (AFSSA 2009).

Les spores microscopiques sexuées et asexuées sont le moyen de reproduction caractéristique et les principaux agents de dispersion des champignons filamenteux. Quand elles se posent sur un substrat favorable, les spores asexuées (conidies) germent et forment un nouveau mycélium qui produit à nouveau des conidies. La reproduction asexuée est ainsi un processus de clonage naturel qui produit des organismes génétiquement identiques, alors que la reproduction sexuée génère de nouvelles combinaisons d'allèles qui peuvent permettre aux champignons de coloniser de nouveaux types d'habitats. Dans ce cas, des partenaires sexuellement compatibles mais de types sexuels opposés peuvent s'engager dans la reproduction sexuée. Un zygote diploïde résulte ainsi de l'union des mycéliums et de la fusion des noyaux. Ce zygote subit la méiose et donne des spores haploïdes qui seront libérés pour germer et former de nouveaux mycéliums haploïdes. Les moisissures les plus courantes dans l'alimentation et qui suscitent l'intérêt des mycologues alimentaires étaient réparties en se reposant sur les modes de fructification et de reproduction sous trois classes : les classes des *Ascomycota* et *Zygomycota* qui sont aptes à se reproduire sexuellement en formant des méiospores (ascospores et zygospores) ou se disperser de manière asexuée par la formation de mitospores et la classe des *Deuteromycota* (champignons imparfaits) qui regroupait les champignons qui ne se reproduisent qu'asexuellement (Taylor et al. 1999). L'essort de la biologie moléculaire ainsi que les tentatives fructueuses de reproduction sexuée en laboratoire de certaines espèces de *Deuteromycota* ont montré que celles-ci font partie des *Ascomycota* et que la classe des *Deuteromycota* n'a pas de sens de point de vue phylogénique (O'Gorman et al. 2008).

La croissance des moisissures a été longtemps considérée comme une simple altération inesthétique affectant uniquement la qualité organoleptique des aliments, néanmoins, leur danger réside dans leur capacité à produire des métabolites secondaires toxiques, les mycotoxines, qui, contrairement à leurs organismes producteurs, ne peuvent pas être éliminées par la cuisson ou bien par les divers traitements que subissent les denrées. Le fait que les toxines puissent persister longtemps après que la croissance végétative ait eu lieu et ce même après la disparition du champignon, rend la présence de certains champignons risquée pour la santé (Negedu et al. 2011). Les recherches incessantes menées au cours de ces dernières décennies, ont mis en lumière une large gamme d'espèces fongiques productrices de mycotoxines, dont les plus préoccupantes

appartiennent aux genres *Aspergillus, Alternaria, Claviceps, Fusarium, Penicillium* et *Stachybotrys* (Milićević et al. 2010).

A.2. Les mycotoxines

A.2.1. Etymologie, définition, et généralités

Le terme « mycotoxine » vient de la combinaison entre le mot grec « *mycos* » qui signifie champignon, et le latin "*toxicum*" qui veut dire poison (Jouany et al. 2009; Rai et al. 2012). Ce terme est apparu pour la première fois dans les années 1960 pour dénommer les toxines qui étaient à l'origine d'une crise vétérinaire inhabituelle en Angleterre, dans laquelle près de 100 000 dindons ont été décimés d'une nécrose hépatique sévère et d´une hyperplasie biliaire (Yiannikouris and Jouany 2002; Bennett and Klich 2003). La cause de cette maladie a été attribuée à l'aflatoxine, un métabolite secondaire produit par le champignon *Aspergillus flavus* ayant proliféré sur les arachides contenus dans la nourriture de ces volailles (Medeiros et al. 2012). A partir de cet évènement, une véritable « ruée vers l'or » des mycotoxines voit le jour et perdura durant une quinzaine d'années (1960-1975), pendant laquelle de nombreux scientifiques ont rejoint des programmes de recherche bien financés (Bennett and Klich 2003).

Définir les mycotoxines en quelques mots s'avère une tâche très difficile, ce sont des métabolites secondaires bioactifs élaborés sous des conditions environnementales particulières par la structure mycélienne de certains champignons filamenteux microscopiques se développant dans de nombreuses matrices alimentaires (Ritieni 2003; Negedu et al. 2011). En sus de leur production dans le mycélium des champignons toxinogènes, les mycotoxines peuvent également se trouver dans les spores de ces micro-organismes (D'Mello and Macdonald 1997), c'est le cas de la trypacidine, une mycotoxine véhiculée par les spores d'*Aspergillus fumigatus* (Parker and Jenner 1968; Gauthier et al. 2012). Ces métabolites sont qualifiés de secondaires car ils sont normalement synthétisés par le champignon à la fin de sa phase exponentielle de croissance et ne jouent, à ce titre-là, aucun rôle physiologique distinct (Whitlow 2005; Paterson 2006; Puel 2007), contrairement à ceux désignés universellement de primaires pour leur implication dans la vie, tels que l'ADN, les protéines, les sucres et les composés engagés dans la glycolyse (Paterson 2006).

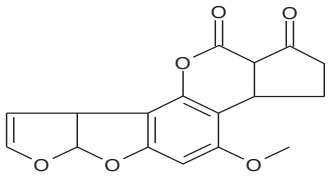
Le rôle des mycotoxines pour leurs champignons producteurs n'est pas encore totalement compris. De nombreux travaux ont suggéré l'implication de ces molécules dans les processus de pathogénicité et de virulence du champignon face à son substrat. Des études menées sur les

trichothécènes dont le déoxynivalénol (DON) et le Nivalénol (NIV), ont relaté que ces mycotoxines produites par des espèces du genre *Fusarium*, jouent un rôle dans l'agressivité et la virulence de certains isolats vis-à-vis des céréales infectées comme le blé et le maïs (Harris et al. 1999; Desjardins et al. 2000; Bai et al. 2001; Maier et al. 2006). Ces toxines ne sont pas alors un prérequis à l'infection mais elles contribuent vraisemblablement à l'évolution de la maladie. Un autre exemple largement étudié est celui des fumonisines. A ce sujet, une étude de Desjardins et al. (1995) a témoigné du rôle potentiel des fumonisines dans la virulence de *Gibberella fujikuroi* sur les semis de maïs, tout en rapportant que ces mycotoxines ne sont indispensables pour le déclenchement de la maladie. Outre leur premier rôle en tant que facteurs de virulence ou de pathogénicité, qui agissent en désactivant les réactions de défense de l'hôte, un autre rôle a été conféré aux mycotoxines. En effet, plusieurs études s'accordent sur le fait que les mycotoxines servent de "force défensive chimique" pour les champignons producteurs contre d'autres organismes compétitifs, y compris, de manière non exhaustive, les nématodes, les protozoaires, les insectes antagonistes ou d'autres champignons (Utermark and Karlovsky 2007; Ortiz et al. 2013; Trienens and Rohlfs 2013).

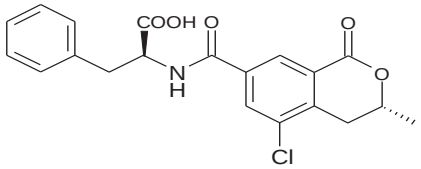
Bien que toutes les mycotoxines soient d'origine fongique, la réciproque n'est pas vraie, car tous les métabolites secondaires élaborés par les champignons ne sont pas nommés « mycotoxines ». Certains produits fongiques sont connus pour leurs apports bénéfiques à l'humanité en agissant principalement sur les bactéries (tels que la pénicilline - un métabolite secondaire produit par *Penicillium notatum*). Ces métabolites secondaires sont généralement désignés d´antibiotiques (Medeiros et al. 2012). En revanche, le terme « mycotoxine » n´est utilisé que pour désigner les composés produits par les champignons et qui exercent leur toxicité à faibles concentrations sur les organismes du règne animal (humains et animaux) lorsqu'ils sont introduits par une voie naturelle: ingestion, absorption par la peau ou inhalation (Brodhagen and Keller 2006; Tančinová et al. 2012). Les autres métabolites fongiques qui ne sont toxiques qu´à des concentrations élevées ne sont pas considérés comme mycotoxines (Bennett and Klich 2003).

Sur le plan chimique, il s'agit de composés peu volatils et généralement de faible poids moléculaire (<1000 Daltons) (Reboux 2006). Ce groupe forme un ensemble très hétérogène de substances chimiques caractérisées par une grande diversité de structures (Figure 1) allant de molécules simples (C4) à des composés hautement polymérisés formés de 6 à 8 chaînes carbonées (Pitt 2000; Mollea and Bosco 2012). A l´inverse des toxines bactériennes qui sont des macromolécules généralement de nature protéique, susceptibles d´être reconnues par le corps comme un antigène et induisant en quelques heures une réaction médiée par des anticorps, les mycotoxines fongiques à faible poids moléculaire, une fois ingérées, inhalées ou absorbées par la

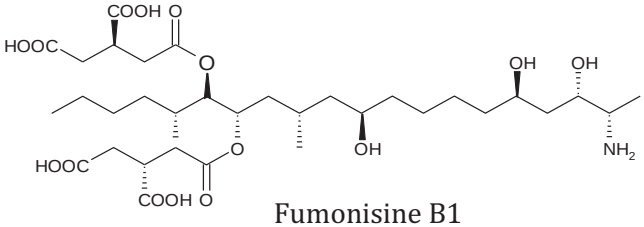
peau réduisent les performances et causent des maladies pouvant être fatales chez les humains et les animaux (Negedu et al. 2011).



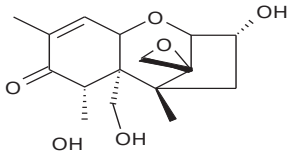
Aflatoxine B1



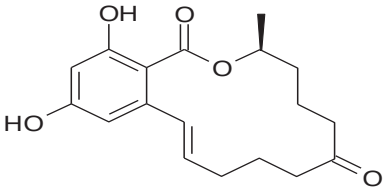
Ochratoxine A



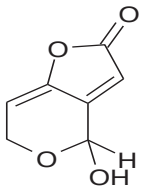
Fumonisine B1



Déoxynivalénol (DON)



Zéaralénone



Patuline

Figure 1 : Les structures chimiques des mycotoxines majeures

Les mycotoxines ne sont pas uniquement difficiles à définir, le plus grand défi réside en leur classification, en raison de leurs diverses structures chimiques, origines biosynthétiques, de leurs multiples effets biologiques et leur production par un grand nombre d´espèces fongiques différentes (Bennett and Klich 2003). Actuellement, plus de 500 mycotoxines différentes ont été découvertes, et ce nombre ne cesse d'augmenter (Medeiros et al. 2012). Certaines mycotoxines telles que les aflatoxines, ont été largement étudiées par les toxicologues, tandis que d'autres sont moins bien comprises. Certaines sont règlementées depuis des années, tandis que d'autres n'ont fait que récemment l'objet d'un examen minutieux. Parmi les mycotoxines répertoriées, six ont été particulièrement décrites car elles posent un risque potentiel pour la santé humaine et animale et constituent un défi important de la sécurité alimentaire. Le Tableau 1 rassemble les mycotoxines majeures, leurs principaux champignons producteurs, les denrées alimentaires touchées, la palette des effets néfastes qu'elles engendrent ainsi que les valeurs toxicologiques de référence SCF/JECFA.

Tableau 1 : Les principales mycotoxines : Moisissures productrices associées, denrées favorables effets toxiques majeurs et valeurs toxicologiques de référence (Cast 2003; AFSSA 2009)

Mycotoxines	Principales moisissures productrices	Denrées alimentaires favorables	Effets toxiques avérés ou suspectés	Dose journalière tolérable par Kg de poids corporel SCF/JECFA
Aflatoxines (B1, B2, G1, G2, M1, M2)	*Aspergillus flavus, A. parasiticus, A. nomius*	Maïs et graines de coton (*A.flavus*), Graines d´arachide (*A.parasiticus*), fromages, Lait, œufs.	Cancérogénicité Effets hématopoïétiques Génotoxicité Hépatotoxicité Immunotoxicité Tératogénicité	La consommation doit être aussi faible que raisonnablement possible *
Ochratoxine A	*Aspergillus ochraceus, A. carbonarius, P. verrucosum*	Céréales, graines de cacao et de café, vin, jus de raisin, bière, épices et viande de porc	Hépatotoxicité Immunotoxicité Néphrotoxicité Neurotoxicité Tératogénicité	0,005/0,0143 µg/kg/jour
Fumonisines	*Fusarium verticillioides (F.moniliforme), F. proliferatum*	Céréales (maïs, riz, sorgho)	Cancérogenicité Génotoxicité Hépatotoxicité Immunotoxicité Néphrotoxicité Reprotoxicité	2 µg/kg/jour
Trichothécènes (DON)	*Fusarium graminearum, F.culmorum, F. sporotrichoides, F. langesthiae, F. tricinctum, F. poae, F. solani*, *F. equiseti*	Céréales (blé, maïs, orge, sarrasin, seigle, millet, riz, avoine), fruits (bananes)	Effets hématopoïétiques Génotoxicité Immunotoxicité Neurotoxicité Néphrotoxicité Reprotoxicité	1 µg/kg/jour
Zéaralénone	*Fusarium graminearum, F.culmorum, F. crookwellense , F. equiseti, F. oxysporum*	Céréales (maïs, sorgho, orge, soja, blé, riz, avoine)	Immunotoxicité Reprotoxicité Tératogénicité	0,2/0,5 µg/kg/jour
Patuline	*Penicillium expansum, Aspergillus clavatus, Byssochlamys nivea*	*Pomaceae* (pommes, poires), jus de fruits	Cytotoxicité Génotoxicité Immunotoxicité Reprotoxicité Tératogénicité	0,4 µg/kg/jour

*Les aflatoxines exhibent des effets cancérogènes et génotoxiques sans seuil, l'unique approche réaliste est de diminuer l'exposition à un niveau aussi faible que possible sans détruire la matrice alimentaire, suivant le principe ALARA (**A**s **L**ow **A**s **R**easonnably **A**chievable)

Bien qu'il existe des différences géographiques et climatiques régissant l'occurrence de ces métabolites toxiques, le dernier rapport d'enquête établi en 2013 par la société Biomin, qui intègre l'analyse de 4218 échantillons de céréales prélevés un peu partout dans le monde, a témoigné que les mycotoxines sont omniprésentes et que le problème engendré par leur présence est d'ordre mondial. Ce rapport révèle également que 50 % des échantillons analysés sont contaminés par plus d'une mycotoxine, ce qui pose le problème des effets synergiques liés à la contamination simultanée par différentes mycotoxines (multi-contaminations) (Biomin 2014). Plusieurs chercheurs ont accordé une attention particulière à ce sujet et se sont engagés dans des études *in vitro* pour dévoiler les interactions potentielles entre plusieurs mycotoxines afin de déterminer s'ils agissent de façon additive, antagoniste ou en synergie (Speijers and Speijers 2004; Heussner et al. 2006; Alassane-Kpembi et al. 2013).

Vu leur omniprésence au niveau mondial, les intoxications alimentaires engendrées par ces molécules sont des événements tragiques survenant dans le monde entier. Les syndromes d'une intoxication alimentaire résultants de l´exposition aux mycotoxines sont dénommés « mycotoxicoses » (Halász et al. 2009). Chez les animaux, la consommation d'aliments contaminés par des mycotoxines est susceptible de causer des pathologies telles qu'une perte de poids, une diminution de la productivité, des dommages subtiles mais chroniques des organes cibles, une suppression immunitaire conduisant à une sensibilité accrue à d'autres maladies bactériennes ou virales (Zain 2011). De même, ces intoxications peuvent altérer les fonctions reproductives et le développement de l'embryon ou du fœtus (Etienne and Dourmad 1994; Minervini and Dell'Aquila 2008; Kanora and Maes 2009). Cette exposition chez les humains est soit directe via la consommation de céréales contaminées ou indirecte. Dans ce cas elle se produit lorsque des résidus toxiques ou des métabolites subsistent dans les produits d'origine animale consommés par l'homme tels que le lait, les œufs ou la viande (Cast 2003). Les réactions biologiques qui suivent l'exposition à une seule mycotoxine ou une combinaison de mycotoxines varient en intensité; allant d'aiguë, caractérisée par une exposition courte à une forte dose et un impact sérieux en termes de mortalité et de morbidité, à chronique avec des troubles qui apparaissent de façon plus insidieuse avec le temps (Bryden 2007). L´ergotisme est la plus ancienne mycotoxicose connue et identifiée chez les humains (Murphy et al. 2006), causée par l'ingestion de grains contaminés par des alcaloïdes de l'ergot produits par la moisissure *Claviceps purpurea* (Brodhagen and Keller 2006).

De par l'impact sanitaire des mycotoxines, la contamination de la chaîne alimentaire par ces molécules toxiques génère des conséquences économiques importantes. Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), environ 25 % des cultures vivrières

mondiales est contaminée par les mycotoxines chaque année, avec des pertes annuelles d'environ 1 milliard de tonnes métriques d'aliments et de produits alimentaires. Aux États-Unis, les pertes économiques attribuées aux aflatoxines, fumonisines, et déoxynivalénol dans le secteur agricole sont estimées à environ 932 millions de dollars US par an (Cast 2003). Dans le secteur animal, les pertes financières annuelles engendrées par les fumonisines ont été estimées seulement à 0,917-19,3 millions de dollars US en ce qui concerne le marché de l'alimentation pour animaux mais à 126 millions de dollars US de pertes dues à la mortalité animale (Wu 2007).

A ces pertes économiques dus à l'altération des récoltes et la réduction de la productivité animale, des frais supplémentaires incluant les coûts de la gestion, de la prévention, des technologies de production améliorées, d'échantillonnage ainsi que des tests d'analyse et de détection, doivent être rajoutés (Zain 2011).

A.2.2. Origine Biosynthétique : Classification et voies de biosynthèse des mycotoxines

A.2.2.1. Catégories biosynthétiques des mycotoxines majeures

Les moisissures sont des formidables usines à produits chimiques naturels qui se distinguent dans leurs structures, leurs fonctions et leurs voies de biosynthèse. Les mycotoxines sont les produits terminaux d'une cascade de réactions enzymatiques qui débutent souvent quand des enzymes multi-modulaires comme les polycétides synthases (PKS), les non-ribosomal peptides synthétases (NRPS) ou les terpènes synthases (TS), catalysent respectivement le réarrangement ou la condensation de métabolites primaires simples tels que l'acétyl-CoA, les acides aminés ou les terpènes pour aboutir à des métabolites secondaires plus complexes (Khan et al. 2014). L'action de ces enzymes ne suffit pas, à elle seule à conduire à la synthèse des mycotoxines ; d'autres enzymes de modification sont nécessaires pour catalyser les réactions ultérieures dans les voies de biosynthèse. Ces enzymes fonctionnent au même moment de sorte que les nouveaux intermédiaires sont pris en charge tour à tour par l'enzyme suivante jusqu'à aboutir au produit final qui est la mycotoxine. Ce phénomène est rendu possible par le fait que les gènes codant pour les enzymes d'une voie métabolique sont souvent liés physiquement ou regroupés en cluster les uns derrière les autres au niveau d'une même région chromosomique et sont tous soumis à l'action d'un facteur de régulation spécifique (Osbourn 2010).

Les mycotoxines sont regroupées en fonction de leur origine biosynthétique en trois catégories principales, à savoir les terpènes, les polycétides et les peptides cycliques non-ribosomiques (Keller et al. 2005; Moretti et al. 2013). En outre, une quatrième catégorie regroupant les peptides hybrides NRPS/PKS qui contiennent à la fois des unités peptidiques et polycétides, a été identifiée. La Figure 2 schématise les différentes origines métaboliques des mycotoxines majeures.

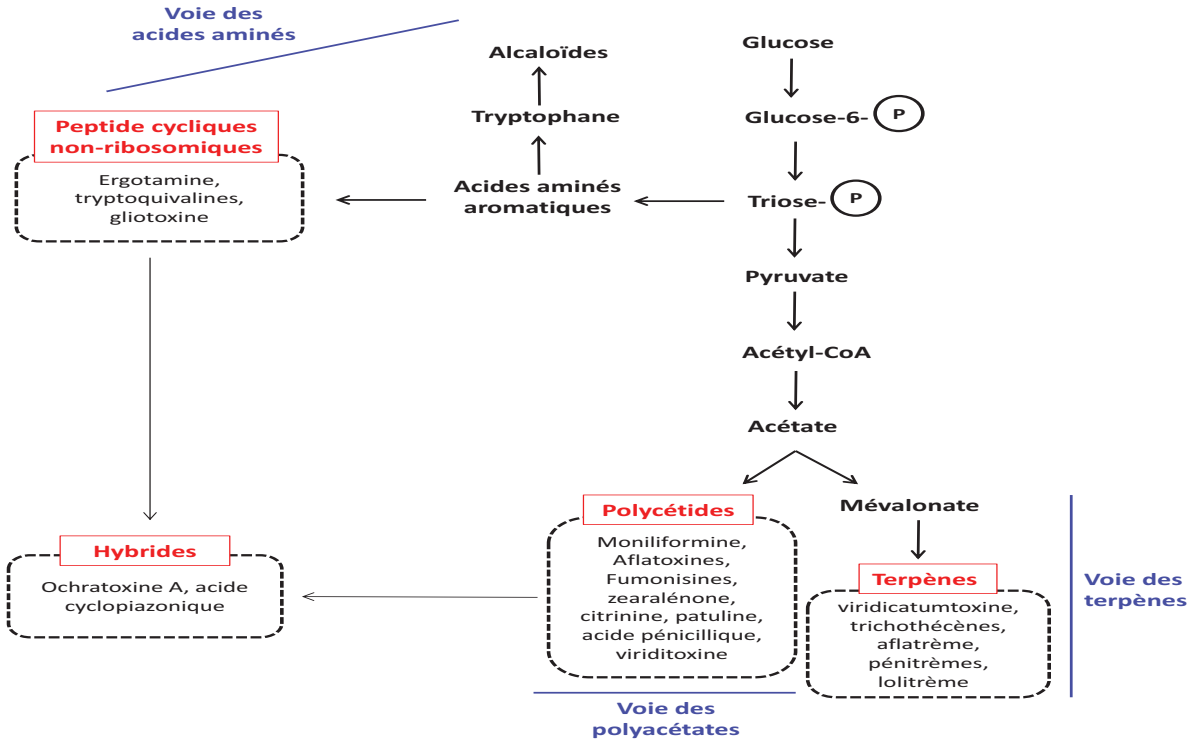


Figure 2 : Les origines biosynthétiques des mycotoxines majeures.
En bleu sont montrées les trois voies de biosynthèse principales et en rouge les catégories biosynthétiques qui en découlent. Schéma adapté de Tabuc (2007) , Leyral and Vierling (2007) et Bu'Lock (1980).

Parmi ces catégories biosynthétiques décrites précédemment, la classe remarquable des polycétides issus du métabolisme de l'acétate parait dominer (Keller et al. 2005). Il est important de signaler que sur les 6 familles de mycotoxines règlementées et évoquées plus haut, seuls les trichothécènes ne sont pas de nature polycétide. L'étude de Khaldi et al. (2010) témoigne également de la richesse en clusters de gènes de type PKS dans les génomes fongiques en comparaison avec d'autres types. Cette étude s'appuie sur un logiciel informatique, SMURF (Secondary Metabolite Unknown Region Finder), permettant de prédire la présence de clusters de

gènes impliqués dans le métabolisme secondaire dans les génomes entièrement séquencés. Le Tableau 2 expose les résultats des analyses réalisées grâce au logiciel SMURF sur 12 génomes de champignons filamenteux.

Tableau 2 : Clusters de gènes prédits chez 12 espèces fongiques par le logiciel informatique SMURF

Espèces fongiques	Nombre de clusters	Type de clusters			
		PKS[1]	NRPS[2]	Hybride PKS-NRPS	DMATS[3]
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 oryzae	53	27	16	2	8
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

[1]PKS, polycétide synthase ; [2]NRPS, non-ribosomal peptide synthétase ; [3]DMATS, diméthyl ally transférase.

A.2.2.2. Les Polycétides et les polycétides synthases

Après l'utilisation pionnière du terme « polycétide » par Collie (1907) pour désigner les composés ayant une structure chimique à « motif kétide » répétitif (-CH2-CO-), l'étude de ces molécules a été effectivement relancée à l'aube des années 1950 par Arthur Birch qui a travaillé pendant cette période sur l'acide-6-méthylsalicylique, un polycétide aromatique de *Penicillium patulum* (Nair et al. 2012). Néanmoins, les champignons n'ont pas le monopole de la production des polycétides. Hormis, les polycétides fongiques, ce terme désigne également les métabolites secondaires produits par certaines bactéries et une grande variété de plantes, d´insectes et d'organismes marins (Cox 2007; Tae et al. 2009).

Malgré leur diversité structurale apparente, les polycétides partagent un mécanisme de biosynthèse commun, qui ressemble notamment à l´anabolisme des acides gras (Ridley and Khosla 2009). En fait, la première liaison carbone-carbone dans une réaction de biosynthèse des polycétides et d'acides gras résulte de la condensation itérative (condensation de Claisen) entre des

acides carboxyliques à chaînes courtes, souvent une molécule d'acétyl-CoA, qui servira comme substrat de départ (Starter substrate) et une molécule d'acyl-CoA, généralement le malonyl-CoA, qui fera figure d'unité d'élongation (Shen 2000; Lalic et al. 2003). En dépit de cette similitude, la biosynthèse de polycétides diffère sur quelques points de celle des acides gras. D´abord, les enzymes polycétides synthases (PKS), qui assurent l'assemblage des chaînes carbonées des polycétides (Tae et al. 2009) utilisent un large éventail d'unités de départ et de blocs de construction (comme le propionyl-CoA, le méthylmalonyl-CoA, l´éthylmalonyl-CoA, et le méthoxymalonyl-CoA) lors de la biosynthèse des polycétides tandis que les acides gras synthases sont limitées à l´unique utilisation de l'acétyl-CoA comme unité de départ et le malonyl-CoA, exclusivement comme unité d'élongation (Ridley and Khosla 2009). Un deuxième point fondamental qui est en rapport avec le fonctionnement même de ces enzymes, génère une distinction majeure entre les deux voies de biosynthèse. Effectivement, un cycle complet de réduction des groupements β-cétones après chaque élongation a lieu lors de la synthèse des acides gras, tandis que dans la biosynthèse des polycétides, les étapes réductrices sont facultatives et peuvent être partiellement ou totalement omises avant le prochain cycle d'élongation, donnant ainsi naissance à un modèle plus complexe de fonctionnalisation et à des chaines de longueurs variables (Hertweck 2009). A cet égard, trois groupes ont été fondés selon le niveau de réduction du polycétide final libéré par l'enzyme (Nicholson et al. 2001). Le premier regroupe les polycétides chez qui la quasi-totalié des groupements β-cétone de la chaîne carbonnée est réduite, c'est le cas de l'ochratoxine A, la compactine, la lovastatine mais aussi de la toxine T. Le deuxième rassemble les polycétides partiellement réduits chez qui, un seul cycle de réduction apparait au cours de leur synthèse, ce groupe est illustré par l'acide 6-méthylsalicylique, premier précurseur de la patuline. Finalement, se distinguent les polycétides non réduits qui ne sollicite pas de réduction lors de leur synthèse, c'est le cas de l'anthrone, le premier précurseur des aflatoxines et de la sterigmatocystine (Ehrlich et al. 2010), l'acide orsellinique, précurseur de l'acide pénicillique (AP) et la citrinine chez *Monascus ruber* (Nicholson et al. 2001; Dao 2005; Puel 2007).

D'un point de vue pharmacologique et clinique, les polycétides sont d'une importance considérable en raison de leurs fonctions biologiques très variées dues à leur grande diversité structurale. Ils font l'objet de diverses applications médicinales principalement en tant qu´agents antibiotiques, immunosuppresseurs, antiparasitaires, anti-cholestérol, et antitumoraux (Hertweck 2009). Qu'ils soient d'origine fongique ou bactérienne, de nombreux polycétides découverts par le passé se sont imposés comme étant les ingrédients actifs de nombreux médicaments à haute valeur commerciale, comme la lovastatine (également connu sous le nom mévinoline), un polycétide

fongique produit par *Aspergillus terreus* et son composé apparenté la compactine produite par *Penicillium citrinum*, connus parmi les hypocholestérolémiants les plus couronnés de succès sur le marché (Keller et al. 2005; Cox and Simpson 2010; Crawford and Townsend 2010), les antibiotiques tétracyclines et les daunomycines isolés de certaines espèces de *Streptomyces* prescrits depuis des années comme agents anti-cancéreux, le polycétide érythromycine isolé de l'actinomycète *Saccharopolyspora erythraea*, ayant une application contre un large éventail d'infections bactériennes chez l'homme et la rifamycine isolé d'*Amycolatopsis mediterranei*, principalement employé contre la tuberculose (Ridley and Khosla 2009; Crawford and Townsend 2010).

La grande classe de composés naturels qu´on vient d´introduire est synthétisée par un groupe d'enzymes appelées les polycétides synthases (PKS). Il s'agit de complexes enzymatiques de grande taille, arrangés en modules. Chaque module de PKS englobe plusieurs domaines catalytiques détenant chacun des fonctions définies de démarrage, d'élongation ou de terminaison (Chan et al. 2009). Ces PKS multifonctionnelles partagent la particularité d´avoir trois domaines enzymatiques conservés qui collaborent pour catalyser l'allongement des chaînes de polycétides: le domaine cétosynthase (KS), est le domaine le plus conservé. Il catalyse les réactions de condensation de l'acétate et du malonate pour former le premier intermédiaire polycétide, le domaine acyltransférase (AT) qui reconnait spécifiquement l'unité d'extension devant être incorporée dans la chaîne du polycétide en extension. De plus, ce domaine sert à attacher de manière covalente les précurseurs acyl-CoA sur le domaine (ACP) qui prépare ces précurseurs pour la condensation suivante et « tient » la chaîne du polycétide en extension (Cox 2007; Chan et al. 2009). A ces domaines conservés s´ajoutent d´autres domaines optionnels : le domaine méthyl transférase (MT) et des domaines de réduction, tels que le domaine keto réductase (KR), déshydratase (DH), et enoyle réductase (ER). Le domaine MT catalyse l'addition d'un groupe méthyle, le domaine KR réduit le groupe β-cétone en fonction alcoolique; le DH élimine l'eau de la fonction alcoolique pour former un thioester insaturé et finalement le domaine ER catalyse la dernière réduction du groupe enoyle en groupe alcyle (Dao 2005).

En se fondant sur l'architecture de l'enzyme, l'organisation des gènes ainsi que sur le mode d'action des PKS, ces dernières sont intégralement classées selon trois types majeurs ; les PKS de type I (modulaires ou itératives), les PKS de type II et les PKS de type III. Les polycétides connus chez les champignons filamenteux ont été attribués à l'activité des PKS de type I itératives, Contrairement aux PKS modulaires, les PKS itératives chez les eucaryotes sont généralement composées d´un nombre nettement plus faible de domaines catalytiques qui sont fusionnés, mais

individuellement réutilisés dans plusieurs cycles catalytiques "programmés" pour aboutir à des produits spécifiques (Crawford et al. 2008). L'enzyme 6-methylsalicylique synthase est la première PKS fongique purifiée à partir des cellules de *P. griseofulvum* et étudiée *in vitro* par Lynen et Tada (1961). Plus de trois décennies après sa découverte, le gène codant a été cloné et séquencé chez *P. griseofulvum* et *A. terreus* (Beck et al. 1990; Fujii et al. 2001). Chez *P. griseofulvum*, ce gène contient un seul cadre de lecture fonctionnel codant pour une protéine de 1774 acides aminés (190 KDa) (Beck et al. 1990). Cette PKS catalyse la formation du 6-MSA à partir d'une molécule d'acétate et trois molécules de malonate. Le mécanisme d'action hypothétique de cette enzyme (Figure 3) débute par une première condensation suivie instantanément par une réaction avec une unité d'extension malonate, tandis que la deuxième condensation est suivie par une déshydratation du groupe cétone nouvellement formé. Après le troisième cycle, la chaîne subit une cyclisation, une déshydratation et une enoylisation pour donner le polycétide aromatique, le 6-MSA (Staunton and Weissman 2001), premier précurseur de la patuline qui fait l'objet du présent travail. La MSAS nécessite la présence de NADH pour son activité réductrice. En absence de ce cofacteur, un acide triacétique lactone est généré plutôt que le 6-MSA (Dimroth et al. 1970).

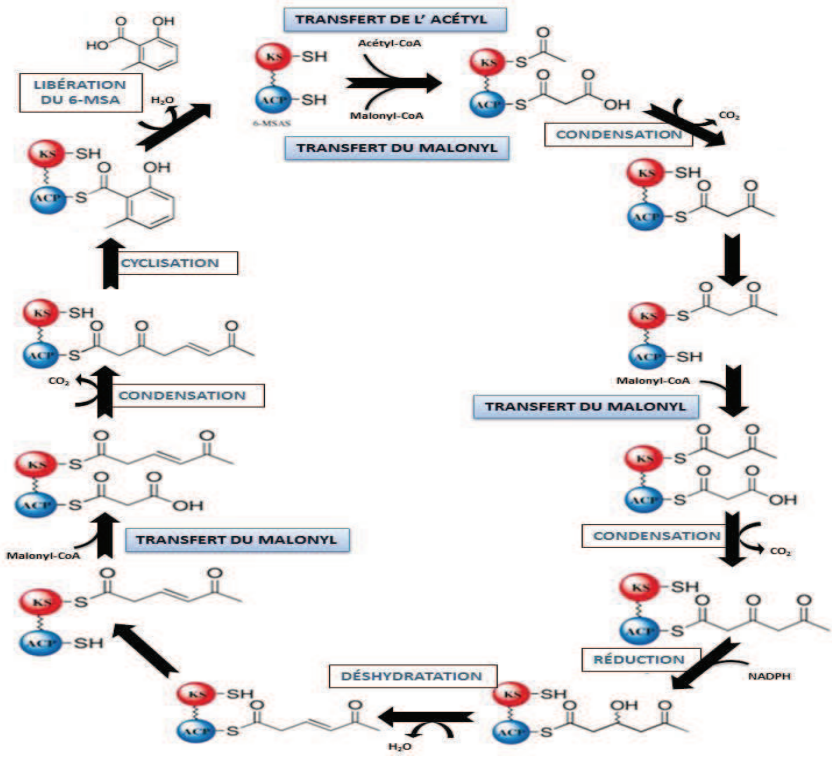


Figure 3 : Schéma hypothétique du fonctionnement de l'acide 6-méthylsalicylique synthase synthétisant le polycétide 6-MSA, précurseur de la patuline.
Schémas adaptés et modifiés de Fujii et al. (2001) et Staunton and Weissman (2001).

A.2.3. Cluster de gènes impliqués dans la biosynthèse des mycotoxines: Organisation et régulation

Les clusters de gènes impliqués dans le métabolisme secondaire fongique ne sont pas aléatoirement distribués dans le génome mais ils sont souvent situés à proximité des télomères, dans les régions sub-télomériques des chromosomes (Palmer and Keller 2000). Néanmoins, la disposition des gènes au sein de ces clusters et leur orientation témoignent du polymorphisme existant entre les différentes espèces productrices (Keller and Hohn 1997).

Outre le cluster de gènes de la pénicilline, les clusters de synthèse des métabolites secondaires fongiques les plus soigneusement étudiés sont ceux qui sont impliqués dans la biosynthèse des mycotoxines polycétides, notamment les aflatoxines et la stérigmatocystine retrouvés dans plusieurs espèces d'*Aspergillus*. La voie de biosynthèse de l'aflatoxine et ses 30 gènes apparentés ont été entièrement caractérisés chez les champignons aflatoxigènes les plus problématiques, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* (Figure 4) (Yu et al. 2004b). Le cluster de la stérigmatocystine qui est un intermédiaire de la synthèse des aflatoxines, partage, chez *Aspergillus nidulans*, 16 gènes avec le cluster de l'aflatoxine (Brown et al. 1996). Autres clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse d'autres mycotoxines polycétides ont été partiellement ou entièrement élucidés. Quelques gènes impliqués dans la synthèse de l'ochratoxine A ont été isolés d'*Aspergillus ochraceus* (O'Callaghan et al. 2003) et *Penicillium nordicum* (Karolewiez and Geisen 2005). Le cluster codant pour la synthèse de la zéaralénone chez *Fusarium graminearum* dispose de quatre gènes situés dans une région de 39 kb (Lee et al. 2011). Récemment, un cluster de gènes regroupant 16 gènes impliqués dans la biosynthèse des fumonisines a été identifié dans *Fusarium verticillioides* (Proctor et al. 2003; Bojja et al. 2004; Proctor et al. 2013).

Le regroupement contigu de ces gènes métaboliques au sein d'un même cluster a une incidence considérable sur leur régulation (Keller and Hohn 1997). A ce niveau, il convient surtout de signaler que les clusters de gènes codant pour les mycotoxines incluent souvent mais pas toujours un gène codant pour un facteur de transcription qui agit spécifiquement et module l'expression des autres gènes de ce cluster. La majorité (90 % approximativement) des régulateurs potentiels des clusters de gènes impliqués dans la synthèse des polycétides fongiques appartiennent à la famille des facteurs de transcription à doigts de zinc (Zn_2Cys_6) (Brakhage 2013). La protéine archétype de cette famille est l'AFLR, une protéine requise pour l'activation des gènes des voies de biosynthèse des aflatoxines et de la stérigmatocystine chez *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* et *A. nidulans* (Fernandes et al. 1998; Bhatnagar et al. 2003). A ce sujet, Yu et al. (1996)

ont reporté une répression de l'expression des gènes du cluster en réponse à une perturbation du gène *aflR*. Des mutations dans la région promotrice de ce même gène ont modifié non seulement son propre expression mais ont aboli aussi l'expression des autres gènes du cluster (Ehrlich et al. 1998). Récemment, il est apparu que ces gènes régulateurs en dépit de leur action sur les gènes situés au sein d'un même cluster, peuvent également agir sur des gènes ailleurs dans le génome ; par exemple, le facteur de transcription AFLR s'est montré apte à réguler trois gènes (*nadA, hlyC* et *niiA*) situés à l'extérieur des clusters de gènes de l'aflatoxine et la stérigmatocystine, qui possèdent tous des sites de fixation de la protéine AFLR (Price et al. 2006).

Bien que les structures des facteurs régulateurs varient entre une espèce fongique et une autre, il est a noté que leur fonctionnalité est conservée. C'est par exemple le cas de l'AFLR : Malgré les nettes différences dans la séquence de ce facteur de régulation entre un *A. flavus* et un *A. nidulans*, l'AFLR d'*A.flavus* était capable d'induire l'expression des gènes du cluster dans une souche d'*A. nidulans* déficiente au facteur AFLR (Yu et al. 1996).

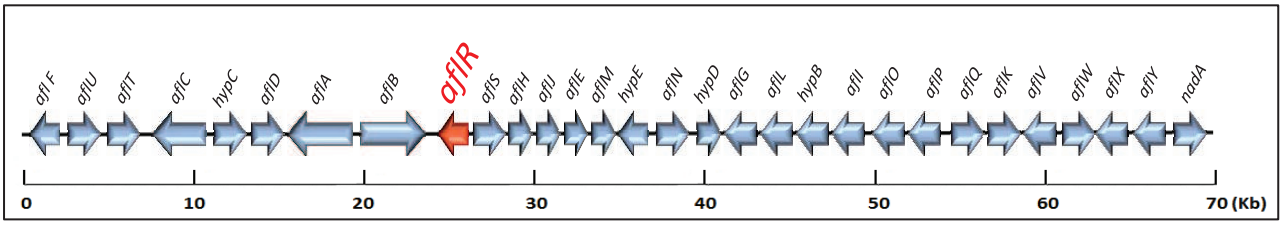


Figure 4 : Organisation des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des aflatoxines au sein d'un cluster de 70-kb chez *Aspergillus flavus*.
Les cadres ouverts de lecture sont représentés avec des flèches indiquant le sens de la transcription. Le gène *aflR* coloré en rouge code pour le facteur régulateur spécifique de cette voie de biosynthèse (schéma adapté et modifié de Ehrlich (2009)

Les protéines de la famille Zn_2Cys_6 sont rencontrées exclusivement chez les champignons (Yin and Keller 2011). Elles sont dotées d'un domaine de liaison à l'ADN et d'un domaine d'activation. La majorité se dimérisent et se lient à des séquences palindromiques de type 5'-$CGGN_xGCC$-3', où N_x représente un espacement variable entre les deux triplets CGG. Outre l'AFLR, d'autres exemples de facteurs de transcription de type doigt de zinc en C_6 identifiés pour leur implication dans les voies de biosynthèse des toxines fongiques sont rapportés dans la littérature (Tableau 3).

A ces derniers, s'ajoutent les facteurs de transcription à doigts de zinc du type Cys_2His_2. Le TRI6, facteur de transcription qui régule l'expression des gènes responsables de la synthèse des trichothécènes, comme le DON et la toxine T2 est l'exemple le plus commun. La suppression de ce

gène a entrainé une forte répression de l'expression des gènes *tri* situés au sein du même cluster chez *Fusarium graminearum* (Seong et al. 2009; Nasmith et al. 2011).

Tableau 3 : Exemples de facteurs de transcription Zn_2Cys_6 impliqués dans la biosynthèse des mycotoxines

Protéines	Cluster de gènes	Espèces fongiques	Références
ZFR1 FUM21	Fumonisines	*Fusarium verticilloides*	(Flaherty and Woloshuk 2004), (Brown et al. 2007)
CtnA	Citrinine	*Monascus pupureus*	(Shimizu et al. 2007)
GliZ	Gliotoxine	*Aspergillus fumigatus*	(Gardiner and Howlett 2005), (Bok et al. 2006)

Outre cette régulation via des facteurs de transcription spécifiques, la production de métabolites secondaires fongiques est également contrôlée à un niveau hiérarchique supérieur par des facteurs globaux de transcription codés par des gènes non liés aux clusters de gènes de biosynthèse. Ces gènes régulent de nombreux processus physiologiques et répondent généralement à plusieurs signaux environnementaux. Les sources de carbone et d'azote, la température, la lumière, le pH et le stress oxydatif sont des paramètres qui influencent largement la sortie métabolique en question (Figure 5) (Brakhage 2013).

Les facteurs de transcription globaux les plus expérimentés sont le **PacC** qui est le facteur clé dans la régulation fongique par le pH. A un pH alcalin, ce dernier s'est parvenu comme régulateur négatif de l'expression des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la stérigmatocystine (*stcU*) chez *A. nidulans* (Keller et al. 1997). Cependant, chez le même champignon, la protéine régulatrice PacC a modulé positivement la transcription du gène *ipnA* codant pour l'isopénicilline N synthétase, une enzyme clé dans la voie de biosynthèse de la pénicilline, engendrant par conséquent une production de pénicilline plus importante en milieu alcalin (Espeso et al. 1993). Chez la même espèce, la répression catabolique (préférence pour le glucose comme source de carbone) des gènes structuraux indispensables à l'utilisation des sources de carbone alternatives est médiée par une protéine régulatrice codée par le gène ***creA*** (Dowzer and Kelly 1989). La biosynthèse de la pénicilline par *A. nidulans* est négativement régulée par le facteur CreA. A ce sujet, il a été prouvé que le saccharose et le glucose réprime l'expression du gène codant l'enzyme isopénicilline N synthase impliquée dans la synthèse de la penicilline chez ce

champignon (Espeso and Peñalva 1992). Similairement, une preuve claire de la participation du facteur CreA dans la répression catabolique de la biosynthèse de la pénicilline et de l'expression du gène pcbAB, codant pour la première enzyme de cette voie chez *Penicillium chrysogenum* a été apportée par l'étude de Cepeda-García et al. (2014). Dans cette étude, une stratégie d'ARNi a été utilisée pour atténuer l'expression du gène *creA.* Les transformants exprimant des petits ARN interférents pour *creA* ont montré une production de pénicilline plus importante. Cette augmentation de la production a été plus évidente lors de l'utilisation du glucose comme source de carbone.

Pour citer d'autres exemples de protéines régulatrices ; **AreA,** un facteur de régulation en réponse à l'azote s'est avéré indispensable pour la production de fumonisines B1 chez *F. verticillioides* (Kim and Woloshuk 2008). En contrepartie, AreA était responsable de la répression azote-dépendante de la biosynthèse de gibbérelline chez *Giberella fujikuroi*. La production de patuline par *P. griseofulvum* a également été négativement régulée par l'ajout d'ions ammonium dans le milieu de culture. Il a été montré que la répression catabolique par l'ammonium a lieu au niveau transcriptionnel. En effet, l'addition de 30 mM de chlorure d'ammonium a entraîné une diminution significative des transcrits de l'isoepyxdon déshydrogénase et la 6-méthylsalicylique synthase (6-msas), les deux gènes clés de la voie de biosynthèse de la patuline (Rollins and Gaucher 1994). Les régions situées en amont de ces deux gènes présentent plusieurs sites putatifs GATA qui interagissent avec le gène *nrfA*, orthologue du gène *areA* chez *P. griseofulvum* (Ellis 1996). A l'issue d'une étude menée par Chang et al. (2011), le gène ***msnA*** chez *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* a été associé à la réponse du champignon au stress oxydatif et suggéré indispensable au maintien d'un état redox normal. La suppression de ce gène s'est traduite par un retard de la croissance, une augmentation de la conidiation, une légère augmentation du taux d'aflatoxine produite, une augmentation significative des quantités d'acide kojique produites ainsi qu'une sur-expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la défense au stress oxydatif (superoxide dismutase, catalase, cytochrome C oxydase) en comparaison avec les souches sauvages. Ces changements mentionnés ci-dessus semblent être une réponse de lutte contre les radicaux libres et le stress oxydatif qui ont considérablement augmenté lors de la délétion du gène *msnA*.

Outre les stimuli extérieurs évoqués précédemment, il a été démontré que le développement des champignons filamenteux et leur capacité à produire des métabolites secondaires sont influencés dans une grande mesure par la lumière. A ce sujet, un « complexe velvet » a été largement décrit. La famille velvet englobe le facteur global **VeA** qui est connu pour avoir un rôle dans l'activation du développement sexué chez les champignons. La régulation médiée

par ce facteur dépend particulièrement de la lumière. Chez des souches d'*A. nidulans* présentant l'allèle VEA de type sauvage, la lumière a montré une influence sur le développement du champignon qui s'oriente vers un mode asexué (Calvo 2008).

Ce facteur peut aussi bien contrôler les clusters de gènes impliqués dans le métabolisme secondaire. A cet égard, il a été démontré, chez *A. nidulans*, que l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de la stérigmatocystine est régulée par *veA* (Kato et al. 2003). Cette étude révèle que le facteur veA est nécessaire pour la synthèse du facteur de transcription AFLR spécifique à cette voie de biosynthèse. Similairement, chez *Aspergillus parasiticus*, la suppression du gène *veA* a entraîné un blocage de la synthèse des intermédiaires de l'aflatoxine comme la versicolorine A (Calvo et al. 2004). Dans cette dernière étude, le gène *veA* s'est montré indispensable pour la transcription des gènes *aflR* et *aflS* (ancien nom : *aflJ*), un autre facteur de transcription largement étudié.

VelB et **LaeA** sont les deux autres facteurs du complexe Velvet qui interagissent physiquement avec VeA. La mutation des protéines de ce complexe chez *Fusarium oxysporum* a suscité une réduction drastique de la production des deux mycotoxines beauvericine (BEA) et acide fusarique au cours de la croissance de ces mutants sur les racines de tomates (López-Berges et al. 2013)

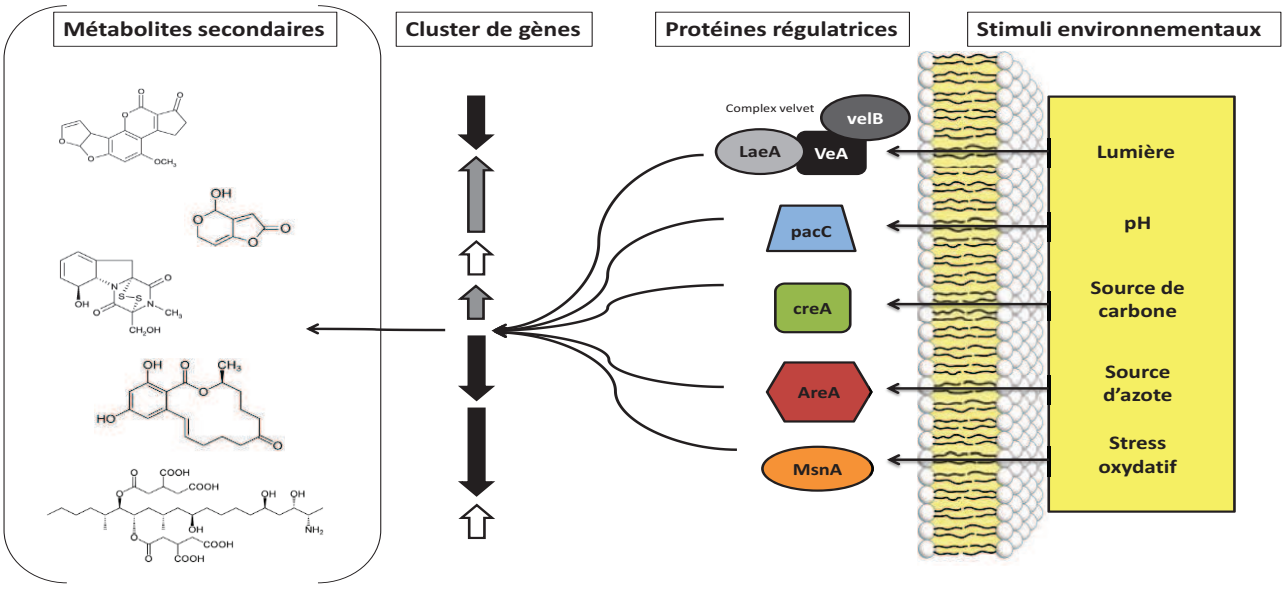


Figure 5 : Protéines régulatrices globales impliquées dans la régulation des clusters de gènes impliqués dans la production de divers métabolites secondaires fongiques.
Schéma adapté et modifié de Brakhage (2013).

B. *Penicillium expansum* : Le champignon et le pathogène

B.1. Classification, morphologie et traits distinctifs

Penicillium expansum est le champignon désigné comme le lectotype (Bridge and Hudson 1989) et l'une des espèces les plus étudiées du genre *Penicillium* (Andersen et al. 2004). Ce champignon appartient à la division *Ascomycota,* communément dénommée Ascomycètes, classe des *Eurotiomycetes*, sous-classe des *Eurotiomycetidae*, ordre des *Eurotiales* et famille des *Trichocomaceae* tout comme le genre *Aspergillus*. Il convient de rappeler que le genre *Penicillium* est subdivisé en quatre sous-genres : *Aspergilloides, Penicillium, Biverticillium* et *Furcatum* (Cardoso et al. 2007). *P. expansum* fait partie du sous-genre *Penicillium*, de la section *Penicillium* et de la série *Expansa* (Frisvad and Samson 2004). Sa classification et sa taxonomie sont basées sur plusieurs critères morphologiques, physiologiques et mycotoxicologiques. Sur le plan morphologique, cette espèce est caractérisée par des conidiophores terverticillés (présentant des phialides sur des métules portées par des rameaux), regroupés généralement en corémies. Au microscope, cette espèce est caractérisée par des stipes droits à paroi lisse (Figure 6a), des phialides allongées ampouliformes à cylindriques (Figure 6b) et des conidies à paroi lisse de couleur vert terne, présentant une forme ellipsoïdale (Figure 6c)(Frisvad and Samson 2004; Pitt and Hocking 2009). *P. expansum* comme la majorité des espèces appartenant au sous-genre *Penicillium* ne présente pas de sclérotes (Frisvad and Samson 2004).

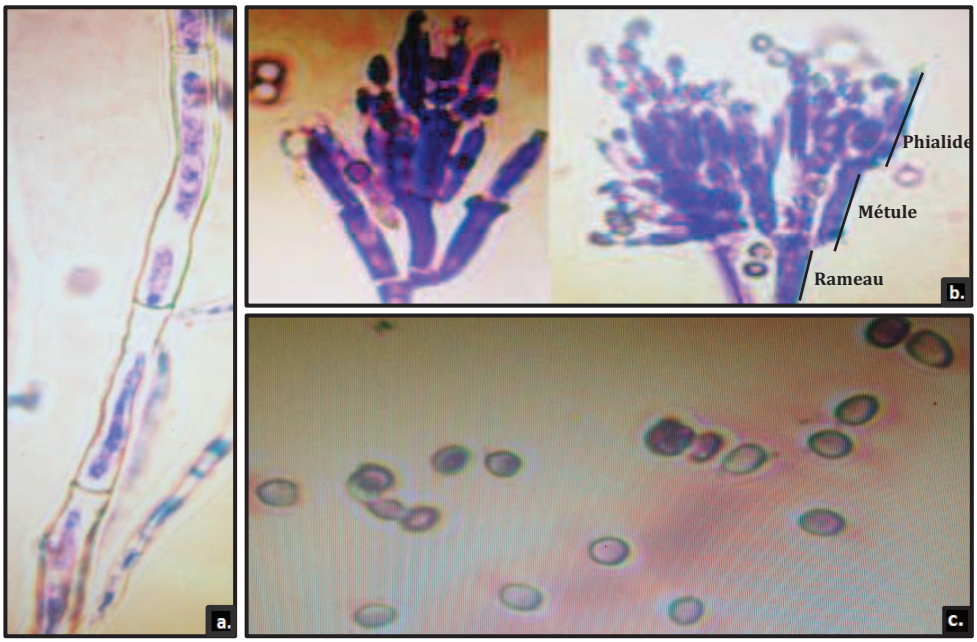


Figure 6 : Structures morphologiques de *Penicillium expansum*
(a) Stipe de conidiophore; (b) Phialides ampoulimorphes ; (c) Conidies (photos prises au microscope optique (x 1000) durant notre étude)

A part ces caractéristiques microscopiques spécifiques, *P. expansum* se distingue par ses traits macro-morphologiques. En premier lieu, cette espèce est connue pour la tendance de ses conidiophores à fasciculer, autrement dit à se regrouper en formant des touffes sur les marges des colonies (Figure 7a) (Frisvad and Samson 2004). Ses caractères culturaux ont été observés sur divers milieux de culture (Figure 7b-d). Sur un milieu CYA (Czapek Yeast extract Agar), *P. expansum* est caractérisé par des colonies de diamètre 30-40 mm après une incubation pour 7 jours à 25 °C; un mycélium blanc plissé radialement, développé en corémies, avec des aires adjacentes floconneuses à veloutées. Sur ce milieu, *P. expansum* a montré une conidiogenèse modérée, spores de couleur vert foncé; une production d'exsudat brun-orange pâle, et d'un pigment soluble de couleur caramel. Le revers de la culture est brun foncé à pâle, souvent avec des aires oranges brunâtres (Pitt and Hocking 2009). Sur un milieu MEA (Malt Extract Agar), cette espèce est caractérisée par des thalles de diamètre variable allant de 20-40 mm, de texture normalement lisse chez quelques isolats veloutés, d'autres ont au moins une partie avec des corémies. La conidiogenèse est habituellement intense, de même couleur que celle observée sur le milieu CYA ou légèrement plus grise avec production d'un pigment soluble orange brun. Le revers est pâle ou coloré par le pigment selon l'isolat. Cependant sur un milieu G25N, ce champignon est caractérisé par des thalles de diamètre 17-22 mm, plissés radialement, de texture veloutée à granuleuse en surface ; le revers est pâle brun terne (Pitt and Hocking 2009).

En outre, l'espèce *P. expansum* est qualifiée de nécrotrophe (*necros* qui signifie la mort et trophique qui veut dire nourriture ou prédation) pour sa capacité à envahir agressivement les tissus des fruits en tuant les cellules hôtes pour puiser ses nutriments (Vilanova et al. 2014). Ce champignon pathogène est un parasite de blessures qui attaque particulièrement les fruits *pomaceae* (pommes, poires) aux épidermes altérés par les chocs ou les piqûres d'insectes et engendre une maladie poste-récolte désignée comme la pourriture bleue. Cette pourriture destructive se manifeste par des symptômes typiques qui sont souvent des lésions humides circulaires et concentriques avec un contour net et de couleur brun clair (Figure 7e) (Frisvad and Samson 2004). Ces tâches se propagent rapidement à travers la surface et aussi profondément dans le tissu du fruit (Pitt and Hocking 2009). La surface des pourritures âgées peut être couverte par des tâches blanchâtres qui évoluent pour former les structures de fructification (corémies) vert-bleuâtres (Figure 7f), d'où le nom de la maladie (Bencheqroun 2009).

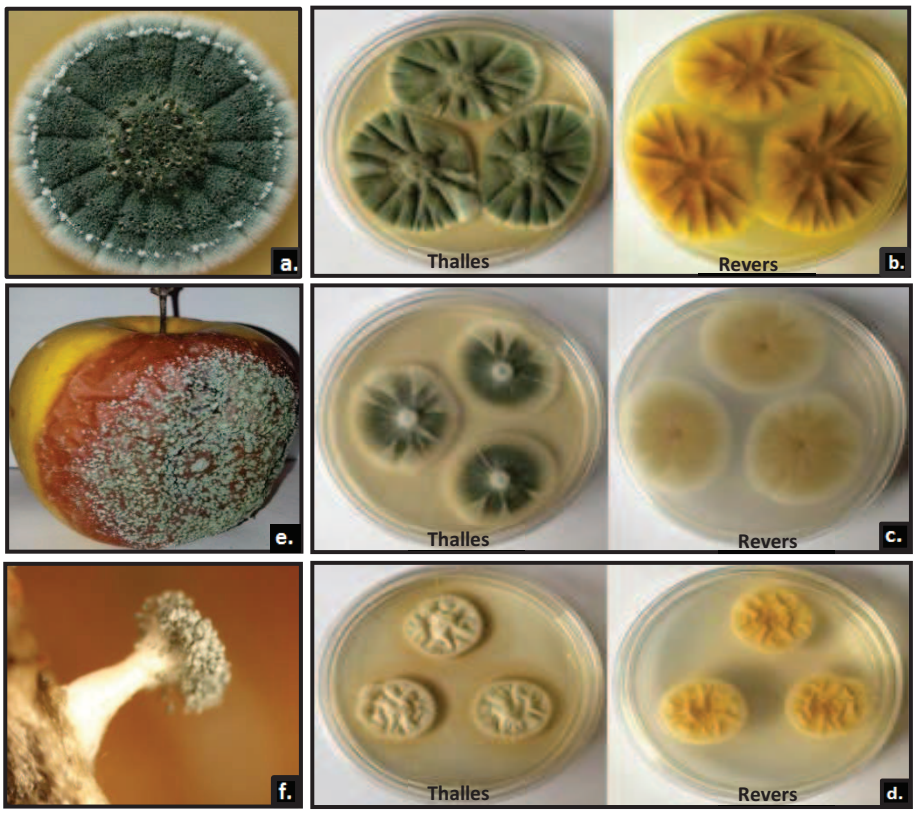


Figure 7 : Observations macroscopiques de *Penicillium expansum*.
(a) Colonie de *P.expansum* agrégée en fascicules (b) Thalles et revers de la culture sur milieu CYA, 7 jours, 25˚C (c) Thalles et revers de la culture sur milieu MEA, 7 jours, 25˚C (d) Thalles et revers de la culture sur milieu G25N, 7 jours, 25˚C (e) Aspect de la contamination d´une pomme (f) Corémie à la surface d'une lésion de pomme causée par *P. expansum* (photos prises durant notre étude)

B.2. Caractéristiques physiologiques

Compte tenu qu'il est relativement aisé de distinguer les différentes espèces de *Penicillium* par leurs caractéristiques morphologiques, les critères physiologiques n'ont été que très peu employés dans la classification de ce genre. Néanmoins, Frisvad (1981) s'est servi de ces critères dans la subdivision du genre *Penicillium*. Les propriétés considérées dans son étude comprennent la capacité du champignon à se développer sur différents milieux de culture et à produire des métabolites secondaires. A ce sujet, l'espèce *P. expansum* a montré une légère, voire absence de croissance sur les deux milieux GY agar (Gélose à base de levure-glucose) et NO_2 agar après 5 à 7 jours à 37˚C tandis qu'une bonne croissance a été observée sur le milieu Créatine Sucrose Agar (CREA) accompagnée d'une production d'acide abondante faisant varier la couleur du milieu du violet au jaune dans 5 à 7 jours. Cette production d'acide sur CREA a été suivie d'une production de

métabolites alcalins détectée par la réapparition de la couleur violette débutant au-dessous de la colonie après 8 à 21 jours de culture. Cette espèce fongique a exhibé également une croissance et développement en corémies sur gélose glucosée à la pomme de terre additionnée de Bénomyl (PDAB) tandis qu'une légère croissance (diamètre de la colonie inferieur à 1cm) est observée sur le milieu gélosé peptone additionné de pentachloronitrobenzène (PCNB). L'effet de conservateurs sur la croissance a aussi été évalué dans cette étude. A l'issue de ces expériences, *P. expansum* était capable de croître en présence de 50 ppm d'acide sorbique et 50 ppm d'acide benzoïque. Sa croissance s'est avérée inaffectée par la présence de 1000 ppm d'acide propionique, cependant *P. expansum* n'a pas été capable de se développer en présence de 5000 ppm d'acide acétique.

Une étude similaire a été menée des années plus tard par Pianzzola et al. (2004) pour caractériser des espèces de *Penicillium* responsables de la pourriture bleue des pommes en Uruguay. A part les critères évoqués précédemment, des paramètres physiologiques supplémentaires ont été rapportés dans cette étude. Dans ce travail, la capacité des isolats de *Penicillium* à produire diverses enzymes a été évaluée. Toutes les souches de *P. expansum* ont montré une capacité à produire des estérases, des pectinases et des amylases. Par contre, la production de lipase a été différente selon les souches et par conséquent, ce paramètre ne peut toutefois pas être utilisé pour l'identification de l'espèce.

D'autres expérimentations ont par ailleurs été menées pour appréhender l'adaptation physiologique de l'espèce *P. expansum*. Les résultats de ces études montrent que le taux de germination et de croissance de cette espèce est influencé dans une large mesure par des facteurs environnementaux et d´autres composés endogènes typiques du substrat. La température impacte de façon prononcée la croissance de ce champignon. Comme la plupart des autres espèces du sous-genre *Penicillium*, *P. expansum* est un champignon psychrotrophe, apte à se développer et être l'espèce dominante à des températures basses (Pitt and Hocking 2009; Elhariry et al. 2011). L'effet de la température sur la germination et le taux de croissance de *P. expansum* a été récemment modélisé par Baert et al. (2007b). A l'issue de ces analyses, il a été rapporté que le stockage au froid ne prévient pas la détérioration des pommes par cette espèce fongique, mais seulement la retarde. Une augmentation linéaire du taux de croissance a aussi été observée pour toutes les souches de *P. expansum* testées entre 2˚C et 25˚C, cependant, une diminution a été observée en augmentant davantage la température au-delà de 25°C. Les températures optimales de croissance de ces souches ont varié entre 24 et 27˚C, avoisinant les 25°C, température considérée comme optimale pour *P. expansum* par Pitt et al. (1991). Ce dernier avait rapporté que la température maximale de croissance de cette espèce était légèrement au-dessus de 30°C, conformément à la prédiction de

Panasenko (1967) qui affirme que la température maximale pour *P. expansum* varie entre 33 ˚C et 35˚C.

Outre la température, la composition atmosphérique, le pH et l´activité de l´eau (a_w), sont des paramètres physiologiques de grande influence sur la croissance de cette espèce. A ce sujet, Paster et al. (1995) ont montré que la croissance de diverses souches de *P. expansum*, évaluée en masse de tissu de pommes infecté, n'a pas été considérablement affectée par les différents niveaux d'oxygène testés (2 %, 10 % et 20 %) indiquant que cette espèce a une très faible exigence en oxygène. Cette constatation est en accord avec Sitton et Patterson (1992) qui ont démontré que les concentrations réduites en O_2 n'étaient pas suffisamment efficaces dans la prévention du développement des lésions causées par *P. expansum,* néanmoins cette croissance semble être inhibée à une concentration d'O_2 en dessous de 2,3 %. En contrepartie, la croissance de ce champignon a été stimulée par des concentrations de dioxyde de carbone (CO_2) dans l'air pouvant atteindre 15 %, mais ce gaz devient très rapidement un facteur limitant de la croissance à des niveaux plus élevés, suggérant ainsi son utilisation comme un agent fongistatique très efficace lors du stockage des pommes. Similairement, lors des essais de fumigation des caisses de fruits, 100% des spores de *P. expansum* ont été inactivées au bout de 20 jours de traitement sous une atmosphère à 13 % et 40 % de CO_2 (Cossentine et al. 2004).

L'effet du pH sur le taux de germination et de croissance de *P. expansum* n'est pas largement documenté. Hormis une étude *in vivo* menée par Prusky et al. (2004) et une autre conduite *in vitro* par Li et al. (2009), peu d'informations sont disponibles à cet égard. La première étude révèle une variation de la taille des lésions brunes engendrées par *P. expansum* en fonction des variétés de pommes testées. Le développement des lésions de pourriture était d'autant plus important que le pH initial du fruit est faible. Dans cette même étude, le traitement des pommes Golden Delicious (pH initial de 4,4) avec une solution de $NaHC0_3$ a engendré une augmentation du pH à 7,1, ce qui a entrainé une réduction de la décomposition induite par ce champignon (Prusky et al. 2004). Dans la deuxième étude, en milieu PDB (Potato Dextrose Broth) tamponné, le pH 5 était optimal pour la germination des spores de *P. expansum*, qui a débuté 6h après l'infection et son taux a atteint environ 90 % dans les 10 premières heures. Cependant, aux autres pH (2 et 8), représentant les conditions de stress acides et alcalines, la germination des spores a été significativement retardée (Li et al. 2009). Ces deux études révèlent que la germination et la croissance de *P. expansum* augmentent de façon inversement proportionnelle au pH. Par contre, un pH faiblement acide devient un facteur défavorable et limitant de la croissance de cette espèce.

Dans la littérature, l'activité d'eau minimale (a_{Wmin}) permettant la germination de cette espèce s'échelonne entre 0,83 (Mislivec and Tuite 1970) et 0,82 (Hocking and Pitt 1979). En revanche, dans une étude plus récente de Judet-Correia et al. (2010), l'a_{Wmin} estimée était plus élevée que les valeurs rapportées auparavant (a_{Wmin} =0,856). Cette différence est probablement attribuée à l'origine des isolats ; en effet, les souches de *P. expansum* décrites dans la dernière étude ont été isolées à partir des grains de raisin, caractérisés par une activité d'eau située dans la gamme des 0,980 à 0,985; donc il n'y a aucun avantage pour ces souches de croître à des a_W réduites.

B.3. Habitat et niche écologique

Penicillium expansum est une espèce répandue cosmopolite, pouvant se retrouver dans l'environnement naturel, en particulier dans le sol (Çolakoğlu 2002; Demirel et al. 2013) et l'air intérieur (Gutarowska et al. 2012). En outre, ce champignon présente une gamme extrêmement large de matrices alimentaires qu'il est capable d'infecter pour puiser les nutriments dont il a besoin dans la matière organique (Siddique 2012), tout particulièrement les fruits à pépins (tels que pommes, poires, raisins, etc.) et les fruits à noyaux (cerises, pêches, prunes, etc.). A ces denrées s'ajoutent les noix, les légumineuses (arachides et fèves) et les céréales secondaires (tels que maïs, orge, soja et sorgho) (Nguyen 2007). *P. expansum* est d'ailleurs apte à proliférer sur des substrats non utilisables pour l'alimentation comme les matériaux de construction contenant de la cellulose (papier-peint, plaques de plâtre (Gutarowska et al. 2012), copeaux et blocs de bois humides (Land and Hult 1987)).

B.4. Principaux métabolites secondaires élaborés par *P. expansum*

De par les critères morphologiques et physiologiques, le profil métabolique s'est révélé être un des caractères taxonomiques les plus utiles et significatifs pour l'identification des *Penicillium* terverticillés (Frisvad and Filtenborg 1983). Jusqu'à l'avènement de la biologie moléculaire, un large éventail de métabolites secondaires avait été rapporté à *P. expansum* ; depuis des études récentes ont largement rétréci cette liste (Andersen et al. 2004). Dans des cultures pures de *P. expansum*, la citrinine, la roquefortine C (Frisvad and Filtenborg 1983), l'acide pénicillique, l'acide cyclopiazonique, les chaetoglobosines A et C outre la patuline, ont été recensés comme métabolites de *P. expansum*. A ces derniers s'ajoutent les expansolides A et B, les communesines A et B (Larsen et al. 1998; Andersen et al. 2004), la cytochalasine et la penitrem A (Lugauskas 2005) qui ont été également révélés comme métabolites secondaires élaborés par *P. expansum*. Mattheis et Roberts

(1992) ont identifié la géosmine comme métabolite volatil de *P. expansum* et ont montré qu'elle était responsable de l'odeur terreuse et piquante associée à cette espèce. Ces différents métabolites découlent de familles distinctes ; les chaetoglobosines A et C, l'acide pénicillique, la patuline, la citrinine, la cytochalasine appartiennent à la famille des polycétides, la géosmine et les expansolides A et B sont des terpènes, tandis que l'acide cyclopiazonique et la roquefortine C appartiennent à la famille des alcaloïdes indoles. Outre leur détection dans des cultures pures lors du dépistage de nouveaux composés bioactifs de *P. expansum*, certains de ces métabolites ont naturellement été retrouvés dans l'alimentation ; c'est particulièrement le cas de la patuline et la citrinine dont la co-occurrence a été décrite dans les pommes (Martins et al. 2002) et les tomates (Harwig et al. 1979).

Parmi les extrolites mentionnés ci-dessus et rapportés à *P. expansum*, une place particulière est réservée à la patuline, la mycotoxine la plus étudiée dont le nom a souvent été associé à la contamination des fruits *pomaceae* par *P. expansum.* Par conséquent, la section suivante est entièrement consacrée à cette mycotoxine.

C. La patuline

C.1. Aperçu historique

La patuline n'a pas échappé à la définition du poison énoncée au XVIème siècle par Paracelse « Toute substance est un poison, il n'y en a aucune qui n'est pas un poison, seule la dose différentie un poison d'un remède » (Puel et al. 2010). L'époque n'est pas si lointaine où l'on considérait la patuline uniquement comme un agent antimicrobien, pouvant présenter un intérêt dans le traitement de la congestion nasale et du rhume (Moake et al. 2005; Clarke 2006). Isolée initialement des surnageants de culture d'*Aspergillus clavatus* par Waksman et ses collaborateurs (1942), elle a été identifiée plus tard comme ayant un effet antibiotique contre plus de 75 bactéries à Gram+ et à Gram- (Moake et al. 2005). La patuline occupe la deuxième place juste derrière les aflatoxines en termes de quantité de données existantes, ce en raison de son effet antimicrobien (Paterson 2006). À cause de sa co-découverte par plusieurs groupes de chercheurs, la patuline a connu au fil du temps une grande diversité d'appellations en relation avec l'espèce fongique productrice telles que : clavacine, expansine, claviformine, gigantine et mycocine C. Cependant, à ce jour seul le nom ''patuline'' a persisté (Puel 2007). Ce n'est qu'en 1959, suite à une épidémie du bétail due à une intoxication alimentaire attribuée à la patuline, que les recherches sur cette molécule en tant qu'antibiotique potentiel furent abandonnées. Elle fut définitivement reclassée dans le large groupe de composés connus sous le nom de « mycotoxines » (Özdemir et al. 2009).

C.2. Aspect chimique : Propriétés physico-chimiques

La patuline est un contaminant chimique hautement toxique. La 4-hydroxy-4H-furo [3,2c] pyran-2(6H) one est son nom chimique suivant la nomenclature de l'Union internationale de la chimie pure et appliquée (UICPA)(Khorrami and Taherkhani 2011). Il s'agit d'une lactone insaturée, de petite taille, de formule empirique $C_7H_6O_4$, avec une masse moléculaire de 154,12 (Singh 1967). Une structure chimique de la patuline a été proposée par Raistrick (1943), ensuite sa structure prouvée, la patuline a été synthétisée par Woodward et Singh (1950)(Figure 8). La patuline forme des cristaux incolores à section losangique ou prismatique et présente un point de fusion de 111°C (Trucksess and Tang 1999; Ionescu et al. 2010). Son maximum d'absorbance (λ max) se situe à 275 nm. C'est une substance neutre, soluble dans l´eau et la plupart des solvants organiques tels que l'éthanol, le méthanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle, l'éther et le chloroforme, par contre totalement insoluble dans les pentanes-hexanes comme le benzène ou l'éther de pétrole (Ciegler 1977). Etant

donné que la patuline est un composé soluble dans l'eau et de faible poids moléculaire, elle est potentiellement capable de diffuser de la partie pourrie du fruit vers les parties visiblement saines (Bandoh et al. 2009). Elle est stable en milieu acide quel que soit la température, par contre elle devient instable et perd son activité en milieu alcalin (Brackett and Marth 1979).

La stabilité de la patuline vis-à-vis de certains traitements chimiques de conservation a été largement étudiée. Tout d'abord, les ions manganèse se sont révélés essentiels à la production de la patuline (Scott et al. 1986). Puis, la patuline s´est montrée fortement instable et progressivement détruite pendant le stockage en présence du Dioxyde de soufre (Tabatabaie et al. 2010), des protéines contenant du soufre tel que le glutathion, la cystéine et thioglycolate ainsi que les acides organiques principalement l´acide ascorbique (Drusch et al. 2007). Cette forte dégradation lors de contact avec des molécules soufrées est due à la forte réactivité du groupement lactone de la patuline.

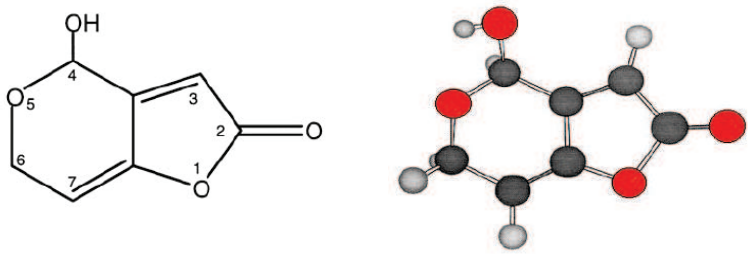


Figure 8 : Structure chimique et modèle moléculaire de la patuline

C.3. Production de la patuline par les champignons toxinogènes

La biosynthèse de toute mycotoxine est généralement limitée à quelques espèces de moisissures et au sein d'une même espèce, cette production est souvent souche-dépendante (Bokhari and Aly 2009). En ce qui concerne la patuline, cette dernière est élaborée comme métabolite secondaire par une large variété de micromycètes qui a été estimée sur la base d'une analyse bibliographique à plus de 60 espèces fongiques (Moake et al. 2005) appartenant particulièrement aux genres *Aspergillus, Penicillium, Byssochlamys* et *Paecilomyces*. Il est aujourd'hui admis que seules les espèces de ces quatre genres produisent la patuline. Parmi ces derniers, le genre *Penicillium* s'est avéré le producteur majeur de patuline, dont l'espèce *P. expansum* est la plus souvent associée à l'occurrence de cette mycotoxine et par conséquent la plus inquiétante à l'égard de la santé publique et de l'économie (Morales et al. 2008b). Une revue

exhaustive des mycotoxines et autres extrolites produits par les espèces du genre *Penicillium* et sous-genre *Penicillium* menée par Frisvad et al. (2004) dénombre 14 espèces productrices de patuline: *P. carneum, P. clavigerum, P. concentricum, P. coprobium, P. dipodomyicola, P. expansum, P. glandicola* (anciennement dénommé *P. granulatum*), *P. formosanum, P. gladioli, P. griseofulvum* (anciennement dénommé *P. urticae* et *P. patulum)*, *P. marinum, P. paneum, P. sclerotigenum, P. vulpinum*. Sur les 14 espèces citées, six seulement ont été isolées de denrées alimentaires, il s'agit de *P. expansum, P. griseofulvum, P. dipodomyicola, P. carneum, P. paneum et P. sclerotigenum* (Dombrink-Kurtzman and McGovern 2007). Il est évident de souligner que les espèces évoquées partagent la particularité d'appartenir aux deux sections *Penicillium* et *Roqueforti,* cependant aucune espèce de la section *Viridicata* n'a été reconnue comme productrice de patuline. Dans la section *Penicillium,* les espèces productrices sont réparties sur les différentes séries de la section, à savoir *Expansa, Urticicolae, Claviformia* et *Gladioli.* Cependant, pour la section *Roqueforti* qui ne comporte que 3 espèces de champignons (*P. carneum, P. paneum* et *P. roqueforti*), seules les deux premières sont jugées productrices de patuline. A l'origine, l'espèce *P. roqueforti* a été considérée comme productrice de patuline (Olivigni and Bullerman 1978; Frisvad 1981) mais sa capacité de production a été démentie plus tard (Boysen et al. 1996) lors de la division de l'ancienne espèce *P. roqueforti* en trois espèces distinctes. C'était le cas aussi de quelques autres espèces de ce sous-genre ; telles que *P. brevicompactum* (Paterson et al. 2003)*, P. aurentiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. commune, P. crustosum*, *P. echinulatum, P. hirsutum*, *P. italicum*, *P. verrucosum* et *P. viridicatum* (Frisvad et al. 2004). Récemment, la production de cette toxine a été montrée chez des souches marines de *P. expansum* et *P. antarcticum* (Vansteelandt et al. 2012). Suivant la classification de Pitt (1979), cette dernière espèce appartient à la série *Citrina* dans le sous-genre *Furcatum*. Ces détections furent les premières à décrire la synthèse de patuline par des espèces marines de *Penicillium* en soulignant leurs risques pour les animaux marins et leurs consommateurs.

En revanche, le genre *Aspergillus* parait moins abondant en termes d'espèces productrices de patuline qui sont étroitement limitées à ceux de la section « *Clavati* », telles que : *A. clavatus, A. giganteus* et *A. longivesica* et *A. pallidus* (Varga et al. 2003; Varga et al. 2007). D'autres espèces d'*Aspergillus* ont été incriminées ou soupçonnées auparavant comme productrices de patuline, mais leur capacité de production a été infirmée plus tard, il s'agit des espèces *A. terreus, A. candidus, A. niveus*, *A. carneus*, *A. amstelodami, A. echinulatus, A. fumigatus, A. parasiticus, A. repens, A. variecolor, A. versicolor* (Steiman et al. 1989).

Finalement, à ces deux genres reconnus comme producteurs majeurs, s'ajoutent l'espèce *Byssochlamys nivea* (Rice et al. 1977; Dombrink-Kurtzman and Engberg 2006) et quelques espèces

de *Paecilomyces,* la forme asexuée de *Byssochlamys.* Par contre, *Bysssochlamys fulva* longtemps considérée comme productrice de patuline (Rice et al. 1977) a été retirée de cette liste après l'analyse de ses métabolites secondaires par HPLC-DAD et la caractérisation moléculaire des gènes associés à la production de patuline (Houbraken et al. 2006; Puel et al. 2007). Au sein du genre *Paecilomyces*, quelques souches de *Paecilomyces saturatus* (Samson et al. 2009) se sont avérées productrices de patuline. Certaines souches de *Paecilomyces variotii* (la forme asexuée de *Byssochlamys spectabilis*) ont également montré un potentiel de production de patuline (Bokhari et al. 2009). La production de cette mycotoxine par le genre *Paecilomyces* a été précédemment évoquée il y a des années par Hacking et Rosser (1981). Sur les 26 isolats de *Paecilomyces niveus* obtenus à partir des ensilages, 21 se sont révélés producteurs de patuline sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar).

C.4. Occurrence de la patuline dans l´alimentation

Les champignons reconnus comme producteurs de patuline ont été retrouvés et isolés d´une ample gamme d´aliments et de boissons. Néanmoins, la présence de ces champignons n'implique pas forcément la présence de patuline dans le produit alimentaire car de nombreuses variables contribuent à la production de cette dernière. Il est à noter que les conditions permettant la toxinogénèse sont généralement plus limitées et exigeantes que celles autorisant la croissance fongique (Filtenborg et al. 1996; Lejla et al. 2010).

La filière " fruits " en général et " pomme " en particulier représente le segment de l'industrie agro-alimentaire le plus touché par les espèces toxinogènes produisant la patuline et constitue de loin la principale source de contamination en patuline dans l´alimentation humaine (Chen et al. 2004). Réputé comme étant saprophyte de la pomme, *Penicillium expansum* est le champignon générant le plus grand souci. En effet ce champignon est le responsable majeur de la pourriture bleue ou pourriture molle des pommes, une grave maladie post-récolte survenant principalement pendant le stockage (Baert et al. 2007b; Menniti et al. 2010). Cette pourriture présente une évolution rapide sur les fruits mûrs mais plus lente sur ceux qui n'ont pas encore atteint le pic climactérique. Elle est généralement distinguée par une odeur de moisi.

Dans l´industrie alimentaire, la production de la patuline est fréquemment mais non exclusivement associée à la pourriture des pommes. Cette mycotoxine a été isolée parfois des parties pourries d´autres fruits comme les poires, les abricots, les pêches, les fraises, les myrtilles, les cerises et le raisin, mais en quantités moins inquiétantes que celles observées dans les pommes

(Puel et al. 2010). La patuline a été détectée dans les poivrons doux et dans les petits fruits rouges. Elle a également été retrouvée dans les tomates, autant sa présence dans leurs produits dérivés comme les concentrés de tomates, le gaspacho et le salmorejo n'a jamais été rapportée (Van de Perre et al. 2013). La patuline est quasiment absente dans les fruits intacts, car ce sont les dégâts physiques à la surface du fruit qui le rend vulnérable à l´infection par *P. expansum* et les autres espèces fongiques productrices de patuline (Murphy et al. 2006). Plusieurs études visant à étudier la distribution de la patuline dans les fruits atteints, ont révélé que la contamination par la patuline est principalement associée aux tissus visiblement pourris, mais elle peut se retrouver occasionnellement dans les tissus sains environnants avec des teneurs beaucoup moins importantes (Bandoh et al. 2009; Menniti et al. 2010). A ce propos, certains auteurs ont montré le pouvoir de la patuline à diffuser de 1-2 cm au-delà des zones pourries dans les pommes, de 0,6 cm dans les poires, tandis que dans les tomates, la patuline s'est retrouvée capable de diffuser dans la totalité du fruit. Les différences examinées en termes de capacités de diffusion semblent être étroitement liées à la viscosité de la matrice en présence. Ces données permettent de constater que la patuline peut facilement pénétrer à travers les aliments de faible viscosité contenant des quantités significatives d´eau (Rychlik and Schieberle 2001).

Malgré leur faible teneur en eau, les fruits secs se sont également retrouvés victimes de la contamination par la patuline. Des figues sèches obtenues à partir de quatre figuiers situés dans la région égéenne en Turquie ont été analysées afin de déterminer leur teneur en patuline. Dans cette étude il a été observé que la patuline était présente dans les figues aptes à la transformation industrielle à des concentrations s'échelonnant entre 39,3 et 151,6 ppb, mais pas dans les figues destinées à une consommation directe (Karaca and Nas 2006). Cette toxine a également été détectée dans des rondelles de pommes séchées à une concentration respectant les limites de sécurité (Katerere et al. 2008).

La patuline est une molécule stable en milieu acide et résistante vis-à-vis des hautes températures, et par conséquent elle n'est pas détruite et peut subsister même après le traitement thermique appliqué en cours de production des jus de fruits. La contamination des sous-produits issus de la transformation des pommes ou d´autres fruits susceptibles d´être naturellement contaminés par la patuline a été rapportée dans plusieurs études. Sa présence a été fréquemment décelée dans les jus de pommes non fermentés (Özdemir et al. 2009; Reddy et al. 2010), les purées de pommes (Funes and Resnik 2009) ainsi que dans les jus de poires, d´abricots, de pêches (Spadaro et al. 2008) et le jus de raisins (Rychlik and Schieberle 1999). L´apparition de la patuline dans les sous-produits issus de la transformation des fruits est majoritairement attribuée à

l'utilisation des fruits de qualité inférieure qui ne conviennent pas à la vente directe sur le marché, et ceux présentant des dommages physiques qui constituent un point d´entrée idéal pour les espèces fongiques productrices de patuline (Morales et al. 2008b). Depuis que la production de patuline a été principalement associée au tissu infecté et pourri, l'élimination complète de la partie pourrie des fruits peut être une bonne pratique préventive avant tout procédé de production, pour réduire les teneurs en patuline dans les produits finaux (Hana 2009). En revanche, certaines études ont montré que la patuline est relativement instable pendant la fermentation alcoolique, et par conséquent les produits fermentés comme le cidre, la bière et le vin sont généralement exempts de patuline (Stinson et al. 1978; Reddy et al. 2010). La cause de ce phénomène n´est pas complètement élucidée jusqu´à présent, mais deux hypothèses sont proposées. La première suggère que la disparition de la patuline est due à une action des protéines enzymatiques des levures dans les conditions fermentatives, ce qui conduit à la production de deux produits l'E-ascladiol, précurseur biosynthétique de la patuline, et son isomère le Z-ascladiol (Shao et al. 2012). Alors que la deuxième hypothèse explique la baisse des niveaux de patuline par l'adsorption de cette dernière sur les parois levuriennes (Coelho et al. 2008; Guo et al. 2012; Zhu et al. 2015).

La présence de la patuline n'est pas limitée aux fruits et leurs produits dérivés, les légumes et les céréales peuvent aussi contribuer à un certain apport en patuline. La capacité de *P. expansum* à produire de la patuline sur des échantillons de pommes de terre et de carottes a été quantitativement confirmée (Lugauskas 2005). Les céréales et les produits d'origine céréalière ont fait également l'objet de plusieurs études. A l´issue d´une enquête épidémiologique menée par Escoula (1977), il s´est avéré que 59 % de 34 ensilages de maïs testés contenaient de la patuline (cité par le rapport de l'AFSSA(2009)). Cette patuline est produite pas *Byssochlamys nivea*, un contaminant fréquent des ensilages de maïs. La production de patuline a de même été détectée dans un pain à base de farine de blé spontanément moisi (Rychlik and Schieberle 2001). Dans cette même étude, une infection artificielle de pain par une souche de *P. expansum* a entrainé une production non négligeable de patuline qui a atteint les 1,6 mg/kg au niveau de la partie pourrie.

L´industrie fromagère à son tour n´a pas échappé à la contamination par la patuline. Une publication récente a rapporté la détection de patuline dans des échantillons prélevés à partir des croûtes d´un fromage traditionnel à pâte semi dure, nommé "Toma Piemontese" (Pattono et al. 2012). Ces données surprenantes contrarient plusieurs publications antérieures ayant suggéré l´absence totale de patuline dans le secteur fromager, due à la fois à la présence de groupes sulfhydriles dans les fromages et à la réactivité de cette mycotoxine vis-à-vis de ces groupements, phénomène qui aboutit à la détoxification des petites quantités de patuline qui peuvent être

produites (Olivigni and Bullerman 1977; Lopez-Diaz et al. 1996; Taniwaki et al. 2001). Pour cette même raison, la contamination des produits carnés par la patuline est considérée comme un problème d´une importance mineure pour la santé des consommateurs. Bailly et al. (2005) ont rapporté la non-production de patuline par une souche de *P. patulum* dans les échantillons de Jambon, pourtant sa production par cette même souche a été validée sur un milieu à base d'extrait de levure (YES). Outre sa non-production, l´instabilité de la patuline a également été mise en évidence, ce qui s'est traduit par une disparition totale de cette toxine des échantillons de Jambon dans les 6 heures qui ont suivi son injection artificielle.

Bien que l´alimentation humaine soit la plus concernée par le problème de la patuline, la contamination par cette mycotoxine a laissé également des traces remarquables sur le secteur de l´alimentation animale. A l´issue d´une intoxication aiguë de bovins en Belgique, une analyse mycologique a été réalisée sur les échantillons de fourrage à base de grains d'orge maltés qui avaient servi à l´alimentation des bêtes atteintes. Sur la base de ces analyses, Sabater-Vilar et al. (2004), ont rapporté la présence de la patuline en quantités détectables dans ces échantillons. Une prédominance d´une souche d´*Aspergillus clavatus* a été également signalée. Bien que le champignon isolé ait été validé pour sa capacité à produire la patuline sur milieu de culture, il est difficile d'attribuer à la patuline seule la responsabilité de cet accident d'élevage. En effet, *A. clavatus* produit d'autres métabolites toxiques.

Néanmoins, bien que la présence de la patuline soit rapportée dans diverses sources alimentaires, sa présence dans les fruits *pomaceae*, surtout dans les pommes et les produits dérivés fabriqués avec des pommes contaminées et invendables, demeure le plus grand sujet d'inquiétude.

C.5. Les voies de biosynthèse

C.5.1. Voie chimique de la biosynthèse de la patuline

Bien que l'intérêt préliminaire pour la patuline comme un antibiotique ait rapidement diminué en raison de sa forte toxicité notamment sur les animaux, sa biosynthèse a attiré une attention considérable sachant qu'elle inclut comme précurseur le prototype des composés aromatiques issus du métabolisme des polycétides, l'acide 6-méthylsalicylique (6-MSA)(Bentley and Bennett 1999). De nombreuses études basées à la fois sur le marquage isotopique des molécules biologiques et sur la fragmentation d'extraits cellulaires ont permis d'initier l'élucidation de cette voie, durant les premières années. Les études poursuivies plus tard faisant appel à des

mutants bloqués au niveau d'une étape réactionnelle de la biosynthèse, ont aidé à découvrir la panoplie de métabolites intermédiaires impliqués dans cette voie (Puel et al. 2010).

A l'heure actuelle, la biosynthèse de la patuline est relativement bien caractérisée sur le plan chimique et consiste en une série de réactions d'oxydoréduction et de condensation estimées à 10 étapes au minimum, dont la majorité est catalysée par des enzymes (Figure 9a). Cette voie de biosynthèse est très spécifique et n'envisage pas l'implication d'autres mycotoxines.

C.5.1.1. Premières étapes (Acétate → Gentisaldéhyde) :

La synthèse de la patuline débute comme pour n'importe quel autre polycétide par une succession de condensation de type Claisen de 3 unités de malonyl-CoA et d'une molécule d'acétyl-CoA. Le premier grand intermédiaire dans cette cascade enzymatique est l'acide 6-methylsalicylique (6-MSA). L'enzyme catalysant cette première étape est l'acide 6-méthyl salicylique synthase dont la structure chimique et le mécanisme d'action ont été largement abordés dans la section (A.2.2.2).

Bien que la conversion de l'acide 6-methylsalicyclique en patuline chez *P. patulum* a été déjà décrite dans les rapports successifs de Tanenbaum et Bassett (1958; 1959) la nature des autres précurseurs intermédiaires est demeurée obscure. Une identification ultérieure de plus de 16 métabolites générés lors de la transformation de l'acide 6-méthylsalicylique en patuline chez ce champignon, a construit les bases des premières hypothèses de cette biosynthèse. Cependant aucun itinéraire préférentiel n'a été identifié avant l'étude de Scott et Yalpani (1967) qui ont proposé, en utilisant la spectrométrie de masse, une voie privilégiée menant à la patuline. Cette découverte a par la suite été confirmée par une étude de Forrester et Gaucher (1972a) faisant appel à une technique de marquage cinétique, dans laquelle l'acétate radiomarqué et huit autres métabolites secondaires pertinents ont été additionnés à la culture. Dans cette étude, la cinétique d'incorporation de la radioactivité dans les métabolites ultérieurs a été régulièrement suivie. Les résultats obtenus étaient en parfait accord avec ceux de Scott et Yalpani (1967) à l'exception du gentisyl alcool qui n'a pas été incorporé dans la patuline lors de l'étude de Forrester.

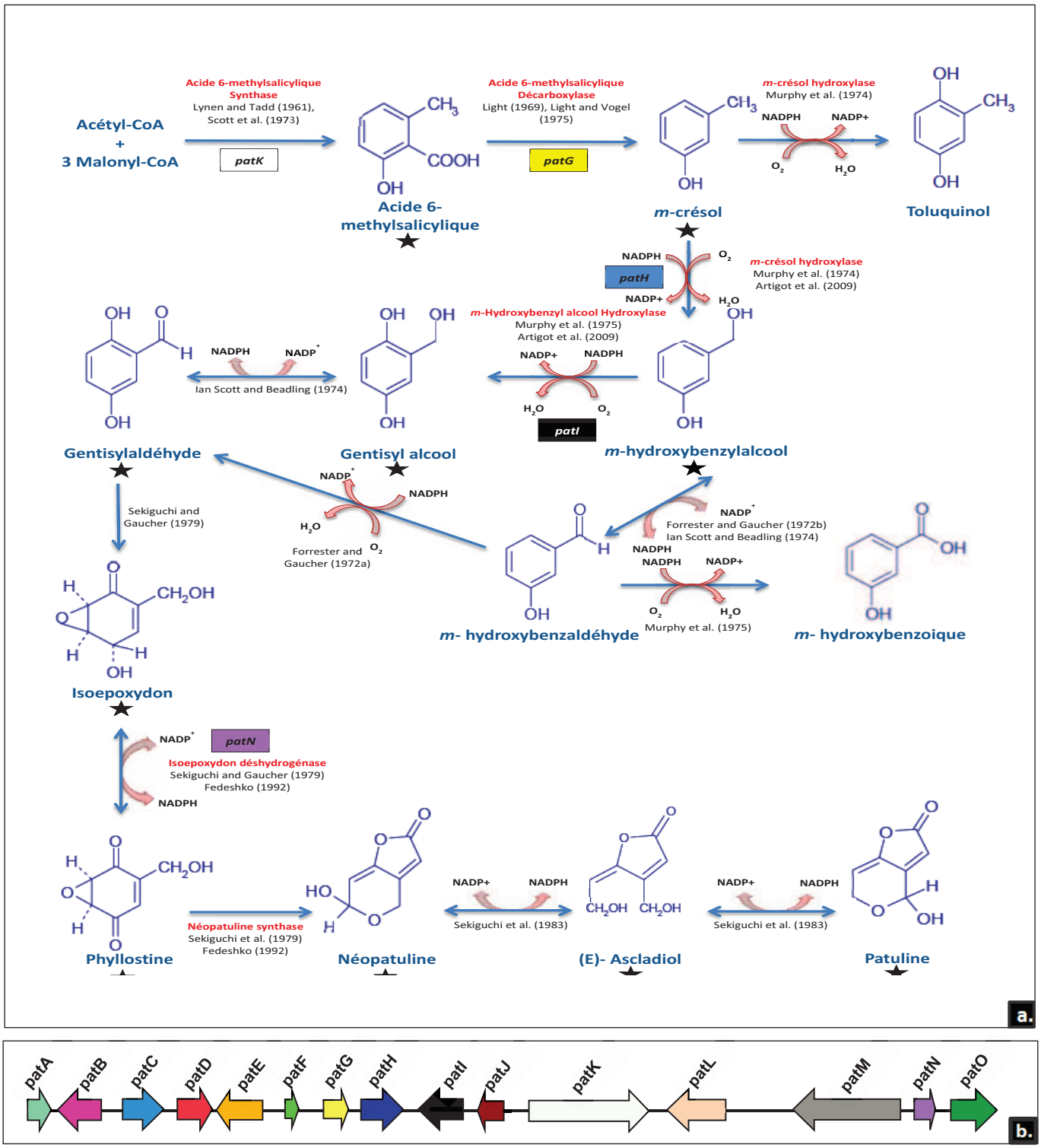


Figure 9 : (a) Voie biochimique de la biosynthèse de la patuline et (b) Cluster des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la patuline chez *Aspergillus clavatus* NRRL1.

Les noms indiqués en rouge correspondent aux enzymes purifiées et caractérisées. Les étoiles désignent les intermédiaires évidement impliqués dans la voie de biosynthèse de la patuline. Les encadrés colorés indiquent les gènes caractérisés pour leur implication dans l'une ou l'autre des étapes de la biosynthèse (schéma adapté et modifié d'Artigot et al.(2009)).

Le passage de l'acide 6-méthylsalicylique en gentisaldéhyde fait intervenir au minimum 4 étapes enzymatiques: (a) une décarboxylation, (b) une transformation du groupement méthyle en hydroxyméthyle, (c) une oxydation du groupement hydroxyméthyle en aldéhyde, et finalement (d) une hydroxylation du noyau aromatique. L'ordre dans lequel ces réactions ont lieu n'a pas été clair au tout début de l'étude de la voie de biosynthèse de la patuline. La détection du *m*-crésol dans le milieu de culture et la conversion du *m*-crésol deutéré en patuline ont exclu l'implication de l'acide 6-formylsalicylique dans la voie de synthèse de la patuline et ont suggéré que la deuxième étape de cette voie réside en la décarboxylation de l'acide 6-méthylsalicylique en *m*-crésol (Scott and Yalpani 1967). Cette réaction survient sous l'action de l'acide 6-methylsalicylique décarboxylase, une enzyme isolée et caractérisée par Light (1969) et Light et Vogel (1975). Deux activités hydroxylase transformant le *m*-crésol en dérivés hydroxylés : le 2,5-dihydroxytoluène (toluquinol) ou le *m*-hydroxybenzyl alcool, avec une préférence pour le dernier, ont été ultérieurement repérées en utilisant des préparations d'extraits cellulaires de *P. paneum* (Murphy et al. 1974). Ultérieurement, il a été montré que ces deux activités hydroxylase sont catalysées par la même enzyme, un cytochrome P450 (Artigot et al. 2009). De leur côté, Scott et al. (1973) avaient affirmé que le 2,5-dihydroxytoluène deutéré était métabolisé en déoxyépoxydon, sans incorporation significative dans la patuline. Sur la base de ces trois études, il est communément admis que le toluquinol est un co-métabolite de la patuline et non un intermédiaire de sa voie de biosynthèse. Ces deux réactions d'hydroxylation décrites précedemment nécessitent de l'oxygène moléculaire et du NADPH pour leur activité. La contribution d'un cytochrome P450 à ce niveau, est fondée sur le fait que ces deux réactions sont inhibées sous l'action du monoxyde de carbone et réactivées par la lumière (Murphy et al. 1974), ce qui a été démontré en 2009 par l'équipe du laboratoire. Le groupe de Lynen a décrit un an plus tard, l'hydroxylation du *m*-hydroxybenzyl alcool en gentisyl alcool dans les microsomes extraits de *P. patulum*. L'activité a été jugée de type oxydase, avec une exigence à l'oxygène moléculaire et au cofacteur réduit le NADPH (Murphy and Lynen 1975).

Forrester et Gaucher (1972b) ont décrit la purification partielle d'une alcool-déshydrogénase spécifique pour la conversion du *m*-hydroxybenzyl alcool en *m*-hydroxybenzaldéhyde. Cette déshydrogénase intracellulaire était dotée d'une spécificité élevée vis-à-vis de son substrat, un pH optimal de 7,6 et un poids moléculaire approximatif de 120000. Cette conversion du *m*-hydroxybenzyl alcool en *m*-hydroxybenzaldéhyde s'est révélée significativement plus rapide que la conversion du gentisylalcool en gentisaldéhyde. Cependant, l'incapacité à détecter une activité *m*-hydroxybenzaldéhyde-hydroxylase dans les préparations cellulaires de *P.*

patulum, implique que la biosynthèse de la patuline doit procéder du *m*-hydroxybenzyl alcool via le gentisyl alcool au gentisaldéhyde, plutôt que du *m*-hydroxybenzaldéhyde (Murphy and Lynen 1975). De même, Artigot et al. (2009) ont montré que le cytochrome P450 qui permet de passer du *m*-hydroxybenzyl alcool en gentisyl alcool était incapable d'assurer la transformation du *m*-hydroxybenzaldéhyde en gentisaldéhyde. Néanmoins, l'implication du gentisyl alcool à la place du *m*-hydroxybenzaldéhyde est restée un sujet de débat, sachant que l'absence de la conversion du ^{3}H gentisyl alcool dans des cultures de *P. griseofulvum* (Forrester and Gaucher 1972a) et la grande efficacité du *m*-hydroxybenzaldéhyde en tant que précurseur de la patuline tendent à rejeter l'hypothèse de Murphy et Lynen (1975). Une conversion active, NADPH-dépendante du *m*-hydroxybenzaldéhyde à l'acide *m*-hydroxybenzoïque a été également détectée (Murphy and Lynen 1975). Dans la même stratégie de travail, deux déshydrogénases aromatiques catalysant les conversions réversibles du gentisyl alcool et du *m*-hydroxybenzyl alcool en leurs aldéhydes correspondants ont été partiellement purifiées (Ian Scott and Beadling 1974). Il est clair que l'implication des aldéhydes : *m*-hydroxybenzaldéhyde et gentisaldéhyde reste à éclaircir.

C.5.1.2. Dernières étapes (Gentisaldéhyde→ Patuline) :

Jusqu'en 1978, la partie post-gentisaldéhyde semble consister en un seul cycle de clivage médié par une dioxygénase (Sekiguchi et al. 1983). A cet égard, aucun intermédiaire entre les métabolites aromatiques évoqués ci-dessus et la patuline n'a été isolé. Pendant près de trois décennies, le gentisaldéhyde a été supposé être le dernier précurseur aromatique dans la biosynthèse de la patuline. Cette hypothèse a été validée expérimentalement par l'incorporation de trois deutériums du cycle aromatique du gentisaldéhyde dans la molécule de patuline (Scott et al. 1973). Le *m*-hydroxybenzaldéhyde a de même été suggéré comme dernier précurseur aromatique, mais cette hypothèse reste très peu plausible étant donné qu'il ne peut y avoir qu'une voie principale menant à la patuline et l'enzyme catalysant la conversion du gentisaldéhyde en patuline a été isolée.

Dès l'année 1977, Sekiguchi et Gaucher ont pris le relais afin d'élucider la partie post-gentisaldéhyde de la voie de biosynthèse de la patuline. Ce groupe de chercheurs a introduit une nouvelle technique basée sur l'utilisation et la caractérisation de souches mutantes de *P. griseofulvum* (anciennement *P. urticae*) incapables de synthétiser la patuline. Cinq mutants ont été particulièrement analysés et ont permis de montrer dans un premier temps que la patuline et les autres métabolites secondaires connexes ne sont pas liés à la conidiogénèse chez *P. griseofulvum*

(Sekiguchi and Gaucher 1977) et que la synthèse de la patuline passe par la synthèse de l'isoépoxydon, la phyllostine, l'isopatuline (néopatuline) et l'ascladiol. L'un de ces mutants Pat - (J l) est capable d'accumuler un composé non détecté auparavant dans les cultures de *P. griseofulvum*. Ce métabolite a été isolé et caractérisé en tant que phyllostine (5,6-époxygentisylquinone), identifié précédemment chez *Phyllosticta sp.* (Nabeta et al. 1975). En ce qui concerne sa localisation dans la voie de biosynthèse, il est évidemment un intermédiaire efficace dans la partie post-gentisaldéhyde, sachant qu'il n'est pas détecté chez le mutant (J II) bloqué immédiatement après le gentisaldéhyde, mais chez qui la production de patuline est restaurée après ajout de phyllostine (Sekiguchi and Gaucher 1978).

Dans le cadre des efforts continus pour démêler la partie terminale de la voie de biosynthèse de la patuline, ces même chercheurs ont caractérisé un nouveau précurseur époxyde de la patuline, le (+) isoépoxydon (Sekiguchi and Gaucher 1979). Ce nouveau précurseur identifié est largement identique à son co-métabolite la (-) phyllostine ; les deux n'étant pas des métabolites extracellulaires, cependant des précurseurs efficaces de la patuline. Certaines hypothèses ont été émises afin de définir lequel parmi ces deux précurseurs est le premier intermédiaire non-aromatique de cette voie. A ce sujet, une activité isoépoxydon déshydrogénase, NADP dépendante, catalysant l'interconversion réversible entre l' (+) isoépoxydon et la (-) phyllostine, a été identifiée dans des extraits cellulaires de la souche sauvage de *P. urticae* NRRL 2159A. Cette enzyme est remarquable par la spécificité élevée vis-à-vis de son substrat (Sekiguchi and Gaucher 1979). Elle a éte purifiée des années plus tard par Fedeshko (1992). Un autre mutant déficient en patuline (S15) a été utilisé plus tard pour la caractérisation d'un nouveau métabolite dans la cascade enzymatique aboutissant à la synthèse de cette toxine, l'isopatuline (néopatuline). L'association de l'isopatuline dans la voie de biosynthèse de la patuline a été confirmée en faisant appel à un autre mutant (P3) bloqué entre la phyllostine et l'isopatuline. L'isopatuline ajoutée à une suspension de cellules du mutant P3 a été convertie en patuline (Sekiguchi et al. 1979).

L'avant dernière étape de cette voie est la conversion de la néopatuline en E-ascladiol par une réduction NADPH dépendante. Le produit de cette réaction, l'E-ascladiol, est ensuite oxydé en patuline soit converti par une réaction non-enzymatique en son isomère le Z-ascladiol (Sekiguchi et al. 1983). L'ascladiol a été précédemment isolé comme nouveau composé toxique d'une culture d'*A. clavatus* lors d'une tentative de purification de la patuline. La toxicité aiguë de ce composé était quatre fois moins forte que celle de la patuline (Suzuki et al. 1971).

C.5.2. Biosynthèse de la patuline sur le plan moléculaire et biochimique

Génétiquement parlant, la biosynthèse de la patuline est moins bien connue. Les gènes impliqués dans cette voie sont susceptibles d'être organisés au sein d'un cluster semblablement aux voies de biosynthèse des autres mycotoxines, comme l'aflatoxine (Yu et al. 2004b), l'ochratoxine A (Karolewiez and Geisen 2005), la stérigmatocystine (Brown et al. 1996) et les trichothécènes (Kimura et al. 2003). Sachant que cette biosynthèse nécessite l'activité de toutes les enzymes de la chaîne de biosynthèse, la présence de la totalité des gènes codant pour ces enzymes est un critère évidemment indispensable et commun à toutes les espèces productrices.

Le travail élaboré par Artigot et al. (2009) a été le premier à décrire l'intégralité du cluster de la patuline chez une souche non-productrice de patuline d'*Aspergillus clavatus* NRRL1. Ce cluster regroupe 15 gènes (*patA*-*patO*) occupant une région d'environ 40 Kb (Figure 9b). Certains gènes de ce cluster ont été identifiés chez d'autres espèces productrices. Le gène *idh* (*patN*) isolé initialement chez *Penicillium griseofulvum* (Fedeshko 1992) a été également retrouvé chez d'autres espèces productrices de patuline, à savoir *P. expansum* et *Byssochlamys nivea* (Dombrink-Kurtzman and Engberg 2006; White et al. 2006). Un gène *abc* (*patM*), codant pour un transporteur actif de la famille des ABC (ATP binding cassette) transporteurs a été localisé en amont du gène *idh chez P. griseofulvum.* Des orthologues de ce gène ont été également identifiés chez *P. expansum* et *B. nivea* (Puel 2007). Un autre gène codant pour une isoamyl alcool oxydase (*patO*) a été également identifié en aval du gène *idh (patN)* chez *P. griseofulvum* (Dombrink-Kurtzman 2008), mais son rôle n'a pas été élucidé.

Des îlots de ce cluster ont été en outre repérés dans le génome de certaines espèces non-productrices de patuline comme *P. chrysogenum* (van den Berg et al. 2008), *Talaromyces stipitatus* (précédemment connu sous *Penicillium stipitatum*) et *Aspergillus terreus*. Cette incapacité à produire la patuline est due évidement à l'absence de certains gènes clés comme le gène *6msas* chez *T. stipitatus* et le gène *idh* dans *A. terreus* et *P. chrysogenum*. Très récemment, des gènes orthologues pour sept des quinze gènes du cluster de la patuline (*patB, patC, patD, patF, patG, patJ,* et *patL*) ont été identifiés dans le génome d'un autre agent pathogène de post-récolte, *P. digitatum*, responsable de la pourriture verte des agrumes (Marcet-Houben et al. 2012). Un orthologue tronqué du gène *patI* situé entre le *patJ* et le *patL* et deux gènes supplémentaires (*patK* et *patH*) situés sur un autre « scaffold » et séparés par trois gènes ne faisant pas partie du cluster de la patuline ont été également repérés chez cette espèce. La présence du gène tronqué et la perte des autres

composantes de ce cluster, suggèrent sa non fonctionnalité dans la voie de biosynthèse de la patuline.

Sur les quinze gènes identifiés, seulement cinq ont fait depuis l'objet d'une caractérisation biochimique. Deux gènes ont été isolés et caractérisés de *Penicillium griseofulvum et* d'autres espèces productrices de patuline; il s'agit du gène *patK* codant pour la première enzyme de cette cascade enzymatique, l'acide 6-méthylsalicylique synthase (6-MSAS) (Beck et al. 1990; Wang et al. 1991) et le gène *patN* codant pour la septième enzyme, l'isoepoxydon déshydrogénase engagée dans la transformation de l'isoépoxydon en phyllostine (Dombrink-Kurtzman and Engberg 2006; Dombrink-Kurtzman 2007; Puel et al. 2007). Deux autres gènes (*patH* et *patI*) codant respectivement pour des cytochromes P450, responsables de l'hydroxylation du *m*-crésol en *m*-hydroxybenzyl alcool et du *m*-hydroxybenzyl alcool au gentisyl alcool, s'ajoutent à la liste des gènes identifiés et caractérisés chez *A. clavatus* (Artigot et al. 2009). Enfin, le gène *patG* codant pour la 6-MSA décarboxylase impliquée dans la deuxième étape de la voie de biosynthèse, a été caractérisé chez cette même espèce en utilisant le système d'expression hétérologue (Snini et al. 2014).

Ce cluster regroupe entre autres des gènes non caractérisés mais dont l'analyse BLAST a suggéré les enzymes pour lesquelles ils codent et parfois leur implication probable dans l'une ou l'autre des étapes de la biosynthèse (Puel et al. 2010). Parmi ces gènes, trois codent pour des transporteurs potentiels : un transporteur ABC (ATP Binding Cassette) (*patM*), un transporteur MFS (Major Facilitator Superfamily) (*patC*) et un transporteur d'acétate (*patA*), et d'autres codent éventuellement pour des enzymes : une carboxyle estérase (*patB*), une alcool déshydrogénase Zn-dépendante (*patD*), une GMC (Glucose-méthanol-choline) oxydoréductase (*patE*), une dioxygénase potentielle (*patJ*) et une isoamylalcool oxydase (*patO*). Finalement, ce cluster renferme un gène codant pour un facteur de transcription potentiel (*patL*) et un gène qui n'a aucune fonction évidente (*patF*).

A l'exception des deux gènes séquencés dans des études ultérieures (*patM* et *patN*), aucune donnée supplémentaire sur le cluster des gènes de la patuline chez *P. expansum* n'a été fournie dans la littérature.

C.6. Les facteurs régissant la production de patuline par *P. expansum*

La patuline présente sur les fruits semble être produite quasi exclusivement lors du stockage. Sa biosynthèse est déclenchée en présence de plusieurs facteurs physiques, chimiques et biologiques appropriés. Les facteurs régissant la production de patuline par *P. expansum* sont les même que ceux permettant la croissance de cette espèce mais présentent un spectre plus restreint. Ils peuvent être regroupés sous deux groupes majeurs ; le premier rassemble les **facteurs extrinsèques** tels que la température, la composition gazeuse, l'activité en eau du substrat (a_w), le pH, et les autres caractéristiques chimiques du substrat (McCallum et al. 2002). La tolérance envers ces facteurs dépend elle-même de l'espèce ou de la souche considérée qui est à la base de l´autre groupe de facteurs appelés **facteurs intrinsèques**.

La température représente un facteur limitant de toute première importance. La production de patuline par *P. expansum* est fréquemment testée dans la gamme de températures entre 0 et 25˚C. Salomao et al. (2009) ont rapporté une production de patuline par *P. expansum* plus élevée à 20.5 ˚C qu'à 11˚C. Conformément, McCallum et al. (2002) avaient signalé une production de patuline par *P. expansum* plus importante à 25˚C comparée à celle à 4˚C. En revanche, une stimulation de la production de patuline a été observée par Baert et al. (2007a) en diminuant la température de 20 à 10 ou 4 ˚C. Cependant, une nouvelle diminution de la température à 1˚C a engendré une réduction de la production de patuline. Dans le même contexte, Morales et al. (2008c) ont rapporté une accumulation de patuline entravée par des températures relativement basses (de l'ordre de 1 ˚C). Les données rassemblées de la littérature ne fournissent pas une réponse certaine quant à la température optimale de production de patuline par *P. expansum* mais révèlent qu'un stockage à froid n'est évidemment pas une bonne pratique pour inhiber cette production.

L'activité de l'eau (a_W) est une autre notion physico-chimique qui régule largement la production de patuline par *P. expansum*. Les données actuellement disponibles sont basées sur des anciennes études. Les données de Lindroth et al. (1978) ont montré qu'il y a une relation entre l'humidité relative d'un aliment et la capacité de ce champignon à produire de la patuline. Dans cette étude, une réduction de l'a_W dans les confitures analysées a été fortement corrélée avec une diminution de la production de patuline. De plus, une a_W supérieure à 0.95 a été nécessaire pour la production de patuline par *P. expansum*. Patterson et Damoglou (1986) avaient annoncé une a_W minimale similaire pour la production de patuline par ce champignon se développant sur milieu analogue au pain.

Quant à l'effet du pH sur la production de patuline par *P. expansum*, les résultats obtenus par Morales et al. (2008a) suggèrent une forte influence de ce facteur sur la production ainsi que la stabilité de cette mycotoxine. Dans un milieu à base de jus de pomme inoculé par une souche de *P. expansum*, la concentration de patuline la plus faible a été observée à un pH de 2,5 (4,1 µg/mL). Cette accumulation de patuline a augmenté de façon significative à un pH 3 (14,2 µg/mL) pour atteindre 44,9 µg/mL à un pH 3,5. Cependant, dans la gamme de pH 4- 5,5 ; les teneurs de patuline n'étaient pas significativement différentes. Damoglou et Campbell (1986) avaient observé de même une accumulation de patuline par *P. expansum* plus faible à pH entre 2,8 et 3,2 qu'à un pH entre 3,4 et 3,8.

La composition atmosphérique a également une influence déterminante sur la production de patuline. Le conditionnement sous atmosphère contrôlée de 3 % de CO_2 et 2 % d'O_2 s'est avéré comme inhibiteur de la production de patuline à une température de 25˚C, mais cette production a été restaurée sous une atmosphère modifiée de 2 % de CO_2 et 10 à 20 % d'O_2 (Paster et al. 1995). Similairement, aucune production de patuline n'a non plus été signalée dans les pommes stockées sous atmosphère contrôlée de 2.5 % O_2/3.95 % CO_2 ou de 1.5 % O_2/2.5 % CO_2 à une température de 1˚C. Cette production a été restaurée après un stockage ultérieur des pommes à 20 ˚C (Morales et al. 2007b).

La nature du substrat est un facteur déterminant dans l'accumulation de patuline par *P. expansum*. A l'image d'autres mycotoxines dérivées des polycétoacides, telles que les aflatoxines, la stérigmatocystine et l'ochratoxine A, les substrats riches en glucides sont les plus favorables à la production de patuline. Plusieurs études ont révélé que les cultivars et les variétés de fruits diffèrent dans leur sensibilité à la pourriture de *P. expansum* et par conséquent à l'accumulation de patuline. Une étude menée par Neri et al. (2010) témoigne de cette différence d'accumulation entre plusieurs fruits (hôtes habituels ou moins connus) infectés artificiellement par des spores de *P. expansum*. Les plus faibles teneurs en patuline ont été détectées dans les tissus infectés des fraises, des kiwis, des pommes de la variété ''Golden Delicious'' et de quelques variétés de poires. Cependant l'accumulation de patuline la plus importante a été observée dans les pommes ''Pink Lady'' et les pêches.

Toutes les souches de *P. expansum* n'ont pas le même pouvoir toxinogène, la variabilité génétique peut être la cause ultime des différences de production de patuline. A ce sujet, de nombreuses études ont rapporté des différences entre les isolats de *P. expansum* en termes de production de patuline (McCallum et al. 2002; Neri et al. 2010; Welke et al. 2011). L'incapacité de

production de la patuline a aussi été décrite chez certaines souches de *P. expansum*, indépendamment des conditions de culture (Paster et al. 1995).

C.7. Données toxicologiques relatives à la patuline

C.7.1. Toxicocinétique

C.7.1.1. Absorption, Distribution, Métabolisation et Excrétion

Une ancienne étude conduite par Dailey et al. (1977) élucide certaines caractéristiques d'absorption, de distribution et d'excrétion de la patuline radiomarquée au ^{14}C et administrée en dose unique par voie orale. Approximativement, 36 et 49 % de la dose de ^{14}C-patuline ont respectivement été excrétés au bout de sept jours via l'urine et les fèces. Seuls 1-2 % ont été récupérés sous forme de $^{14}CO_2$ alors que 2-3 % ont subsisté dans les tissus et le sang. Dans cette étude il a été observé que les globules rouges et les organes hématopoïétiques (la rate, les reins, les poumons et le foie) étaient les principaux sites de rétention de la patuline. Les travaux de Dailey et al. (1977) sont restés pendant longtemps les seuls à traiter ce sujet avant le travail de Rychlik et al. (2004).

Il est évident que l'estomac est le premier organe du corps qui entre en contact direct et prolongé avec la patuline après son ingestion. En outre, cet organe est connu pour sa capacité à absorber les composés toxiques ce qui pourrait provoquer des endommagements non seulement du tissu gastrique mais aussi affecter la fonction des organes éloignés après la distribution de la patuline via la circulation sanguine. Par conséquent, Rychlik et al. (2004), ont réalisé une étude *in situ* sur modèle d'estomac perfusé afin d'étudier l'absorption gastrique de la patuline chez le rat. La présente étude a montré une absorption d'environ 26 à 29 % de la patuline en 55 minutes, à partir de concentrations luminales respectives de 3,5 ou 350 mg/L. De cette quantité, 2 et 17 % avaient rejoint la circulation vasculaire alors que seulement 0,06 et 3 % ont été récupérés dans le tissu gastrique. La disparition de la majeure partie de la toxine est attribuée à sa réaction avec le glutathion intracellulaire ; cette hypothèse est soutenue par la forte déplétion de ce tripeptide suite à une exposition à la dose la plus élevée de patuline. Le glutathion a par ailleurs été décelé compétent à former des adduits avec la patuline (Fliege and Metzler 2000b).

Les premières expérimentations *in vivo* chez les humains ont révélé que suite à une consommation d'un jus de pomme ajusté à une teneur en patuline de 50 µg/L, moins de 2 % de la quantité consommée est retrouvé dans le sang du volontaire (Rychlik 2003). Des études

supplémentaires *in vitro* ont montré qu'après ajout de 100 µg de patuline à 9 mL de sang humain total, 6,1 % de la toxine uniquement sont détectés au bout de 2 minutes d'incubation. Par conséquent, il peut être conclu que la patuline non métabolisée n'exerce qu'une toxicité locale et ne peut pas provoquer des effets systémiques sur les autres parties de l'organisme (Rychlik 2005).

C.7.1.2. Mode d'action et effets biochimiques

La phase toxicocinétique de la patuline fait référence également à l'interaction de la toxine avec les protéines, son effet sur les enzymes et d'autres paramètres biochimiques.

Il est prouvé depuis bien longtemps que la patuline dispose d'une forte réactivité vis-à-vis des nucléophiles cellulaires, en particulier les groupements thiol -SH (groupement sulfhydriles), à savoir la cystéine, le glutathion, et le thioglycolate (Rinderknecht et al. 1947; Ciegler et al. 1976). Une étude de Hatey et Moulé (1979) qui dévoile une réduction de la synthèse protéique manifestée par une inhibition de l'incorporation des acides aminés dans les protéines, attibue cet effet à l'interaction de la patuline avec les groupes SH actifs au niveau de la membrane (transport d'acides aminés, équilibre ionique) ou au niveau cytoplasmique (enzymes et facteurs impliqués dans le processus de la traduction).

Cependant, malgré qu'une multitude d'études soient menées sur ce sujet, très peu de données concernant le volet chimique de cette réactivité sont disponibles. Fliege et Metzler ont été les premiers à élucider les structures chimiques des adduits de la patuline aux résidus aminés. Dans un premier temps, ils ont fourni la preuve que la patuline dispose d'un potentiel pour la réticulation des protéines et que non seulement les groupes thiol sont impliqués dans ces liaisons croisées (crosslinks) mais aussi les groupements aminés (Fliege and Metzler 1999). Ensuite, ces mêmes chercheurs ont identifié et élucidé les structures chimiques de 16 adduits de la patuline à diverses molécules nucléophiles dont le thiol monofonctionnel 4-bromothiophenol (BTP)(Fliege and Metzler 2000a). Ce travail a été complété par l'étude de la réaction non enzymatique de la patuline avec le glutathion et son produit de dégradation, la N-acétyl- L-cystéine dans les conditions *in vitro*. Les structures chimiques de dix adduits de la patuline au glutathion ont été élucidées au moyen d'une HPLC préparative, couplée à la spectrométrie de masse (MS) et par résonance magnétique nucléaire (RMN) (Fliege and Metzler 2000b). Quelques années plus tard, Pfeiffer et al. (2005) ont été les premiers à décrire l'activité biologique et toxicologique des adduits de la patuline au glutathion. A l'issue de cette étude, une activité restreinte de l'enzyme glutathion-S-transférase

et des enzymes du métabolisme des xénobiotiques a été signalée suite à l'incubation des cellules hépatiques primaires en présence de la patuline. Par la suite, Schebb et al. (2009) ont mis en évidence parmi ces adduits identifiés, les véritables inhibiteurs de la GST.

En outre, en raison de sa forte affinité pour les groupes sulfhydriles, la patuline a manifesté une action inhibitrice sur d'autres enzymes et paramètres biochimiques. L'activité *in vitro* de la Na^+-K^+ ATPase dans les microsomes de cerveaux de souris a été significativement inhibée par la patuline de manière concentration-dépendante (Phillips and Hayes 1978). C'est le cas aussi pour les deux enzymes glycolytiques, l'aldolase et l'hexokinase (Ashoor and Chu 1973; Devaraj et al. 1983), et les enzymes ayant des fonctions importantes à l'intérieur des cellules : la lactate déshydrogénase et l'alanine aminotransférase (Fuks-Holmberg 1980), dont les activités furent affectées par le traitement à la patuline.

C.7.2. Toxicodynamie

Le risque d´exposition à la patuline est un sujet qui se pose d'une manière sérieuse compte tenu du nombre considérable d'effets toxiques qui lui sont actuellement attribués. L'évaluation des risques pour la santé dus à la consommation de patuline par l'homme est basée sur un grand nombre d'études menées au cours de ces dernières années. Comme les autres mycotoxines, la patuline a montré une toxicité aiguë et une toxicité subaiguë très marquées, ainsi qu´une toxicité chronique se manifestant principalement par une génotoxicité, une cytotoxicité, une mutagénicité et une immunotoxicité (Puel et al. 2010).

C.7.2.1. Toxicité aiguë

La toxicité aiguë de la patuline a été investiguée par plusieurs chercheurs, sur différents groupes d'animaux. Chez le chien, l'exposition à la patuline a déclenché des conséquences drastiques avec une DL_{50} (dose létale 50 %) par voie intraveineuse de l'ordre de 10,4 mg/kg (Reddy et al. 1979). Des perfusions intraveineuses de 10 à 15 mg/kg, administrées à des chiens en doses uniques, ont provoqué quelques heures plus tard les réactions suivantes: hématémèse et diarrhée, perte d'appétit, faiblesse extrême et léthargie, tachypnée, écoulement nasal séro-sanguin excessif, température rectale inférieure à la normale et perte de poids. De plus, ces chiens sont apparus en état de choc qui précède la mort. En revanche, des doses de patuline inférieures ou égales à 7,5 mg/kg n'ont pas été létales. Dans la même étude, une autopsie des chiens

qui ont succombé suite au traitement à la patuline a montré des lésions pulmonaires, notamment des atélectasies, des emphysèmes et des œdèmes.

Une étude similaire a été entreprise chez les rongeurs (Hayes et al. 1979). Administrée en dose unique par voie intrapéritonéale, la patuline a montré une toxicité aigüe chez les souris et les rats avec des DL_{50} respectives de l'ordre de 7,60 mg/kg et 5,80 mg/kg de poids corporel. Comme dans l'étude précédente, les animaux qui sont décédés après une exposition aiguë à la patuline ont montré une atélectasie massive, une congestion limitée dans le septum alvéolaire et une hémorragie intra-alvéolaire. Sur ces mêmes espèces, McKinley et Carlton (1980) et McKinley et al. (1982) ont conduit une étude visant à évaluer la toxicité aiguë de la patuline administrée par les trois voies : orale, sous-cutanée et intrapéritonéale. Les signes cliniques observés quelques heures plus tard étaient comparables quelle que soit la voie d'administration et consistent en une salivation excessive, agitation, augmentation de la fréquence respiratoire qui évolue vers une dyspnée. L'anorexie, la cambrure du dos et le pelage rugueux étaient également des signes importants de toxicité. Les principales altérations macroscopiques et histopathologiques sont apparues dans le tractus gastro-intestinal, révélées par une hyperhémie et distension gastro-intestinale conjointement avec une entérite et une gastrite. Dans ces études menées chez les rongeurs, la patuline s'est avérée significativement moins toxique par administration orale, avec des DL_{50} plus élevées. Cela peut être attribué à divers facteurs, y compris une mauvaise absorption de la toxine ou son instabilité dans les conditions acides qui subsistent dans le tractus gastro-intestinal supérieur (Hayes et al. 1979).

Une intoxication aiguë caractérisée par une perte d'appétit, une perte de rumination, une augmentation du taux d'azote uréique du sang et un abaissement de la concentration des protéines plasmatiques , a été observée chez les ovins recevant des doses orales de patuline aussi élevées que 50 mg/kg de poids corporel (Tapia et al. 2006).

C.7.2.2. Toxicité subaiguë

Dans une étude de toxicité subaiguë, Speijers et al. (1988) ont étudié les effets de la patuline chez le rat, après administration par voie orale. Des solutions d'eau potable contenant des concentrations de 0, 25, 85, ou 295 mg/L de patuline dans 1 mM de tampon citrate ont été administrées à des groupes de rats Wistar (6 mâles et 6 femelles) pendant 4 semaines. Ces différentes expérimentations ont dévoilé des apports hydriques et alimentaires réduits dans tous les groupes traités à la patuline surtout celui recevant la dose la plus élevée. Ce dernier a montré

également une diminution significative du volume urinaire, une légère augmentation du taux de protéines urinaires, de bilirubine et du sang occulte dans les échantillons d'urine prélevés ainsi qu'une réduction de la clairance de la créatinine. A la fin de l'expérience, le poids corporel des rats traités avec la dose la plus élevée était bien inférieur à ceux du groupe témoin. Sur le plan histopathologique, des ulcères fundiques en association avec des nœuds lymphatiques pancréatico-duodénaux gonflés et actifs ont été révélés (Speijers et al. 1988). Les lésions gastro-intestinales peuvent être probablement attribuées à l'activité antibiotique de la patuline entraînant des changements dans la flore bactérienne de l'intestin (Becci et al. 1981).

Chez les primates, aucun signe de toxicité n'a été observé suite à des traitements quotidiens pendant quatre semaines avec des doses allant de 5 à 500 µg de patuline/kg de poids corporel. La seule activité inhabituelle, signalée chez les singes recevant une dose de 5 mg de patuline pour deux semaines supplémentaires s'exprime par un rejet des bananes séchées imprégnées avec la solution de patuline durant les trois derniers jours de l'expérimentation (Garza et al. 1977).

C.7.2.3. Toxicité chronique

Dans le cadre d'une étude de toxicité à long-terme, des doses bihebdomadaires de 0,2 mg de patuline dans l'huile d'arachide ont été administrées à des groupes de rats par injections sous-cutanées, sur une période de 61 à 64 semaines (Dickens and Jones 1962). Les rats traités ont développé des fibrosarcomes locaux au site de l'injection. Cependant, il est devenu évident aujourd'hui que de telles injections répétées de produits chimiques non cancérigènes conduisent à des fibrosarcomes locaux comparables à ceux observés avec la patuline. Par conséquent, l'étude de Dickens et Jones (1962) paraît insuffisante pour la déclaration de la cancérogénicité de la patuline.

Une étude plus récente et adaptée à la recherche des conséquences à long terme de la patuline a été réalisée par Osswald et al. (1976). Sur une période de 64 semaines et à raison de deux fois par semaine, une dose de 2,5 mg de patuline/kg de poids corporel a été administrée par intubation gastrique à 50 rats femelles. Ce traitement était sans effet sur le gain de poids des rats. De même, il n'y a pas eu de différences significatives entre le temps moyen de survie des groupes traités et contrôles. En revanche, dans le cadre d'une étude semblable menée par Becci et al. (1981), une dose trihebdomadaire de 1,5 mg /kg de poids corporel administrée par la même voie chez le rat, a provoqué une prise de poids significativement réduite surtout chez les rats mâles ainsi qu'une augmentation significative du taux de mortalité à la 109ème semaine de la période d'essai. La principale cause de mortalité semble être l'inflammation pulmonaire et laryngotrachéale.

C.7.3. Divers effets toxiques

C.7.3.1. Génotoxicité

En raison de sa forte réactivité vis-à-vis des nucléophiles cellulaires, la patuline a été suspectée être génotoxique. La patuline réagit rapidement avec les groupes sulfhydriles et d'une manière moins rapide avec les fonctions amines des protéines et du glutathion. Jusqu'à trois molécules de glutathion peuvent se lier à une molécule de patuline et les structures des principaux adduits sont rapportées dans la littérature (Schebb et al. 2009).

Des lignées V79 de cellules de hamster chinois ont été exposées à des concentrations de l'ordre du micromolaire de patuline (Schumacher et al. 2005). Une augmentation concentration-dépendante de la fréquence des mutations au locus hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HPRT) de ces cellules a été enregistrée après 24 heures d'incubation avec cette toxine. Une étude récemment menée par Glaser et Stopper (2012) sur ces mêmes lignées cellulaires, révèle désormais une formation dose-dépendante de micronoyaux qui résultent de lésions des chromosomes. Une évaluation plus poussée a montré également un nombre surprenant de ponts nucléo plasmiques générés peu après le traitement à la patuline (Glaser and Stopper 2012). L'aptitude de la patuline à induire des micronoyaux est en accord avec des publications précédentes. Zhou et al. (2009) avaient conduit une étude semblable mettant en évidence une augmentation significative du nombre de micronoyaux dans les cellules HepG2 d'une lignée d'hépatome humain suite à leur exposition à des concentrations croissantes de patuline.

Afin d'identifier les organes cibles de la génotoxicité de la patuline, l'induction de dommages à l'ADN a été examinée dans des organes distincts chez la souris (de Melo et al. 2012). Aucun dommage significatif à l'ADN n'a été signalé à des doses inférieures à 1 mg/kg de poids corporel, en revanche, une augmentation dose-dépendante de l'indice de dommages (DI : damage index) a été observée dans le cerveau, le foie et les reins de souris exposés à 2,5 et 3,75 mg/kg de patuline. Dans la même étude, aucune altération significative de l'ADN n'a été remarquée dans la vessie quelle que soit la dose testée (de Melo et al. 2012).

C.7.3.2. Cytotoxicité

Une lignée immortalisée des cellules de granulosa de rat a été utilisée pour étudier les différents aspects de la toxicité cellulaire engendrée par la patuline (Burghardt et al. 1992). Une réduction temps et dose-dépendante du taux de glutathion cellulaire, qui est le composant principal du système de détoxification de la cellule, a été observée suite à une et deux heures d'exposition à la

patuline. Une exposition à de faibles doses de patuline (0,1 ou 1 µM), a généré une dissipation du potentiel électrochimique à travers la membrane des mitochondries, tandis que les doses élevées de patuline (100 ou 1000 µM) ont provoqué une brusque altération de la compartimentation mitochondriale. La cytotoxicité de la patuline s'est illustrée également par une élévation du pH et de la concentration en calcium intracellulaires accompagnés d'une réduction concentration-dépendante des jonctions communicantes intercellulaires (jonctions gap) (Burghardt et al. 1992).

La toxicité intestinale de la patuline évoquée précédemment dans diverses expérimentations *in vivo*, a été évaluée *in vitro* sur deux lignées de cellules épithéliales intestinales humaines (Caco-2-14 et HT-29-D4) pour concevoir les mécanismes cellulaires associés à cette toxicité (Mahfoud et al. 2002). Des concentrations de patuline de l'ordre du micromolaire ont induit une diminution rapide et spectaculaire de la résistance transépithéliale (TER) dans les deux lignées cellulaires sans signe évident de cytotoxicité. Cet effet a été étroitement associé à la forte réactivité de la patuline vis-à-vis des groupements sulfhydriles évoquée précédemment. Dans le cadre de cette étude, un prétraitement avec le buthionine sulfoximine (BSO), un agent de la glutathion-abaissement a potentialisé la toxicité de la patuline, tandis que l'ajout de cystéine et de glutathion ont servi à empêcher l'attaque cellulaire par la patuline.

Dans une étude très récente de Donmez-Altuntas et al. (2013), la patuline s'est avérée être étroitement associée à une augmentation dose-dépendante de la fréquence des cellules apoptotiques et nécrotiques dans les lymphocytes humaines. Cette constatation est en accord avec les résultats de certaines études antérieures menées sur d'autres types de cellules ayant démontré des diminutions de la viabilité cellulaire. La patuline a entrainé une réduction de la viabilité des cellules leucémiques promyélocytaires HL-60 (à 1 et 2,5 µM), des cellules rénales embryonnaires humaines HEK 293 (à 5 et 7,5 µM) (Wu et al. 2008) et des cellules HepG2 (entre 5 et 100 µM) (Ayed-Boussema et al. 2011).

C.7.3.3. Reprotoxicité et tératogénicité

Ciegler et al. (1976) ont étudié l'effet tératogène de la patuline sur des œufs non incubés et des embryons de poulet âgés de 4 jours. Des anomalies des membres, principalement des rotations anormales de la cheville et des pieds écartés, ont été observées chez la majorité des embryons. De même, les données recueillies dans l'étude de Smith et al. (1993) témoignent que la patuline possède un effet délétère sur la croissance embryonnaire et la différenciation *in vitro* chez le rat. Tous les embryons exposés à la plus forte concentration de patuline (62 µM) sont morts avant la fin

de la période de culture. A des concentrations plus faibles, les anomalies résident en un retard de croissance, une hypoplasie du mésencéphale et du télencéphale et une hyperplasie des processus maxillaires et mandibulaires.

Afin d'évaluer les conséquences de la patuline sur le système de reproduction des rats mâles en croissance, deux études successives ont été entreprises par Selmanoğlu et Koçkaya (2004) et Selmanoğlu (2006). Ces auteurs ont d'abord signalé une augmentation du taux sanguin de testostérone (75 %) et d'hormone lutéinisante (LH) (146 %) des rats recevant la patuline par voie orale à raison de 0,1 mg/kg/jour pendant 90 jours. Des modifications histopathologiques des testicules (œdème, fibrose, hyperplasie des cellules de Leydig et désorganisation de l'épithélium des tubules séminifères), de la thyroïde (une infiltration des cellules lymphoïdes et un élargissement du tissu interstitiel interfolliculaire), de l'épididyme et du tissu de la prostate furent également enregistrées. Finalement, une diminution significative du nombre de spermatozoïdes ainsi que des anomalies morphologiques de ces derniers, ont été observées. Très récemment, Schneidgenová et al. (2014) ont démontré qu'une dose de 10 µg/kg de patuline administrée à des lapins par voie intramusculaire, diminue significativement la mobilité progressive des spermatozoïdes.

C.7.3.4. Immunotoxicité

Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* conduites sur des cellules du système immunitaire décrivent l'extrême toxicité de la patuline. *In vitro*, la patuline s'est révélée toxique pour les macrophages alvéolaires chez le rat, en induisant une augmentation du volume cellulaire moyen, une diminution de l'ATP cellulaire, ainsi qu'une inhibition de la synthèse des protéines et des ARN (Sorenson et al. 1985). Sur le même type cellulaire chez la souris, il a été démontré que la patuline exerce un effet inhibiteur sur les fonctions de ces cellules, marqué par une diminution de la phagocytose, de l'activité microbicide, de la production de radicaux oxygénés ($O^{2\cdot}$), de la fusion phagosome-lysosome et de la synthèse des enzymes lysosomiales (Bourdiol et al. 1990).

Parmi les études *in vivo*, une ancienne étude a été menée par Escoula et al. (1988) pour déceler les effets de la patuline administrée par voie orale et intrapéritonéale, sur le système immunitaire des souris et des lapins. Chez les deux espèces, une réduction significative du taux sérique d'immunoglobulines (IgG, IgA, et IgM) a été observée chez les groupes d'animaux traités par la patuline. Néanmoins, une autre expérimentation menée plus tard sur des souris (Llewellyn et al. 1998), ne confirme pas les résultats obtenus précédemment chez la même espèce, en montrant une

production d'IgM inaffectée par une dose de 0,08 à 2,56 mg/kg de patuline administrée pendant 28 jours par voie orale. En contrepartie, une augmentation de 24 et 30 % du nombre des monocytes et des cellules NK spléniques (dès 0,08 mg/kg) a été observée , accompagnée d'une élévation de 50 % du nombre des lymphocytes T cytotoxiques (à 2,56 mg/kg) et d'une diminution du nombre de leucocytes de 30 et 32 % dans les groupes recevant les doses de 1,28 et 2,56 mg/kg, respectivement.

Les cellules dendritiques interdigitées (IDC) du thymus ont fait l'objet d'une étude *in vivo* (Özsoy et al. 2008) sur des rats recevant quotidiennement la patuline par voie orale à une dose de 1 mg/kg de poids corporel. Cette étude reflète désormais un changement des caractéristiques ultra structurales de ces cellules ; révélé par un noyau irrégulier et centralement localisé, une apoptose massive ainsi qu'une augmentation du nombre des corps apoptotiques.

C.7.4. Valeurs toxicologiques de référence

À l'issue des investigations sur la cancérogénicité éventuelle de la patuline par le Centre international de Recherche sur le Cancer (International Agency for Research on Cancer 1985), cette mycotoxine a été classifiée dans le groupe C (agents inclassables quant à leur cancérogénicité pour l'homme).

Lors de la 35ème réunion du JECFA (Le comité mixte d'experts FAO/OMS sur les additifs alimentaires) en 1990, la patuline a été évaluée et une dose hebdomadaire tolérable provisoire (DHTP) fixée à 7 µg/kg de poids corporel par semaine a été proposée. Cette mycotoxine a été réévaluée lors de la 44ème réunion du JECFA en 1995. Cette nouvelle évaluation tient compte du fait que la majeure partie de patuline ingérée par les rats est éliminée dans les 48 heures et 98 % durant les 7 jours qui suivent. Le JECFA a donc établi une dose journalière maximale tolérable provisoire (DJMTP) en patuline de 0,4 µg/kg de poids corporel par jour (Welke et al. 2009). Cette DJMTP intègre un coefficient de sécurité fixé à 100.

C.8. Règlementations spécifiques à la patuline

Compte tenu d'une part de la difficulté à empêcher sa formation et d'autre part de ses effets délétères pour l'homme et en particulier les enfants, la patuline fait partie à présent d'une courte liste de mycotoxines pour lesquelles de nombreux pays ont édicté des textes réglementant leur présence et leur teneur maximale dans les denrées alimentaires. Les pays européens en étaient les

″Leaders ″. En 2003, l'Union européenne a proclamé des recommandations astreignantes (recommandations N° 1425/2003 et N° 1881/2006) en fixant une dose maximale acceptable de 50 µg de patuline/L (ppb) pour les jus de fruits concentrés et reconstitués , les nectars de fruits, les boissons spiritueuses , le cidre et les autres boissons fermentées à base de pommes ou contenant du jus de pomme , une dose maximale de 25 µg de patuline/Kg pour les produits solides à base de pomme et finalement une dose maximale de 10 µg de patuline/Kg pour les jus et les aliments destinés aux nourrissons et enfants de bas âge (European 2003; 2006). La FDA a fixé à son tour une concentration maximale tolérable de 50 µg de patuline/L dans les jus de fruits (U. S. Food Drug Administration [USFDA] 2004).

C.9. Les méthodes de détection et de quantification de la patuline et ses champignons producteurs dans les denrées alimentaires

C.9.1. Méthodes conventionnelles d´extraction de la patuline

Dans la littérature, plusieurs méthodologies ont été adaptées pour extraire et purifier la patuline avant son analyse à partir des denrées alimentaires comme les fruits, les jus de fruits, les purées ou autres. L'un des protocoles les plus couramment utilisés est basé sur une extraction liquide-liquide qui nécessite l´utilisation de l'acétate d'éthyle comme solvant d'extraction, suivi d´un lavage de la solution organique avec du carbonate de sodium pour éliminer les composés phénoliques interférents (MacDonald et al. 2000; Ritieni 2003). Sachant que la paroi cellulaire des fruits est un mélange complexe de cellulose, d´hémicellulose, de pectine et de protéines, les molécules ayant des tailles inférieures à 0,5 µm comme la patuline risquent d´être emprisonnées et retenues dans le filet de pectine (Funes and Resnik 2009). Dans certains cas, une procédure de dépectinisation a été nécessaire avant l´extraction de la toxine à partir des matrices alimentaires solides ou semi-solides pour détruire le filet de pectine et améliorer le taux de recouvrement de cette molécule (Boonzaaijer et al. 2005; Spadaro et al. 2007). Cette méthode d´extraction liquide-liquide présente certains inconvénients ; en effet les étapes d'évaporation requises ont une influence négative sur la reproductibilité de l'extraction. En outre, cette technique est très générale et si aucune étape supplémentaire de purification n'est incluse, un bruit de fond élevé risque facilement de fausser l'analyse (Boonzaaijer et al. 2005). Un autre inconvénient tient au fait que cette méthode comporte plusieurs étapes de séparation liquide-liquide qui nécessitent des quantités relativement importantes de solvants et de produits chimiques, ce qui est contre le

concept de « chimie verte » (Farhadi and Maleki 2011) qui vise à limiter au maximum l'utilisation de solvants.

L´extraction en phase solide (EPS) a été subséquemment introduite comme une technique polyvalente pour remplacer les étapes conventionnelles de séparation liquide-liquide. Les principes de cette technique sont basés sur la chromatographie. Les broyats de fruits sont dissous ou mis en suspension dans un liquide puis élués à travers une phase solide. Divers protocoles d'EPS ont été décrits dans la littérature. Pour l'analyse de la patuline dans les jus de pomme, deux systèmes d´extraction en phase solide ont été développés dans l'étude de Gökmen et Acar (1998), le premier faisant appel à une cartouche de polyvinylpolypyrrolidone-octadecyl (PVPP-C18) et l´autre utilisant une cartouche de copolymère à équilibre hydrophile-lipophile. Ces techniques nécessitent quelques millilitres de jus et l'élution est effectuée avec de l'éther diéthylique. Après évaporation du solvant, le résidu est resuspendu dans un mélange d'acétonitrile/eau acidifiée et analysé par chromatographie. Un autre travail qui décrit l'analyse de la patuline dans les produits à base de pomme destinés aux nourrissons inclut une étape de purification en phase solide sur cartouche de silice (Arranz et al. 2005). Durant cette même période, Boonzaaijer et al. (2005) ont décrit le développement d'une nouvelle méthode d'extraction de la patuline faisant appel à deux étapes de purification. La première étape est effectuée sur colonne C18, suivie d'une deuxième purification sur colonne de silice. La méthode développée a été validée et appliquée dans l'analyse de la patuline dans 60 produits à base de pomme présents sur le marché néerlandais. Très récemment, Zhou et al. (2012) ont surmonté le problème des cartouches d´extraction à prix élevé en adoptant une technique élémentaire faisant appel à une cartouche d'extraction en Polyvinylpolypyrrolidone-Florisil (PVPP-F) pour l'analyse de la patuline dans les produits à base de pomme et d'aubépine.

Ces méthodes d´extraction en phase solide sont caractérisées par leur simplicité et leur rapidité mais présentent certaines limitations en ce qui concerne l'effet de la matrice alimentaire et la compétition non souhaitée entre les analytes et les autres composants de la matrice.

C.9.2. Méthodes analytiques de dosage de la patuline

Afin de réduire la contamination en patuline, des méthodes analytiques appropriées à faible limite de détection sont nécessaires pour le contrôle de la qualité des produits tout au long de la chaîne de production. Différentes approches analytiques simples, sensibles et fiables pour l'analyse de la patuline dans les fruits et les produits dérivés existent dans la littérature. Les méthodologies pionnières utilisées se basaient sur la chromatographie sur couche mince (CCM). Cette méthode était la plus populaire étant donné qu´elle est peu onéreuse et facile à appliquer. Une méthode

AOAC officielle pour l'analyse de la patuline par CCM a été approuvée sur la base d'une étude réalisée par Scott (1974). Cette méthode consiste en une extraction avec de l'acétate d'éthyle suivie d'une purification sur une colonne chromatographique avec du gel de silice. Ce dernier s´est avéré le plus efficace pour la séparation de la patuline. La détection se faisait par pulvérisation avec le 3-méthyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH). Cette technique fût à nouveau utilisée dans le cadre d'autres études qui visaient à quantifier la patuline dans l'alimentation (Martins et al. 2002; Welke et al. 2009).

La chromatographie en phase gazeuse a également été utilisée pour l´analyse de la patuline. La littérature rapporte plusieurs analyses par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-SM) avec ionisation à impact électronique, en utilisant de la patuline silylée (Moukas et al. 2008). La patuline non dérivée a également été déterminée dans les jus de pomme par GC-MS en mode ionisation chimique négative (Roach et al. 2000). Quoique la méthode GC-MS soit très sensible, elle nécessite souvent une dérivatisation de la patuline avant son analyse.

Bien que les deux méthodes analytiques évoquées précédemment soient des méthodes utilisées en routine dans certains laboratoires pour la détermination de la patuline, les méthodes de séparation, de dosage et d'identification de la patuline ont fait des progrès spectaculaires grâce en particulier à l'utilisation quasi systématique de la Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP). La CLHP en phase inverse couplée à un détecteur UV, a été adoptée comme méthode officielle par l´AOAC (Association of Analytical Communities) et est devenue de loin la technique la plus adaptée et la plus fréquemment utilisée pour la détection et la quantification de la patuline dans les matrices alimentaires sachant que cette toxine est relativement polaire et absorbe fortement dans l'UV (vers 277 nm) (MacDonald et al. 2000; Murillo-Arbizu et al. 2009; Barreira et al. 2010). Néanmoins, certaines méthodes de CLHP rapportées précédemment étaient moins sensibles en raison de la présence de certains composés interférents tels que le 5-hydroxy-méthylfurfural (HMF), un produit généré lors de la pasteurisation du jus de pomme. Compte tenu de sa structure chimique, ce produit détient des propriétés chromatographiques similaires à celles de la patuline ; cela a souvent rendu difficile la détermination exacte de la quantité de patuline dans les jus de pomme. L'utilisation de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) a été décrite dans le cadre d'autres études et pallie à ce problème (Bandoh et al. 2009; Christensen et al. 2009).

Contrairement à d'autres mycotoxines, aucun kit ELISA commercialisé n´est disponible pour la patuline (Boonzaaijer et al. 2005). À ce jour, aucun anticorps polyclonal commercial dirigé contre la patuline n'a été décrit, cela est dû au faible poids moléculaire de cette molécule qui est reconnue

comme un antigène, mais pas immunogène donc incapable d'induire une réponse immunitaire comme c'est le cas pour toutes les autres toxines non protéiques. Un autre facteur a rendu difficile la production d'anticorps capables de reconnaître la patuline, c'est que cette dernière est une substance électrophile pouvant réagir à la fois avec les groupes sulfhydriles ainsi que les groupements amine primaire présents dans les peptides et les protéines.

C.9.3. Les applications de la PCR dans la détection et la quantification des champignons producteurs de patuline

Pour une bonne gestion du risque « mycotoxines », une détection précoce des champignons potentiellement producteurs est évidemment un outil de prévention de grande importance. La méthode de PCR (Polymerase Chain Reaction), faisant appel à des amorces ciblant les gènes impliqués dans la biosynthèse de ces mycotoxines reste le meilleur moyen pour détecter de façon précoce les souches à risques (Paterson 2006). Actuellement, l'utilisation de la PCR en temps-réel a permis de renforcer la spécificité de la détection, mais aussi d'avoir une approche quantitative.

Concernant la patuline, l'utilisation d'outils moléculaires dépistant la présence des champignons producteurs majeurs est restée longtemps limitée au seul gène *patN* (*idh*) impliqué dans la voie de biosynthèse de cette mycotoxine, compte tenu de la non disponibilité d'autres gènes candidats. Paterson et al. (2000) ont été les premiers à développer un système de PCR sur la base du gène de l'*idh* de la voie de biosynthèse de la patuline pour détecter les espèces productrices appartenant aux genres *Penicillium* dans des échantillons de l'environnement (brindilles, écorce, sol et pommes tombées de l'arbre). Dans cette étude, tous les isolats de *P. expansum* ont montré une capacité de production de patuline en présence de ce gène. Néanmoins, certains isolats de *P. brevicompactum* possédant le gène de l'*idh* ont manifesté une incapacité à produire de la patuline, reflétant ainsi une non-spécificité de cette méthode aux producteurs de patuline. Cependant, ce gène a d'ores et déjà fait l'objet de plusieurs études ultérieures. Dombrink-Kurtzman (2007) a conçu également des amorces de PCR pour amplifier ce gène en vue d'une détection spécifique des espèces productrices de patuline appartenant au genre *Penicillium.* Dans la même vision, Rodríguez et al. (2011) ont récemment rapporté l'utilisation du gène *idh* afin de mettre au point un premier test de PCR en temps réel pour la détection et la quantification collective des espèces productrices de patuline dans différentes matrices alimentaires.

Ci- dessous un schéma récapitulatif représentant les principales techniques utilisées pour la détection et la quantification de la patuline et ses champignons producteurs dans les denrées alimentaires (Figure 10).

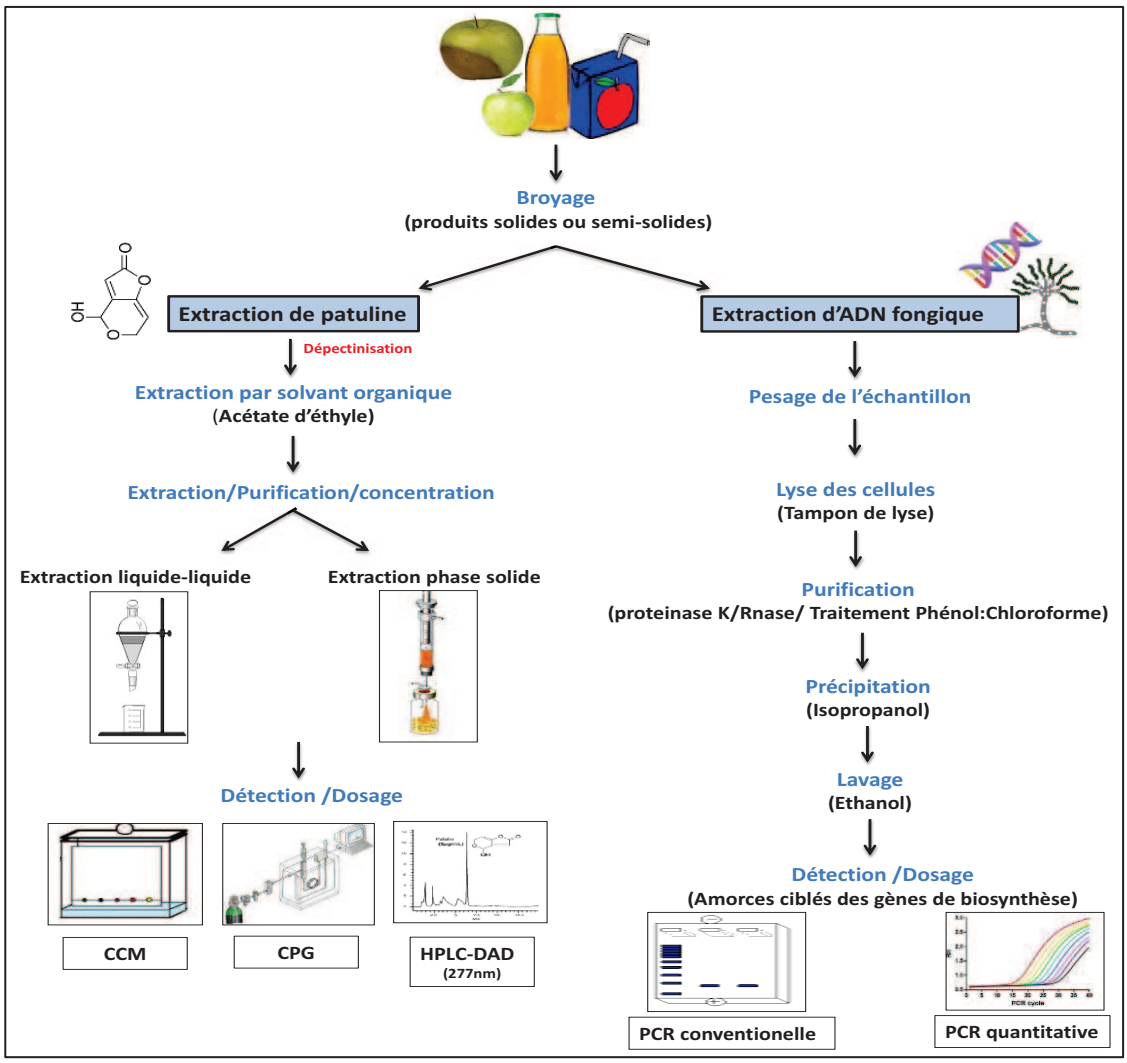


Figure 10 : Schéma illustratif des principales applications de dosage et de détection de la patuline et ses champignons producteurs dans les denrées alimentaire.

C.10. Incidence mondiale de la contamination par la patuline dans les produits à base de pomme

Au cours des dernières années, plusieurs séries d'enquêtes sur le niveau de contamination par la patuline des pommes et sous-produits ont été menées dans divers pays à travers le monde. Plusieurs pays européens se sont retrouvés concernés par ce fléau impactant la sécurité alimentaire. En Belgique, l'incidence globale de la patuline dans les jus de pomme belges était de 79%, contre 86 % pour les jus de pommes importés de la France, de l'Allemagne et de la Suisse, avec des moyennes de contamination de l'ordre de 10,3 µg/L et 6,4 µg/L respectivement (Tangni et al. 2003). Une enquête sur la présence de la patuline dans les jus de pomme purs et mélangés commercialisés en Italie a été menée au cours de l´année 2005. A l'issue de cette étude, la présence de la patuline a été observée dans 34,8 % des échantillons analysés. A l'exception d'un seul échantillon, tous les autres ont présenté une concentration inférieure au seuil maximal autorisé dans les jus de fruits conformément à la législation européenne et qui est fixé à 50 µg/L (Spadaro et al. 2007). Dans le même contexte, une enquête a été menée afin de déterminer les niveaux et l'apport en patuline par les jus de pommes consommés en Espagne. Dans 11 % des échantillons de jus, la contamination par la patuline a dépassé le niveau maximal autorisé (Murillo-Arbizu et al. 2009). Le Portugal s´est également intéressé à la contamination alimentaire par la patuline. Cette mycotoxine a été détectée dans 33 échantillons (23 %) de produits à base de pomme commercialisés au Portugal avec des valeurs allant de 1,2 µg/kg à 42 µg/kg (Barreira et al. 2010).

Outre les pays de l'Europe, d´autres pays à travers le monde ont partagé le même intérêt à vouloir dépister la présence de la patuline dans leurs produits à base de pomme. Le sujet de la patuline a suscité un intérêt marqué en Turquie, qui à son tour a recherché la présence éventuelle de cette mycotoxine dans les produits à base de pomme commercialisés sur ses marchés locaux. Un total de 215 échantillons de jus de pomme concentrés ont été analysés. La patuline a été détectée dans tous les échantillons analysés à des concentrations allant de 7 à 376 µg/L. Parmi ces échantillons, 43,5 % avaient dépassé les niveaux recommandés par l'UE (Gökmen and Acar 1998). Sur un échantillon de 42 jus de pomme fabriqués en Iran, 33 % avaient des niveaux de patuline supérieurs à 50 µg/L (Majid Cheraghali et al. 2005). L'occurence de la patuline dans les boissons à base de pommes commercialisées au Brésil a été également recherchée. La patuline a été détectée dans quatre échantillons (3 %) seulement à des concentrations comprises entre 3 et 7 µg/L (Iha and Sabino 2008). De même en Argentine, Funes et Resnik (2009) ont dépisté la présence de cette mycotoxine dans des sous-produits de pommes et de poires à consistance solide et semi-

solide. Dans cette enquête, 11 échantillons sur 51 sont ressortis positifs avec une moyenne de 61,7 µg/kg. En Chine, pays considéré comme le plus grand producteur et exportateur de jus de pommes concentrés dans le monde, la concentration en patuline a dépassé les 50 µg/kg tolérés dans 16 % des échantillons de jus analysés (Yuan et al. 2010). Dans une étude identique menée en Arabie Saoudite, la patuline a été détectée dans 3 des 51 échantillons de jus de pommes testés avec une concentration maximale en patuline de l'ordre de 152,5 µg/L (Al-Hazmi 2010). En 2011, un total de 85 échantillons de produits à base de pomme largement consommés par la population tunisienne, collectés des grands supermarchés et magasins situés en Tunisie, ont été analysés pour leur teneur en patuline. A l'issue de ces analyses, 18 % des échantillons de jus totaux (jus de pomme et jus mixtes) et 28 % des échantillons d'aliments pour bébés ont dépassé les limites tolérables recommandées par l'Union européenne, qui sont respectivement 50 µg/L et 10 µg/L (Zaied et al. 2013).



TRAVAIL EXPÉRIMENTAL

Outre l'introduction qui couvre une large panoplie d'informations générales relatives d'une part aux champignons microscopiques filamenteux et aux mycotoxines mais aussi à l'espèce *Penicillium expansum* et à la patuline, ce manuscrit rassemble cinq publications dont certaines sont publiées ou en passe de l'être, les autres le seront ultérieurement après la mise au format de la revue ciblée. Ces différentes publications sont organisées en quatre chapitres qui constituent la partie « **Travail expérimental** » :

Le **Chapitre 1** est axé sur l'évaluation de l'effet des facteurs physico-chimiques clés : la température, l'activité de l'eau (a_W) et le pH sur la croissance et la production de patuline par l'espèce *P. expansum.* De même, ce chapitre présente le développement d'un nouveau modèle mathématique permettant d'estimer les vitesses de croissance de *P. expansum* en réponse à ces 3 facteurs.

Le **Chapitre 2** expose la caractérisation du cluster de gènes codant pour la patuline chez l'espèce *P. expansum*. Ce chapitre se présente sous la forme d'un article publié dans la revue *International Journal of food Microbiology*. La méthodologie adoptée pour réussir cet objectif est clairement présenté dans la publication.

Dans un effort continu de lever un peu plus le voile sur la voie de biosynthèse de la patuline, nous aborderons dans le **Chapitre 3** de cette thèse la caractérisation de deux activités protéiques codées par deux gènes du cluster de la patuline chez *P. expansum.* Il s'agit des gènes *patL* et *patE* qui codent respectivement pour un facteur spécifique de transcription et une glucose-méthanol-choline oxydase catalysant la dernière étape de la voie de biosynthèse de la patuline.

Le travail expérimental s'achèvera par le **Chapitre 4** qui évoque une application directe des résultats du travail décrit dans le chapitre 2 et met en œuvre une méthode basée sur la PCR en temps réel et validée pour la détection de l'espèce *P. expansum* dans les pommes. Ce chapitre fait mention, pour la première fois d'une corrélation entre le taux de patuline et la quantité d'ADN de *P. expansum* dans les pommes.

Cette partie expérimentale est suivie par une partie intitulée « **Discussion générale et Perspectives**» qui rassemble et discute les principaux résultats obtenus durant cette thèse. Cette dernière partie du manuscrit fournit un bilan du travail effectué et expose un large panel de perspectives liées à la continuation de ce travail, aux nouvelles applications, ainsi qu'aux nouvelles pistes d'études afin d'approfondir les connaissances acquises.



CHAPITRE 1

Caractérisation des conditions physico-chimiques de croissance et de toxinogénèse de *Penicillium expansum*

La première partie du travail expérimental se penche sur l'étude et la modélisation, *in vitro*, de la croissance et la production de patuline par l'espèce *Penicillium expansum* en réponse à trois facteurs physico-chimiques clés : la température, l'activité de l'eau (a_W) et le pH. Le travail réalisé dans cette étude constitue une étape cruciale dans la démarche de la gestion du risque «patuline» dans la filière « pomme ». Tous les résultats obtenus sont présentés ci-dessous sous forme d'un article, qui est soumis dans *Food Microbiology.*

1.1. Résumé de l'étude

L'accès à des produits alimentaires sains est une exigence primordiale pour la santé publique. A cet égard, la réduction des risques est actuellement un élément crucial dans la gestion de la sécurité alimentaire, quoique l'élimination totale du risque demeure un objectif chimérique. La croissance fongique représente une sérieuse menace pour la salubrité des aliments. Ce phénomène survient en réponse à des conditions intrinsèques et extrinsèques favorables et génère une large gamme de métabolites secondaires toxiques, parmi lesquels les mycotoxines. Ces dernières années, la mycologie prévisionnelle basée sur l'élaboration de modèles mathématiques prédictifs, a émergé comme un outil efficace pour prévoir le développement des moisissures dans les produits alimentaires susceptibles d'être colonisés.

Comme il a été développé dans l'introduction de ce manuscrit de thèse, les conditions environnementales dont principalement la température, le pH et la disponibilité en eau (a_W), influencent fortement la capacité de croissance ainsi que la quantité de patuline produite par l'espèce *Penicillium expansum*. Cependant, à l'heure actuelle, toutes les études menées auprès de cette espèce se sont limitées à l'étude de l'effet de l'un ou l'autre des facteurs abiotiques sur son pouvoir de croissance indépendamment de sa capacité à produire de la patuline et réciproquement. Aucun travail visant à comparer les conditions ambiantes favorables à la croissance de *P. expansum* et à la production de patuline par cette espèce n'a à ce jour été mené. De même, aucun modèle mathématique n'a été conçu pour modéliser l'effet combiné de plusieurs facteurs abiotiques sur la croissance de *P. expansum.* Par conséquent, l'objectif principal de cette première partie de thèse était de développer un modèle mathématique capable de prédire la vitesse de croissance du champignon *P. expansum* en fonction de trois paramètres physico-chimiques clés: **la température de stockage** et la composition du substrat de culture (**activité de l'eau** et **pH**).

L'étude *in vitro* a été menée sur un milieu Czapek glucose Agar, favorable à la croissance et la production de patuline par cette espèce. La cinétique de développement de *P. expansum* et sa capacité de production de patuline ont été évaluées à cinq températures différentes (4; 8; 16; 25 et 30°C), quatre valeurs d'a_W du milieu (0,85; 0,90; 0,95 et 0,99) et trois valeurs de pH de milieu (2,5; 4 et 7). L'analyse statistique des résultats expérimentaux a montré que les trois facteurs testés ont une grande influence sur la croissance et la production de patuline par ce champignon. De même, il a été déduit que les valeurs de température, d'activité hydrique et de pH les plus favorables à la croissance de *P. expansum* ne correspondaient pas à celles observées comme étant les plus favorables à la production de la patuline.

Les données collectées dans les conditions expérimentales connues ont été implémentées dans un programme en langage C et un modèle mathématique permettant de prédire la vitesse de croissance de ce micro-organisme dans des conditions environnementales différentes dans la plage d'interpolation, a été élaboré. Les conditions optimales de croissance prédites par le modèle sont une température de 24°C, un pH de 5,1 et une valeur d'activité de l'eau de 0,99. Sous ces conditions, la vitesse de croissance optimale prédite correspond à 0,92 cm/jour.

Afin de s'assurer que ce modèle était applicable en situation réelle pour des denrées alimentaires, sa capacité prédictive a été évaluée sur des pommes de différentes variétés, présentant différentes valeurs de pH initial. Les pommes ont été blessées, inoculées par une suspension de spores (10^5 spores/µL) à raison de 10 µL par blessure et stockées à trois températures différentes pendant deux semaines. Cette expérimentation a servi dans un premier temps à vérifier que les écarts entre les vitesses de croissance prévues par le modèle et les vitesses réelles obtenues sur les pommes contaminées artificiellement ne sont pas excessifs. Un coefficient de corrélation de 0,96 a été calculé entre les valeurs observées et les valeurs prédites.

Pour conclure, cette étude apporte des connaissances supplémentaires et utiles sur les exigences écologiques de l'espèce *P. expansum*. La validation du modèle développé sur les pommes révèle que ces connaissances acquises dans des conditions expérimentales contrôlées peuvent être employées pour prédire et réduire la contamination des produits alimentaires dans les conditions naturelles.

1.2. Article: A study on the physicochemical parameters for *Penicillium expansum* growth and patulin production: Effect of temperature, pH and water activity ***(ARTICLE 1)***

(Voir manuscript qui suit)

A study on the physicochemical parameters for *Penicillium expansum* growth and patulin production: Effect of temperature, pH and water activity

Joanna Tannous [1,2,3], Ali Atoui [4,5*], André El Khoury [1], Ziad Francis [1], Isabelle P. Oswald [2,3], Olivier Puel [2,3], Roger Lteif [1]

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

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

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

[4] Laboratory of Microorganisms and Food Irradiation, Lebanese Atomic Energy Commission-CNRS, P.O. Box 11-8281, Riad El Solh, 1107 2260 Beirut, Lebanon

[5] Department of Biology, Faculty of Sciences, Lebanese University, Hadath Campus, Beirut, Lebanon

[*] **Contact information about Corresponding Author:**
Ali ATOUI
Lebanese Atomic Energy Commission-CNRS
P.O. Box 11–8281, Riad El Solh, 1107 2260 Beirut, LEBANON
Tel.: +961 1 450 811
Fax: +961 1 450 810
E-mail address: a.atoui@cnrs.edu.lb

ABSTRACT

Food poisoning caused by toxigenic fungi has become one of the major concerns for researchers and epidemiologists. The fungal growth and elaboration of mycotoxins are influenced by the interaction between several intrinsic factors related to substrate and other extrinsic environmental factors. Mathematical models in combination with laboratory experiments enable the characterization of fungus growth behaviour under appropriate conditions, in order to prevent food spoilage due to mould development and food-borne illnesses related to mycotoxin occurrence. *Penicillium expansum* is an ubiquitous fungus disseminated worldwide, that could threaten the fruit sector by secreting patulin, a toxic secondary metabolite. This work enables a clear differentiation between the favorable conditions to the *P. expansum* growth and those promising for patulin production. A mathematical model allowing the estimation of the *P. expansum* growth rate according to temperature, a_W and pH, was also developed. An optimal growth rate of 0.92 cm/day was predicted at 24°C with pH level of 5.1 and high a_W level of 0.99. The model's predictive capability was tested successfully on artificial contaminated apples. This model could be exploited by apple growers and the industrialists of fruit juices in order to predict the development of *P. expansum* during storage and apple processing.

Keywords: *Penicillium expansum*, growth rates, patulin production, temperature, pH, water activity, predictive mycology

1. INTRODUCTION

Filamentous fungi are broadly dispersed throughout the environment and are responsible for the spoilage of several food matrices. Mold growth has long been considered as a minor unsightly alteration merely affecting the organoleptic quality of food (Nguyen 2007). However, it has been proven thereafter that the danger lies in their ability to produce toxic secondary metabolites, mycotoxins, that unlike their producers cannot be destructed by cooking or food processing (Bullerman and Bianchini 2007). The most common and widespread mould spoilages are mainly triggered by three genera: *Aspergillus, Fusarium* and *Penicillium* (Sweeney and Dobson 1999; Binder et al. 2007). Within the latter genus, *Penicillium expansum* is one of the most studied species (Andersen et al. 2004). *P. expansum* is a wound parasite fungus that invades fruits via injuries, caused by unfavorable weather conditions before harvest (hail, strong wind) or by rough handling, harvesting and transport (Sanderson and Spotts 1995). This ubiquitous fungus commonly found on pome fruits causes a serious post-harvest disease known as blue mold rot and produces significant amounts of patulin, giving rise to substantial fruit losses and serious public health issues (Moake et al. 2005). Patulin is known to have potent cytotoxic, genotoxic as well as immunotoxic effects even at relatively low exposure levels (Puel et al. 2010). Therefore, the European Union has fixed a maximum tolerated level of 50 µg/kg for fruit juices and derived products and 25 µg/kg for solid apple products. The maximum level allowed for apple products intended for infants and young children was set at 10 µg/kg (European 2003; 2006).

The understanding of *P. expansum* physiology under controlled experimental conditions may help forecast its behavior in natural conditions and predict its potential risks on the fruit sector and consumer health. In the last decades, predictive microbiology has emerged to be a useful tool in food industry used to predict the behaviour of microorganisms through the development of several mathematical models capable of describing the responses of these pathogenic organisms to particular environmental conditions (Ross and McMeekin 1994; Fakruddin et al. 2011). Although it was more commonly used to control the bacterial growth (Gibson et al. 1988; Baranyi and Roberts 1994; Gaillard et al. 1998; Juneja et al. 2007), this tool was lately employed in the modelling of fungal growth as well. The fungal proliferation and mycotoxin synthesis in foodstuffs are subject to multiple physicochemical parameters. The water activity (a_W), and the temperature adopted during the storage period deemed as the most imperative ones (Holmquist et al. 1983; Dantigny et al. 2005; Bryden 2007). Likewise, other intrinsic factors, particularly the pH of the product, can largely affect the mold development (Rousk et al. 2009). The combination of these physicochemical

parameters along with the usage of modelling techniques might be helpful to control the fungal growth and subsequently the biosynthesis of mycotoxins. Several models have been described in literature in regard to fungal growth prediction. Valık et al. (1999) were among the first to use the predictive mycology through the development of a mathematical model to forecast the impact of the a_W on the colony growth of *Penicillium roqueforti*. Along the same line, a mathematical model predicting the effect of the pH, NaCl level, a_W and temperature on the colony growth rate of *Monascus ruber* was further developed (Panagou et al. 2003). Likewise, a predicitve model was used to describe the effect of interacting conditions of a_W and temperature on the growth of *Aspergillus niger* (Parra and Magan 2004). More recently, the combined effect of temperature and a_W on the growth of the ochratoxinogenic species *Aspergillus carbonarius* was surveyed using the predictive modelling approach (Tassou et al. 2007). The growth of two other mycotoxigenic species, *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus* was modelled as function of the temperature and a_W in the study of Garcia et al. (2011).

For *P. expansum* in particular, few studies have been conducted to characterize the growth and the toxigenesis conditions of this species despite its large implication in foodstuff contamination. The growth rate of *P. expansum* has been studied as function of the storage temperature, the a_W and the oxygen levels (Lahlali et al. 2005; Marín et al. 2006; Baert et al. 2007b; Judet-Correia et al. 2010). Moreover, its patulin production capacity has been independently assessed as a function of temperature, pH and fruit varieties (Morales et al. 2008; Salomao et al. 2009). All these studies lack sufficient information about the simultaneous effects of such parameters on the growth and the patulin production by *P. expansum*. In this regard, it is worth mentioning that the most suitable conditions for the fungal growth may not be the optimal conditions for mycotoxin production, thus it is not possible to predict the latter from the kinetic growth data. Moreover, the interactive effects of different sets of abiotic factors cannot be predicted by such types of studies.

With these perspectives, the present study was undertaken to firstly determine *in vitro* the individual effects of three major physicochemical parameters; the temperature, pH and a_W on both the growth and patulin production by the blue-rot ascomycetous fungus, *P. expansum*. These data were subsequently invested in the development of a mathematical model which enables accurate prediction of optimal and marginal conditions for *P. expansum* growth.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Fungal isolate

This study was carried out on one isolate of *P. expansum*, initially isolated from grapes in the Languedoc Roussillon region of France. The isolate was previously characterized by DNA sequencing of the ITS gene region and deposited in ARS collection (USDA, Peoria, Il, USA) as NRRL 35695. The isolate was formerly confirmed as a patulin-producer (Tannous et al. 2014).

2.2. Experimental setup

2.2.1. Inoculum preparation

The investigated strain was sub-cultured on Potato Dextrose Agar (PDA) medium (Biolife, Milano, Italy) and incubated at 25°C to obtain a heavily sporulating culture. The conidial suspension was prepared by washing the surface of the fresh, mature (7-day-old colony) culture with 10 mL of sterile distilled water ramended with Tween 80 (0.05%, v:v) and by gently rubbing with a sterile loop. The spores' concentration was reckoned by microscopy using a Neubauer counting chamber, and then adjusted to 10^6 spores/µL.

2.2.2. Growth media and incubation conditions

Agar media were used to minimize other sources of variation and to identify clearly the effects of temperature pH and a_W. Since *P. expansum* is found to be a frequent fungus in fruits, it was considered that the ideal assessment of the physicochemical parameters shall be done under conditions close to the natural stat, thus all the assays were realized on Czapek Glucose agar medium providing large amounts of carbohydrates (glucose and sucrose) that remind the rich sugar composition of a fruit. This medium has already been proven to be a favorable substrate for *P. expansum* growth and patulin production (Data not shown). The overall assayed conditions were five temperatures, three pH levels, and four a_W values. Six separate replicate Petri plates were used for each temperature, a_W and pH value, three of which were overlaid with sterilized cellophane discs in order to measure the mycelial mass and estimate the amount of patulin produced on agar medium at the end of the experiment.

In all the experimental conditions, media were centrally inoculated with 10^6 spores from the spore suspension. For temperature investigations, the standard Czapek glucose medium was prepared based on the formulation reported by Puel et al. (2005) (20 g bacteriological agar (Sigma-

Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) mixed with 35 g Czapek-dox (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), 8 g glucose (Riedel-de Haën, Seelze, Germany), 2 g yeast extract (Biolife, Milano, Italy) and 1 L of demineralized water). The inoculated Petri plates were incubated at 30, 25, 16, 8 and 4°C in high precision (± 0.1°C) for 2 weeks.

The Czapek glucose agar medium was also used at 25 °C for assessing the effect of a_W on the growth and patulin production by *P. expansum.* The unmodified medium (a_W 0.99) was adjusted to a_W levels of 0.95, 0.90, and 0.85 by adding increasing amounts of glycerol. Water activities were subsequently determined with the HygroLab 2 water activity indicator (Rotronic, Hauppauge, NY, USA). Petri plates of the same water activity value were separately enclosed in polyethylene bags to prevent water loss. The fungal growth was not affected significantly by the use of bags that decrease the oxygen availability.

The pH surveys were also realised on Czapek glucose agar incubated at a constant temperature of 25 °C for only 7 days. The pH of the medium was adjusted to 2.5, 4 and 7 using two buffer solutions (Citric acid (0.5M): Potassium Hydrogen Phosphate (0.5M)) in the respective combinations 49 mL: 2mL, 30.725 mL: 38.55 mL and 8.825 mL: 82.35 mL, for a total volume of 250 mL of water. These pH values were chosen as they cover the pH range found in different eating-apple and cider apple varieties. The final pH of the medium was verified using a pH-meter with special probe for alimentary articles by Hanna instruments (Tanneries, France).

2.3. Growth and lag phase assessment

After inoculation, agar plates were checked on a daily basis to perceive if visible growth had started. As soon as a visible growth has begun, *P. expansum* growth was monitored by diameter measurements along two perpendicular directions, at regular time intervals. The lag phase (time required for growth) was evaluated and the radial growth rate (cm/day) was obtained from linear regression slopes of the temporal growth curves. Measurements were carried for an overall period of fourteen days for the temperature and a_W surveys and seven days only for the pH surveys.

Fungal growth was also evaluated with regard to biomass (mg dry weight). After the appropriate incubation period, the mycelia developed on the surface of agar plates topped with cellophane discs were scratched with a scalpel, collected and dried at 80°C until a constant weight, corresponding to the dry biomass weight, was obtained.

2.4. Patulin extraction and HPLC analysis

After the appropriate incubation period, the agar medium was scraped off the Petri dishes overlaid with sterile cellophane, cut into strips, and macerated for 2 days in 50 mL of ethyl acetate (Sigma-Aldrich). The organic phase was then filtered through Whatman Grade 413 filter paper (Merck) and evaporated to dryness under liquid nitrogen. The dried residue was dissolved in 2 mL of methanol and then filtered through a 0.45 µm syringe filter (Navigator, Huayuan Tianjin, China) into a clean 2 mL vial. One hundred microliter aliquots of these extracts were injected onto the Waters Alliance HPLC system (Saint-Quentin-en-Yvelines, France) for the quantitative determination of the patulin concentration. The patulin was detected with a Waters 2998 Photodiode Array Detector, using a 25 cm × 4.6 mm Supelco 5 µm Discovery C18 HPLC Column (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) at a flow rate of 1 mL/min. A gradient program was used with water (Eluent A) and acetonitrile HPLC grade (eluent B) and the following elution conditions: 0 min 5 % B, 16 min 2 % B, 20 min 60 % B, 32 min 5 % B . The presence of patulin was monitored at a 277 nm wavelength. A calibration curve was constructed with patulin standard (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) at concentrations ranging from 0.05 to 10 µg/mL. Accordingly, the patulin concentrations were determined and results were expressed in ppm. The HPLC method was validated in terms of limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ). The LOD and LOQ of the method were calculated using the slope (S) of the calibration curve, obtained from linearity assessment, and the standard deviation of the response (SD). These values were determined as follows: LOD = 3.3 × SD/S, LOQ = 10 × SD/S.

2.5. Model development

Growth rate experimental data were implemented in a home developed C++ language program that is able to interpolate between various points in different or multiple dimensions. The program allows us to estimate the growth rates for fixed temperature, a_W and pH values depending on the variations defined by the input data.

The data included the growth rate (expressed in cm/day) dependencies on temperature, water activity (a_w), and pH of the medium. The model took into account the latency phase versus the temperature, which was modeled by a 4th degree polynomial equation:

$$\boldsymbol{Latency}(\boldsymbol{days}) = 5.10^{-5}\boldsymbol{T}^4 - 0.0039\boldsymbol{T}^3 + 0.1126\boldsymbol{T}^2 - 1.8349\boldsymbol{T} + 11.613 \quad \textbf{(1)}$$

Where T is the temperature parameter expressed in Degree Celsius (°C).

Likewise, the latency versus the water activity was taken into account to fit the following power equation:

$$\boldsymbol{Latency}(\boldsymbol{days}) = 0.9046\boldsymbol{a_w}^{-12.98} \quad \textbf{(2)}$$

Where a_w represents the water activity of the medium.

In the both latency phase fits, the correlation parameter R^2 was higher than 0.97 showing a good accuracy of the fitting procedure.

The *P. expansum* diameter growth (cm) dependencies on temperature, a_W and pH variations was assumed to be a linear relationship. Therefore, a Pearson chi-squared test was performed confirming that our hypothesis is true for over 99.9 %. Thus, the slope and the intercept dependencies on each of the previously mentioned parameters were calculated according to the available experimental points.

Growth slope and intercept dependencies on temperature were fit into the following 4th degree polynomial equations:

$$\boldsymbol{Slope}(\boldsymbol{cm}/\boldsymbol{day}) = -3.10^{-5}\boldsymbol{T}^4 + 0.0015\boldsymbol{T}^3 - 0.0291\boldsymbol{T}^2 + 0.2402\boldsymbol{T} - 0.368 \quad \textbf{(3)}$$

$$\boldsymbol{Intercept}(\boldsymbol{cm}) = 10^{-5}\boldsymbol{T}^4 - 0.0006\boldsymbol{T}^3 + 0.006\boldsymbol{T}^2 + 0.0536\boldsymbol{T} - 0.8269 \quad \textbf{(4)}$$

The growth slope and intercept dependencies on a_W were fit into the following equations:

$$\boldsymbol{Slope}(\boldsymbol{cm}/\boldsymbol{day}) = 5.2634\boldsymbol{a_w} - 4.46936 \quad \textbf{(5)}$$

$$\boldsymbol{Intercept}(\boldsymbol{cm}) = 3.94927.10^2\boldsymbol{a_w}^3 - 1.014943.10^3\boldsymbol{a_w}^2 + 8.61994.10^2\boldsymbol{a_w} - 2.41545.10^2 \quad \textbf{(6)}$$

And the growth slope dependency on pH was fit into the following equation, considering the value for intercept as null:

$$\boldsymbol{Slope}(\boldsymbol{cm}/\boldsymbol{day}) = 0.0578\boldsymbol{pH}^2 + 0.584\boldsymbol{pH} - 0.5947 \quad \textbf{(7)}$$

All slope and intercept fits were convergent to more than 99 % with the experimental points.

Finally, a routine test of the different values combinations of pH, T and a_W was carried out in order to retrieve the highest growth rate and its relative optimal parameters to obtain such a result.

2.6. Validation of the predictive model *in vivo*

In order to assess the validity of the predictive model in natural conditions, three apple varieties (Golden Delicious, Granny Smith and Royal Gala) with different initial pH values (Table 1) were used. As previously described by Sanzani et al. (2012), apples were surface-sterilized using a 2 % sodium hypochlorite solution and rinsed with water. Apples were then injured using a sterile toothpick to a depth of approximately 0.5 cm, and the wounded sites were inoculated with a 10 µL droplet of the *P. expansum* conidial suspension at a concentration of 10^5 conidia/µL. The infected apples were then incubated for 2 weeks under three different temperatures (4˚C, 25˚C and 30˚C). The set of experimental conditions used to check the predictive capability of the model are given in Table 1. Duplicate analyses were performed on each set of conditions.

The diameters of the rotten spots were measured daily and the experimental growth rates were estimated. To evaluate the performances of the developed model, the observed and predicted values were compared by plotting predicted growth rates against the experimental values.

Table 1 : Validation set of conditions of the predictive model for *P. expansum* growth and patulin production

Apple Variety	Temperature (˚C)	Water activity	pH
Golden Delicious	4	0.98	3.5-3.6
	25	0.98	3.5-3.6
	30	0.98	3.5-3.6
Granny Smith	4	0.98	3.1-3.2
	25	0.98	3.1-3.2
	30	0.98	3.1-3.2
Royal Gala	4	0.99	4.1-4.2
	25	0.99	4.1-4.2
	30	0.99	4.1-4.2

2.7. Statistical analysis

All values are stated as mean ± SEM unless otherwise indicated. For statistical analysis, the one-way analysis of variance (ANOVA) was used (*$p<0.05$; **$p<0.01$; ***$p<0.001$).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Studies on the growth and patulin production by *P. expansum* under different conditions

Colony diameters were measured on a daily basis and plotted against time. For all the tested conditions, the growth curves based on colony diameters were typical of a linear fungal growth after a short lag period ranged from 1 to 7 days. Under each culture condition, the patulin content was quantified by HPLC and expressed in ppm.

3.1.1. Temperature effect

Since in many cases, apples and other fruits are stored in refrigerators (at 4˚C) or in plastic barrels outdoors where temperatures of 25-30˚C are very common, the temperature analysis were performed within a 4 to 30 °C range. The investigated strain of *P. expansum* was able to grow in the temperature range studied at unmodified a_W and pH (Figure 1A). Interestingly, the type isolate displayed a different colonial morphology under the five tested temperatures. At 8˚C and 16˚C, green colony with white margins and yellow to cream reverse side was observed, while at 25˚C, the fungus showed green conidia with dull-brown colour on reverse. An unusual morphology of the fungus was perceived at 30˚C; the colonies grew vertically and stayed smaller than 3 cm, with serrated edges (Figure 2).

The optimal temperature for the growth of this strain of *P. expansum* was around 25°C, at which the fungus exhibited the shortest lag phase and the most important colony growth (8.9 cm), at the end of the incubation period (Figure 1A). This observation is in accordance with the literature data that describes also an optimum growth temperature for this species near 25°C (Pitt et al. 1991; Lahlali et al. 2005; Baert et al. 2007b; Pitt and Hocking 2009). Lag phases prior to growth increased when temperature varied from optimum to marginal conditions; a lag phase of 6 and 3 days was noticed at the lowest temperatures of 4˚C and 8˚C, respectively, besides a 2 day-latency period perceived at the highest studied temperature (30˚C) (Figure 1A). This result supports the prediction of Baert et al. (2007b) that cold storage does not prevent the fruit deterioration by *P. expansum*, but just delays it.

The colony growth rates were calculated as the slope of the linear segment of each growth curve. The growth rate of *P. expansum* as a function of temperature appears to have a bell shaped distribution with an optimum at 25 ˚C and an experimentally determined value of 0.67 cm per day (Figure 1B). The growth features of *P. expansum* were also evaluated in terms of fungal biomass

development. The highest mycelia dry weight of 160 ± 15 mg per 20 mL of czapek glucose medium was obtained at 25˚C, followed by 16˚C (130 ± 0 mg), 30˚C (120 ± 10 mg) and 8˚C (60 ± 10 mg). The lowest mycelia dry weight of 10 ± 0 mg was perceived at 4˚C.

Patulin was identified by its retention time (9 min) and its UV spectra according to an authentical standard and quantified by measuring peak area according to the constructed standard curve of 0.919 % coefficient of variation. The values of limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for patulin were 0.04 µg/mL and 0.1 µg/mL, respectively. The patulin production by *P. expansum* exhibited also a marked temperature-dependent variability. The histogram of patulin production versus temperature seen in Figure 1C has a characteristic bell shape. The highest patulin concentrations were attained at 16˚C. However, a further increase of temperature to 25˚C and 30˚C caused a decrease in patulin production. These data matched a previous study of Paster et al. (1995) that compared patulin production on apples kept at various storage temperatures of 0, 3, 6, 17 and 25˚C. In this study, the highest patulin concentration was found at 17˚C. Our results are also in perfect agreement with those of Baert et al. (2007a) that shows a higher patulin production at low temperatures. However, they contradict many other studies that have reported a stimulation of the patulin production by this fungus by increasing the temperature (McCallum et al. 2002; Salomao et al. 2009). These results proved that temperature plays a role in patulin accumulation but not in a determinant way, other extrinsic and intrinsic factors appear to interact.

A comparison of the obtained bell-shaped dependencies of the *P. expansum* growth rates and patulin levels as a function of temperature (Figure 1B-C) revealed that the temperature ranges required to produce patulin were different and more restrictive than those for growth. Similar results have been reported for other fungal species. The *Fusarium* molds associated with the production of trichothecene (T-2 and HT-2 toxins) have been reported to grow prolifically at temperatures ranging between 25 and 30° C with a low production of mycotoxins. However, high levels of mycotoxins were produced at low temperatures (10 to 15° C), associated with a reduced fungal growth (Nazari et al. 2014). Similarly, the optimal temperature for Fumonisin B1 production was lower than the optimal temperature for the growth of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* (Marin et al. 1999). Another example of a narrower range of temperatures for toxin production when compared to fungal growth is shown by the accumulation of ochratoxin in barley by *Penicillium verrucosum*. The growth of this species was conceivable at temperatures

fluctuating between 0 to 31˚C, while the ochratoxin A production was only detected in the temperature range 12-24˚C (Northolt et al. 1979).

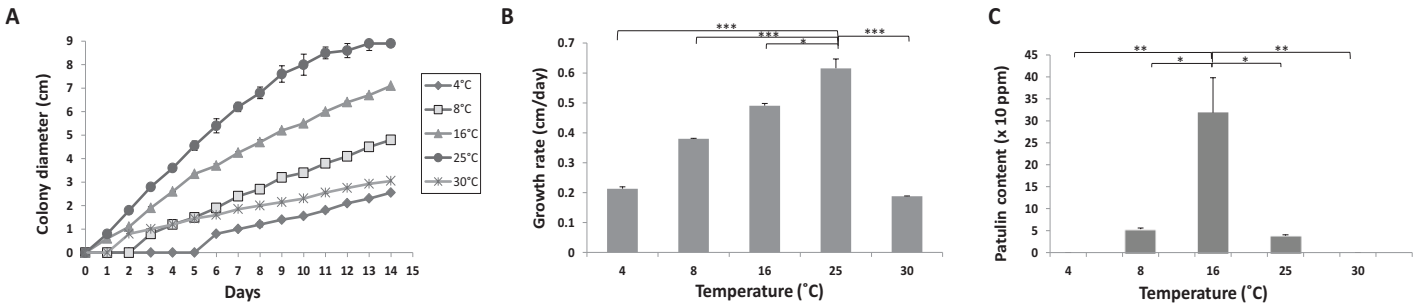


Figure 1 : Growth curves (A), radial growth rates (cm/day) (B) and patulin production (ppm) of *Penicillium expansum* NRRL 35695 on Czapek glucose agar medium under different temperatures.
Five different temperatures were tested (4, 8, 16, 25 and 30 ˚C). The results shown are the mean of three technical replicates for each condition.
The standard errors of the mean (SEM) are represented by error bars: * = P < 0.05; ** = P < 0.01; *** = P < 0.001.

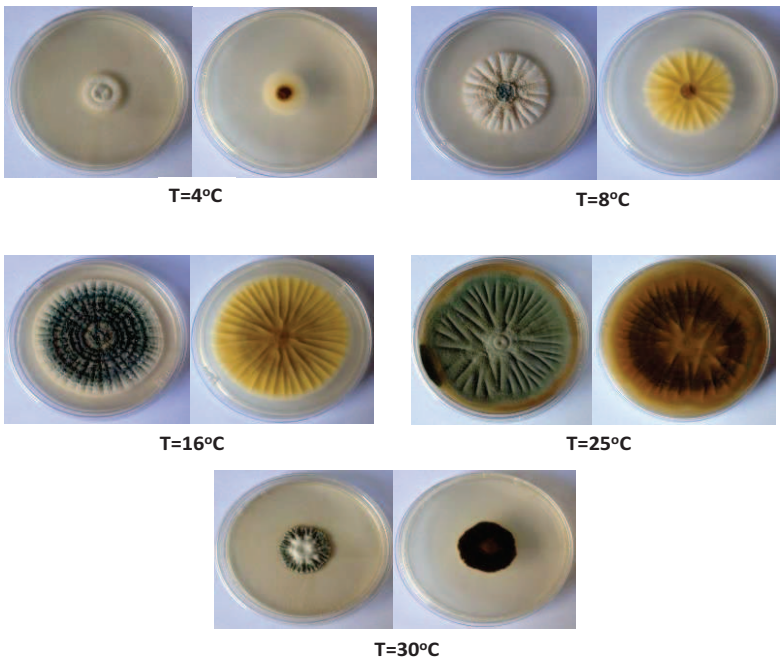


Figure 2 : The colony appearance (surface and reverse) of *P. expansum* isolate NRRL 35695 after fourteen days of growth on Czapek glucose agar media under a wide range of temperatures

3.1.2. Effect of water activity

The Figure 3A shows the mean diameters of *P. expansum*, measured at different controlled a_W, along culturing time. This species displayed an optimum growth at the highest a_W of 0.99, with the shortest lag phase and the most important colony growth (8.3 cm) after incubation period. For this highest value of a_W, the fungus recorded the highest growth rate (0.6 cm per day). A drastic decrease of the *P. expansum* growth rate was observed by lowering the a_W from 0.99 to 0.85, using glycerol as humectant (Figure 3B). The *P. expansum* isolate displays a different mycelial mass production in the czapek glucose medium with modified water activity. After 14 days, the highest production of fungal dry mass was obtained at the a_W of 0.95 (400 ± 50 mg dry weight per 20 mL of medium), followed by 0.99 (201 ± 10 mg) and 0.90 (105 ± 15 mg). A weak mycelium growth (1.1 ± 0 mg fungal dry weight) was reported at the minimal a_W tested. In literature, the minimal water activity for the germination of this species ranges between 0.83 (Mislivec and Tuite 1970) and 0.85 (Judet-Correia et al. 2010), depending on the strain. As it can be observed, the mycelial dry weight estimated at the 0.95 a_W is approximately twice the value found at 0.99 a_W. However, the fresh mycelial weight was significantly greater at the highest a_W value (data not shown).

The patulin production was also significantly affected by the water availability in the medium. No patulin was produced at an a_W of 0.85 throughout the incubation period. On the other hand, traces of patulin were detected after 14 days of culture, when the fungus was grown at the two a_W values of 0.90 and 0.95. A significant increase in the patulin production by *P. expansum* was perceived at the a_W of 0.99 (Figure 3C). These findings on the impact of water activity on the patulin production by *P. expansum* are consistent with the two ancient studies reporting that the minimal water activity that allows patulin production by this fungus is of 0.95 (Lindroth et al. 1978; Patterson and Damoglou 1986).

As previously outlined for the temperature analysis, the water activity conditions that promote patulin production were also more restrictive than those allowing growth. Although there were no significant differences in terms of *P. expansum* growth at both water activities 0.95 and 0.99, the patulin production was significantly stimulated at 0.99, while only traces of patulin were detected at 0.95 (Figure 3B-C).

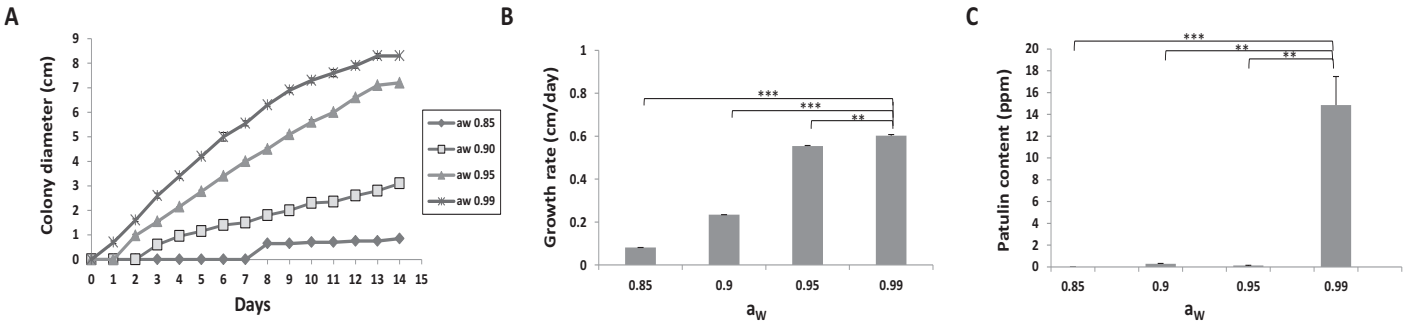


Figure 3 : Growth curves (A), radial growth rates (cm/day) (B) and patulin production (ppm) of *Penicillium expansum* NRRL 35695 on Czapek glucose agar medium under modified water activity.
Four different water activities were tested (0.85, 0.90, 0.95 and 0.99). The results shown are the mean of three technical replicates for each condition.
The standard errors of the mean (SEM) are represented by error bars: * = P < 0.05; ** = P < 0.01; *** = P < 0.001.

3.1.3. Effect of pH

As several previous studies have reported a decrease of the pH of the medium during *P. expansum* growth, the pH assays were conducted on an overall incubation period of seven days, in order to reduce pH fluctuations. This pH decrease is due to organic acids (gluconic acid) production, that lower the pH to values in which patulin is more stable (McCallum et al. 2002; Morales et al. 2008; Barad et al. 2014). In our study, the pH of the medium was recorded at the end of the experiment. The initial pH 7 slightly decreased to 6 along seven days experiment; however the two pH 2.5 and 4 were maintained constant at the initial value throughout the incubation period. The ability to change the ambient pH in order to generate a more suitable growing environment has been described for other fungal species and was shown to occur in either direction. Some necrotrophic species like *Alternaria alternata* (Eshel et al. 2002) or *Colletotrichum gloeosporioides* (Kramer-Haimovich et al. 2006) can alkalize the host tissue by secreting ammonium while other species can acidify the medium by secreting organic acids, like oxalic acid in the case of *Botrytis cinerea* (Manteau et al. 2003).

Under the different pH tested in our study, the lag phase periods were estimated to one day of culture from the linear regression curves for colony radius plotted versus time (Figure 4A). It was also found that the growth rate of *P. expansum* as a function of pH is bell-shaped with a maximum estimated value of 0.9 cm per day at pH 4 (Figure 4B). Regarding, the mycelium dry weights, there were no significant differences between the three tested pH levels. Similarly, Morales

et al. (2008) found that *P. expansum* growth, measured as fungal was unaffected by the fruit juice initial pH.

Although the *P. expansum* growth was not significantly influenced by the pH of the medium, the latter showed a significant effect on the ability of this fungus to produce patulin. The lowest patulin production was reported at pH 2.5, while the highest patulin level was detected at pH 4. The patulin-producing capacity of *P. expansum* decreased when the pH of the medium increased from 4 to 7 (Figure 4C). These results are comparable with those presented in previous studies. Damoglou and Campbell (1986) have previously reported that the pH range 2.8-3.2 resulted in less patulin accumulation by *P. expansum* compared to the pH range 3.4-3.8. While assessing the patulin accumulation in both apple and pear juices at different pH, Morales et al. (2008) have also observed an increase in patulin production by raising the pH from 2.5 to 3.5. The small amounts of patulin found at pH 2.5 are most probably due to a low production rather than to low stability of patulin. In the study of Drusch et al. (2007), the patulin stability was assessed over a wide pH range. Data from this study indicate that patulin is highly stable in the range of pH 2.5–5.5. However, a greater decrease in the patulin concentration to 36% of the initial concentration was observed at neutral pH.

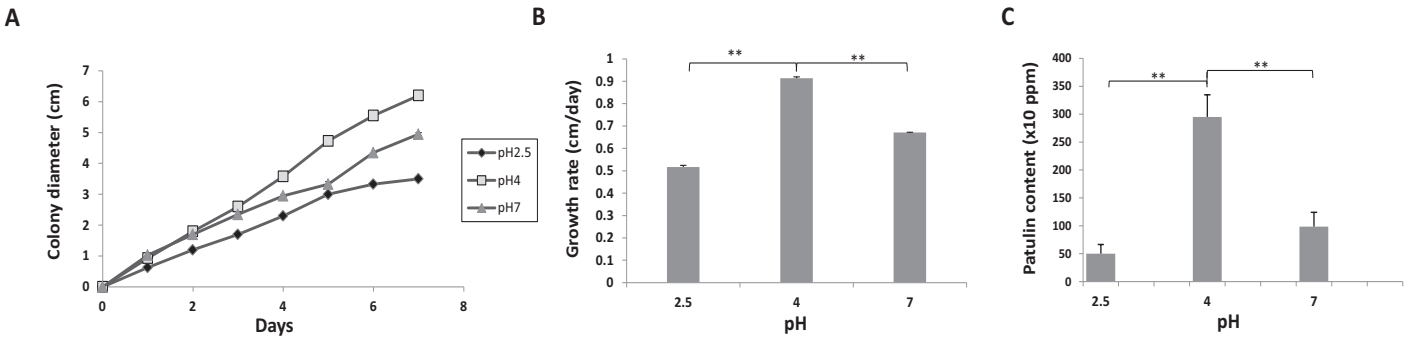


Figure 4 : Growth curves (A), radial growth rates (cm/day) (B) and patulin production (ppm) of *Penicillium expansum* NRRL 35695 on Czapek glucose agar medium under modified pH.
Three different pH values were tested (2.5, 4 and 7). The results shown are the mean of three technical replicates for each condition.
The standard errors of the mean (SEM) are represented by error bars: * = P < 0.05; ** = P < 0.01; *** = P < 0.001.

3.2. Mathematical modeling of *P. expansum* growth

The growth data modelled in this work comprised the latency phase and the growth curves of *P. expansum* strain NRRL 3565 at five temperatures, four a_W and three pH. Mycelial extension of colonies against time was almost invariable showing a straight line, after an initial lag period. The growth rates expressed in cm per day were calculated as the slope of the regression curves. The growth rates recorded under the different conditions (data presented above) were used as inputs to calculate the design parameters of equations 3- 7.

As mentioned in section 2.2., the water activity assays were carried out in plastic polyethylene bags to maintain the equilibrium relative humidity conditions and prevent water loss. As the fungus respire, the atmosphere within the polyethylene bags used decreases in oxygen and increases in carbon dioxide. These modifications in atmosphere composition have led to a slight decrease in growth rates of *P. expansum,* observed when comparing two *P. expansum* cultures grown under the same conditions (25°C, unmodified medium (0.99 a_W)), with or without using polyethylene bags. While developing the mathematical model, the ratio between the growth rate values determined under both oxygen availability and oxygen-limiting conditions was estimated to 0.76.

The model has undergone a first mathematical validation, confirming that the differences between the theoretical values predicted by the model and the data obtained under the conditions used to build the model are not significant. The Figure 5 shows the generated surfaces of the modelled data of temperature, a_W and pH on growth rate (expressed in cm/day). The surfaces generated by the model data summarizes all the growth rate values predicted under combined temperature and a_W (at a fixed pH 4), combined pH and temperature (at a fixed a_W of 0.99) and combined pH and a_W (at a fixed temperature of 25 °C). The fixed values are those for which the effect of the other combination of factors on *P. expansum* growth is visualized the best. The model predicts that the optimal conditions for *P. expansum* growth were a temperature of 24 °C, an a_W value of 0.99 and a pH value of 5.1. The predicted growth rates at optimal conditions were respectively 0.92 cm/day and 0.706 cm/day under oxygen availability and oxygen-limiting conditions. The minimal conditions for *P. expansum* growth as predicted by the model were a temperature of 3 °C, an a_W value of 0.85 and a pH value of 2. Under these combined set of conditions, a slowdown of growth to almost zero level is predicted by the model.

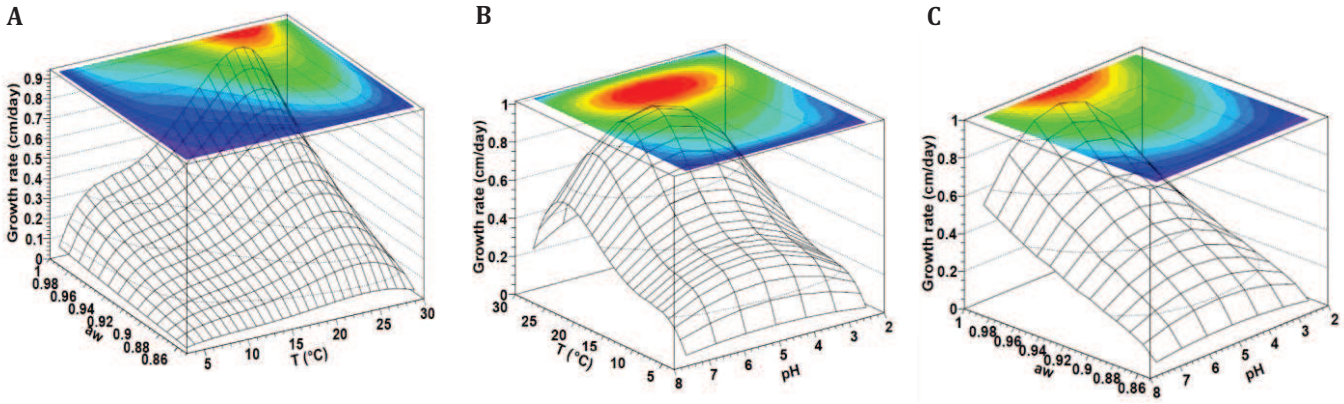


Figure 5 : Three-dimensional response surfaces showing the expected growth rates (cm/day) determined by the developed model as a function between temperature and a_W (A), temperature and pH (B) and pH and a_W (C).
The graph A correspond to a fixed pH value of 4, the graph B to a fixed a_W value of 0.99 and the graph C to a fixed temperature of 25°C.

The experimental validation of the *P. expansum* growth model was carried out on apples. The objective was to test whether the performance of the predictive model may be low in a realistic situation or not. This validation led to acceptable results under most of the conditions. The growth of the fungi on apples was in general slower than predicted by the model (Figure 6). However, a correlation coefficient of 0.96 was found between the experimental and predicted growth rate values (data not shown). The difference between the predicted and observed growth rates on apple is most probably due to the apple itself, which might be a stress factor for the fungus. Such stress factors include the intact tissue structure of the apple, which must be degraded in order to enable mould development to occur and which causes a reduced O_2 availability within the fruit. A similar result was observed in a previous study investigating the effect of temperature on *P. expansum* growth in both Apple Puree Agar Medium (APAM) and apples (Baert et al. 2007b). Our results obtained from *in vivo* experiments indicate that the employment of the developed modelling approach, to assess the combined effect of temperature, a_W and pH on the growth responses of *P. expansum* could be satisfactory. However, the risk in using the described model in real situations may lie in the difference in the initial inoculum size and the unrealistic constant conditions of temperature and moisture content.

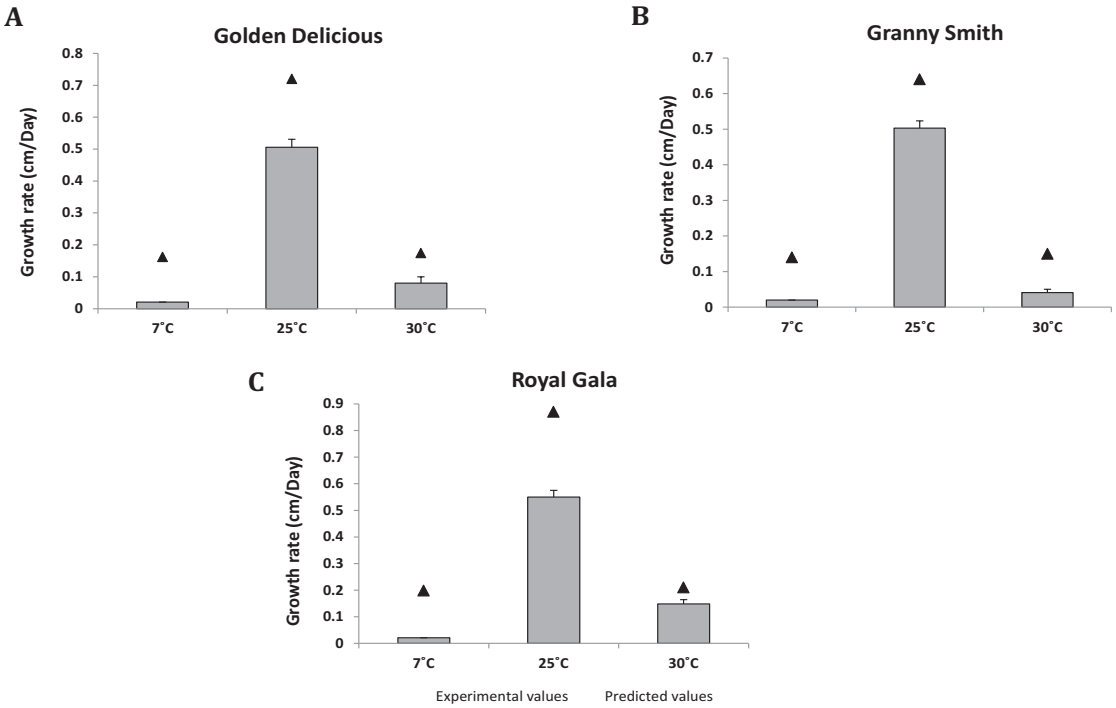


Figure 6 : Comparison of the predicted and the observed *P. expansum* growth responses on apples.
The experimental growth rate values are shown in histograms (□), while the predicted values are represented by black triangles (▲). The experimental growth rate values are the average of two replicates for each condition with the standard deviations shown as error bars.

A review of the literature reveals that certain mathematical models were developped to describe and predict the *P. expansum* growth under different environmental conditions. The combined effects of temperature and a_W on the growth rate of *P. expansum* were previously studied and modelled by Lahlali et al. (2005) on PDA medium. In their study, the data obtained with both sorbitol and glycerol as humectant were modelled by means of the quadratic polynomial model. In agreement with our findings, it was shown that *P. expansum* grows best at temperatures ranging from 15 to 25 °C and at an a_w ranging from 0.960 to 0.980. The growth rate and the lag time for six *P. expansum* strains were modelled as a function of temperature by Baert et al. (2007b) on APAM. In accordance with our results, the optimal temperature for growth varied between 24 and 27 °C depending on the strain. A similar modelling study was later conducted on both malt extract agar (with a pH value of 4.2 and an a_W of 0.997) and on simulating yogurt medium (Gougouli and Koutsoumanis 2010), where a Cardinal Model with Inflection (CMI) was used. The optimal temperature for *P. expansum* growth was determined as 22.08 °C, which was close to that predicted

by our model. Moreover, the predicted growth rate (0.221 mm/h, the equivalent of 0.55 cm/day), was lower than that expected in our study. Another predictive study was conducted by Judet-Correia et al. (2010) using the Cardinal Model with Inflection. The objective of the latter was to develop and validate a model for predicting the combined effect of temperature and a_W on the radial growth rate of *P. expansum* on PDA medium. The optimal conditions estimated by this study on Potato Dextrose were 23.9˚C for temperature and 0.981 for water activity. These estimated values are close to those predicted in the present work. However, the optimal growth rate expected was remarkably lower. This difficulty in comparing the growth rates is obviously due to the fact that the isolates in the study of Judet-Correia et al. (2010) were grown on PDA, whose composition differs from that of Czapek glucose agar.

As it can be observed, none of the previous conducted studies take into account more than two exogenous factors, hence the significance of the current study that investigate the potential interactions of the three key growth factors; temperature, a_W and pH. It is also worth mentioning that the effect of the latter factor on *P. expansum* growth has never been modelled before. In addition to its growth modelling approach, this study considers the distinction between the favorable conditions for growth and those for toxigenesis of *P. expansum.*

4. CONCLUSION

The findings in the current study provide a considerable insight and a very interesting and informative comparison of the growth rate and patulin production of *P. expansum* regarding three eco-physiological factors mainly involved in the proliferation of pathogenic fungi.

In the present work, a well-functioning predictive model was also developed as a tool to be used for the interpretation of *P. expansum* growth rate data. Within the experimental limits of temperature, pH and a_W, this model was able to predict the colony radial growth rates (cm/day) along a wide combination of culture conditions. Further, the validation showed that the model can predict the growth of *P. expansum* under natural conditions on apples, with an acceptable accuracy. Consequently, the developed mathematical model for predicting the *P. expansum* growth on a laboratory scale can be used as a tool to assess the risk of *P. expansum* in fruit juices industry by predicting conditions over which the *P. expansum* growth in food matrices might be a problem.

To conclude, this predictive model is built up based on the data on one *P. expansum* strain (NRRL 35695). As previously reported by McCallum et al. (2002), *P. expansum* isolates exhibit different

growth rates. In this regard, it will be interesting to evaluate the ability of this model to extrapolate to other strains within the same species. Ultimately, the extent to which the model can be applied to other inoculum sizes, other growth media and fluctuating temperatures is to be determined in future validation studies for extrapolation.

REFERENCES

Andersen, B., J. Smedsgaard and J. C. Frisvad (2004). "*Penicillium expansum*: consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(8): 2421-2428.

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

Baert, K., A. Valero, B. De Meulenaer, S. Samapundo, M. M. Ahmed, L. Bo, J. Debevere and F. Devlieghere (2007b). "Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag phase of *Penicillium expansum* in apples." International Journal of Food Microbiology **118**(2): 139-150.

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.

Baranyi, J. and T. A. Roberts (1994). "A dynamic approach to predicting bacterial growth in food." International Journal of Food Microbiology **23**(3): 277-294.

Binder, E. M., L. M. Tan, L. J. Chin, J. Handl and J. Richard (2007). "Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients." Animal Feed Science and Technology **137**(3): 265-282.

Bryden, W. L. (2007). "Mycotoxins in the food chain: human health implications." Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition **16**(1): 95-101.

Bullerman, L. B. and A. Bianchini (2007). "Stability of mycotoxins during food processing." International Journal of Food Microbiology **119**(1): 140-146.

Damoglou, A. P. and D. S. Campbell (1986). "The effect of pH on the production of patulin in apple juice." Letters in Applied Microbiology **2**(1): 9-11.

Dantigny, P., A. Guilmart and M. Bensoussan (2005). "Basis of predictive mycology." International Journal of Food Microbiology **100**(1): 187-196.

Drusch, S., S. Kopka and J. Kaeding (2007). "Stability of patulin in a juice-like aqueous model system in the presence of ascorbic acid." Food Chemistry **100**(1): 192-197.

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): 774-779.

European, C. (2003). "Commission regulation (EC) No 1425/2003 of 11 August 2003 amending regulation (EC) No 466/2001 as regards patulin." Official Journal of the European Union L **203**: 1-3.

European, C. (2006). "Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs." Official Journal of the European Union L **364**: 5-24.

Fakruddin, M., R. M. Mazumdar and K. S. B. Mannan (2011). "Predictive microbiology: Modeling microbial responses in food." Ceylon Journal of Science (Biological Sciences) **40**(2): 121-131.

Gaillard, S., I. Leguérinel and P. Mafart (1998). "Model for combined effects of temperature, pH and water activity on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores." Journal of Food Science **63**(5): 887-889.

Garcia, D., A. J. Ramos, V. Sanchis and S. Marín (2011). "Modelling the effect of temperature and water activity in the growth boundaries of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus*." Food Microbiology **28**(3): 406-417.

Gibson, A. M., N. Bratchell and T. A. Roberts (1988). "Predicting microbial growth: growth responses of *Salmonellae* in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature." International Journal of Food Microbiology **6**(2): 155-178.

Gougouli, M. and K. P. Koutsoumanis (2010). "Modelling growth of *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* at constant and fluctuating temperature conditions." International Journal of Food Microbiology **140**(2): 254-262.

Holmquist, G. U., H. W. Walker and H. M. Stahr (1983). "Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*." Journal of Food Science **48**(3): 778-782.

Judet-Correia, D., S. Bollaert, A. Duquenne, C. Charpentier, M. Bensoussan and P. Dantigny (2010). "Validation of a predictive model for the growth of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* on grape berries." International Journal of Food Microbiology **142**(1-2): 106-113.

Juneja, V. K., M. Valenzuela Melendres, L. Huang, V. Gumudavelli, J. Subbiah and H. Thippareddi (2007). "Modeling the effect of temperature on growth of *Salmonella* in chicken." Food Microbiology **24**(4): 328-335.

Kramer-Haimovich, H.,E. Servi,T. Katan,J. Rollins,Y. Okon and D. Prusky (2006). "Effect of ammonia production by *Colletotrichum gloeosporioides* on pelB activation, pectate lyase secretion, and fruit pathogenicity." Applied and Environmental Microbiology **72**(2): 1034-1039.

Lahlali, R., M. N. Serrhini and M. H. Jijakli (2005). "Studying and modelling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *P. expansum*." International Journal of Food Microbiology **103**(3): 315-322.

Lindroth, S., A. Niskanen and O. Pensala (1978). "Patulin production during storage of blackcurrant, blueberry and strawberry jams inoculated with *Penicillium expansum* mould." Journal of Food Science **43**(5): 1427-1429.

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 Microbiology Ecology **43**(3): 359-366.

Marin, S., N. Magan, J. Serra, A. J. Ramos, R. Canela and V. Sanchis (1999). "Fumonisin B1 production and growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* on maize, wheat, and barley grain." Journal of Food Science **64**(5): 921-924.

Marín, S., H. Morales, A. J. Ramos and V. Sanchis (2006). "Evaluation of growth quantification methods for modelling the growth of *Penicillium expansum* in an apple-based medium." Journal of the Science of Food and Agriculture **86**(10): 1468-1474.

McCallum, J. L., R. Tsao and T. Zhou (2002). "Factors affecting patulin production by *Penicillium expansum*." Journal of Food Protection **65**(12): 1937-1942.

Mislivec, P. B. and J. Tuite (1970). "Temperature and relative humidity requirements of species of *Penicillium* isolated from yellow dent corn kernels." Mycologia: 75-88.

Moake, M. M., O. I. Padilla-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., G. Barros, S. Marín, S. Chulze, A. J. Ramos and V. Sanchis (2008). "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.

Nazari, L., E. Pattori, V. Terzi, C. Morcia and V. Rossi (2014). "Influence of temperature on infection, growth, and mycotoxin production by *Fusarium langsethiae* and *F. sporotrichioides* in durum wheat." Food Microbiology **39**: 19-26.

Nguyen, M. T. (2007). "Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam: étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines". Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, France.

Northolt, M. D., H. P. Van Egmond and W. E. Paulsch (1979). "Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature." Journal of Food Protection **42**(6): 485-490.

Panagou, E. Z., P. N. Skandamis and G.-J. Nychas (2003). "Modelling the combined effect of temperature, pH and a_W on the growth rate of Monascus ruber, a heat-resistant fungus isolated from green table olives." Journal of Applied Microbiology **94**(1): 146-156.

Parra, R. and N. Magan (2004). "Modelling the effect of temperature and water activity on growth of *Aspergillus niger* strains and applications for food spoilage moulds." Journal of Applied Microbiology **97**(2): 429-438.

Paster, N., D. Huppert and R. Barkai-Golan (1995). "Production of patulin by different strains of *Penicillium expansum* in pear and apple cultivars stored at different temperatures and modified atmospheres." Food Additives & Contaminants **12**(1): 51-58.

Patterson, M. and A. P. Damoglou (1986). "The effect of water activity and pH on the production of mycotoxins by fungi growing on a bread analogue." Letters in Applied Microbiology **3**(6): 123-125.

Pitt, J. I. and A. A. D. Hocking (2009). Fungi and food spoilage, 3rd edition. Springer.

Pitt, J. I., R. A. Spotts, R. J. Holmes and R. H. Cruickshank (1991). "*Penicillium solitum* revived, and its role as a pathogen of pomaceous fruit." Phytopathology **81**(10): 1108-1112.

Puel, O., P. Galtier and I. P. Oswald (2010). "Biosynthesis and toxicological effects of patulin." Toxins **2**(4): 613-631.

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): 550-553.

Ross, T. and T. A. McMeekin (1994). "Predictive microbiology." International Journal of Food Microbiology **23**(3): 241-264.

Rousk, J., P. C. Brookes and E. Bååth (2009). "Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization." Applied and Environmental Microbiology **75**(6): 1589-1596.

Salomao, B., G. M. F. Aragão, J. J. Churey, O. I. Padilla-Zakour and R. W. Worobo (2009). "Influence of storage temperature and apple variety on patulin production by *Penicillium expansum*." Journal of Food Protection **72**(5): 1030-1036.

Sanderson, P. G. and R. A. Spotts (1995). "Postharvest decay of winter pear and apple fruit caused by species of *Penicillium*." Phytopathology **85**(1): 103-110.

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.

Sweeney, M. J. and A. D. W. Dobson (1999). "Molecular biology of mycotoxin biosynthesis." FEMS Microbiology Letters **175**(2): 149-163.

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

Tassou, C. C., E. Z. Panagou, P. Natskoulis and N. Magan (2007). "Modelling the effect of temperature and water activity on the growth of two ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* from Greek wine grapes." Journal of Applied Microbiology **103**(6): 2267-2276.

Valık, L., J. Baranyi and F. Görner (1999). "Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Penicillium roqueforti*." International Journal of Food Microbiology **47**(1): 141-146.



CHAPITRE 2

Caractérisation du cluster des gènes de la patuline chez *Penicillium expansum*

Le chapitre 2 du travail expérimental porte sur la caractérisation du cluster des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la patuline chez l'espèce fongique qui constitue de loin la principale source de contamination par la patuline dans l'alimentation humaine : *Penicillium expansum*. Tous les détails de cette étude sont présentés à la suite dans l'article « Sequencing, physical organization and kinetic expression of the patulin biosynthetic gene cluster from *Penicillium expansum*». Cet article a été accepté pour publication dans *International Journal of Food Microbiology* en Juillet 2014.

2.1. Résumé de l'étude

La génétique de la biosynthèse de la patuline présente de fortes lacunes contrairement aux autres mycotoxines règlementées pour lesquelles des progrès spectaculaires ont été réalisés. Il y a quelques années, un cluster potentiel de la patuline a été caractérisé chez une souche non productrice d'*Aspergillus clavatus* NRRL1, de même quelques gènes cruciaux reliés à la biosynthèse de cette mycotoxine ont été identifiés chez d'autres espèces non productrices telles que *Penicillium chrysogenum* et *Penicillium digitatum*. Ces découvertes restent cependant modestes au regard du gros problème que constitue la contamination des produits issus de la transformation des pommes par la patuline. De ce fait, l'élucidation des séquences des gènes du cluster de la patuline chez *Penicillium expansum* fait figure d'une « clé de voute » pour toute étude visant à comprendre la synthèse de la patuline dans les pommes et constitue une étape cruciale en vue du développement de stratégies limitant la présence de la patuline dans ce type de produits.

Dans cette optique, la présente étude a consisté en l'isolement, le séquençage et la caractérisation du cluster de gènes codant pour la synthèse de la patuline chez la souche de *P. expansum* NRRL 35695. Une stratégie expérimentale fondée en trois étapes a été mise au point pour répondre à cet objectif. Après avoir effectué des alignements de séquences de certains gènes orthologues disponibles chez des espèces fongiques apparentées comme *P. chrysogenum, P. digitatum* et *A. clavatus*, des amorces ciblant les régions les plus conservées ont été conçues pour amplifier et séquencer des fragments de gènes chevauchants chez *P. expansum.* Dans l'étape suivante, les ordres et les orientations hypothétiques de ces gènes ont été prédits en s'appuyant sur les clusters partiels ou entiers présents chez les espèces fongiques citées précédemment. Plusieurs couples d'amorces spécifiques ont été dessinés sur la base des séquences partielles déterminées au cours de cette étude afin de cibler les régions intergéniques. Ces dernières ont ensuite été amplifiées afin de relier les gènes et former des îlots. En troisième lieu, la technique de

« GenomeWalking » qui permet le séquençage de proche en proche, a été utilisée pour séquencer les gènes restants, et relier l'ensemble des îlots. A l'issue de cette étude, le cluster de la patuline a été entièrement séquencé chez *P. expansum.* Ce cluster regroupe 15 gènes (*patA*-*patO*) occupant une région du génome d'environ 40 217 pb.

Dans un deuxième temps, pour aller au-delà d'un simple séquençage de gènes et vérifier que nous avions bien affaire au cluster de la patuline chez *P. expansum*, l'expression de ces gènes a été analysée sous conditions permissives et restrictives à la production de la patuline. Parallèlement, le taux de toxine dans le milieu a été mesuré par HPLC. A l'issue de ces analyses, tous les gènes du cluster ont montré une expression significativement plus importante sous les conditions permissives. Sous ces conditions est observée, durant la cinétique, une augmentation des expressions de ces gènes directement corrélée à l'augmentation de la concentration de patuline dans le milieu. En revanche, lorsque le champignon a été cultivé dans des conditions restrictives qui ne favorisent pas la production de patuline, des traces de patuline ont été détectées dans le milieu, avec des expressions de gènes qui sont restées à un niveau basal. Ces analyses montrent ainsi une forte association entre ces gènes et la production de patuline, suggérant leur implication évidente dans la synthèse de la patuline chez *P. expansum.*

Pour conclure, la découverte du cluster des gènes de la patuline chez *P. expansum* constitue à court terme la première étape requise pour une meilleure compréhension des mécanismes conduisant à la production de la patuline par ce champignon. Cette découverte ouvre à long terme, de nouvelles perspectives intéressantes pour tout travail d'application visant la maitrise de la qualité sanitaire des pommes. Ces perspectives s'échelonnent entre **la prévision précoce** du risque en développant une méthode de PCR en temps réel pour la détection et la quantification spécifique du champignon *P. expansum*, responsable majeur de la pourriture bleue des pommes lors du stockage et **le contrôle de la production** de patuline en identifiant les gènes clés qui modulent cette biosynthèse et sur lesquels il serait possible d'agir. Une meilleure connaissance des mécanismes modulant la production de patuline permettrait d'envisager le développement de stratégies pour réduire l'occurrence de cette mycotoxine dans la chaine alimentaire.

2.2. Article: Sequencing, physical organization and kinetic expression of the patulin biosynthetic gene cluster from *Penicillium expansum* ***(ARTICLE 2)***

(Voir manuscript qui suit)

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, Illkirch, 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).

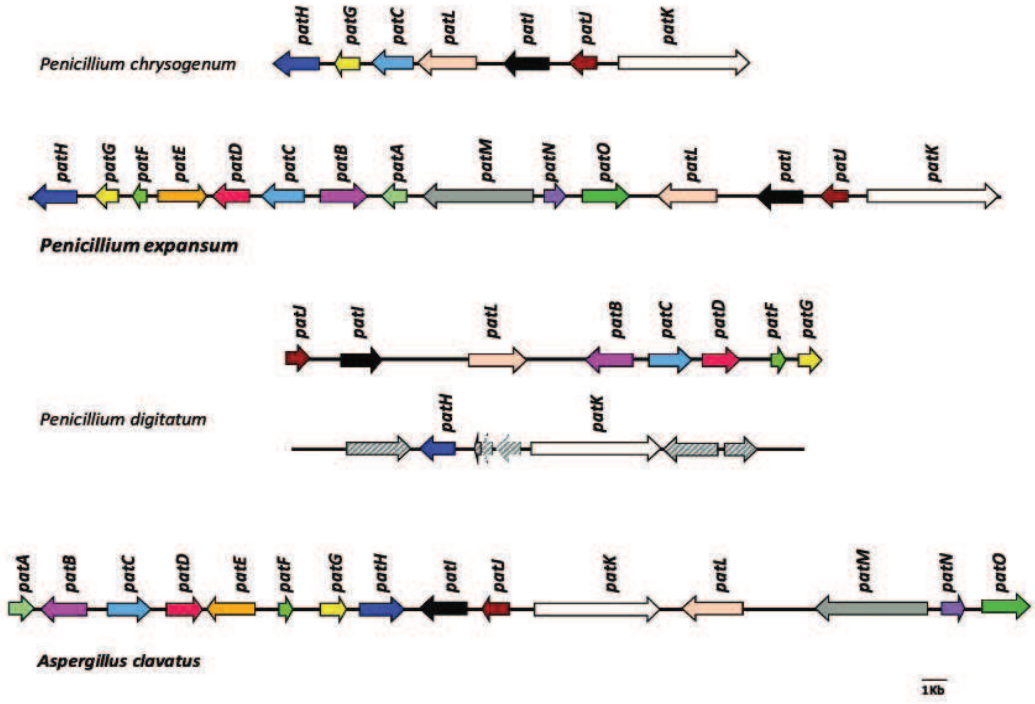


Fig. 1. Schematic representation of the patulin gene cluster in *P. expansum* and comparison of gene organization with three other fungal species that contain some genes related to patulin production or the entire patulin cluster. The direction of transcription is indicated by arrowheads and homologous 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).

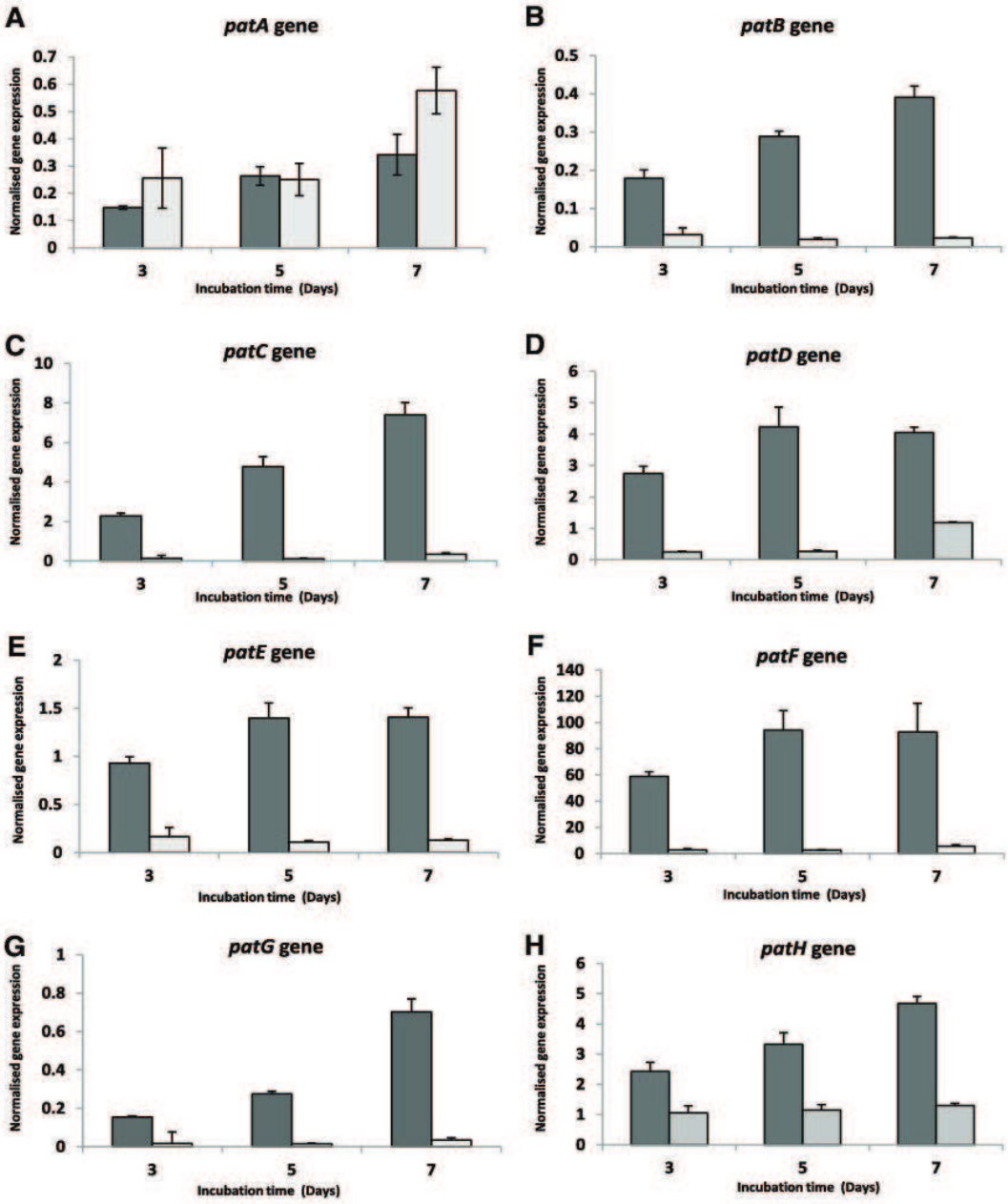


Fig. 2. Time coordinated expressions of the putative patulin biosynthesis genes in *P. expansum* under patulin-permissive and restrictive conditions on APAM (■) and MEM (□), respectively. Relative expression values are the averages of five replicates for each day of culture with standard deviations shown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

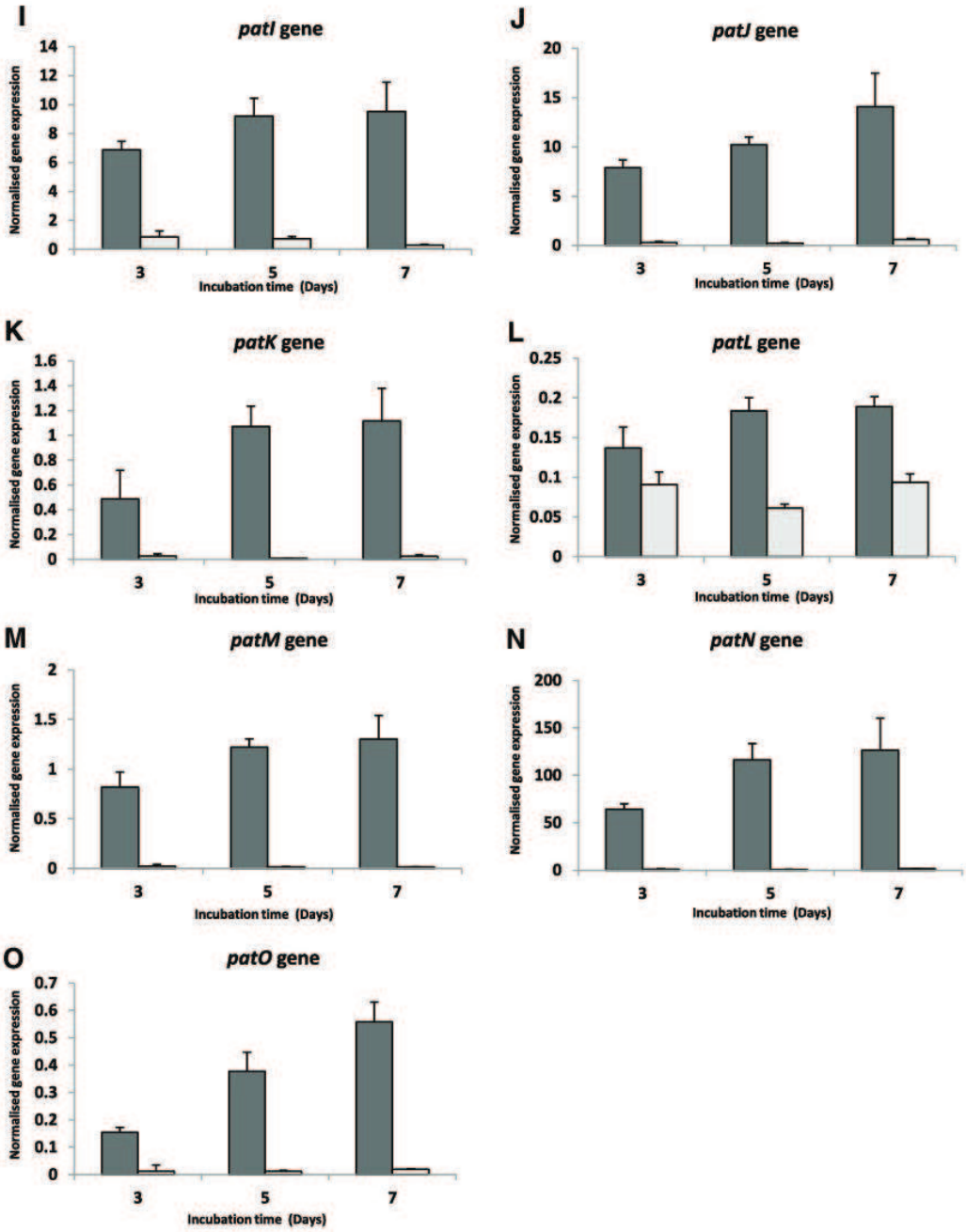


Fig. 2 (*continued*).

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

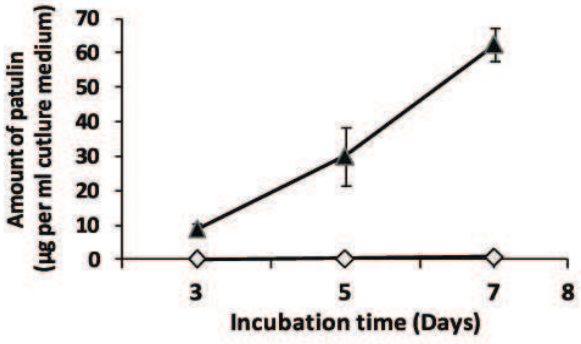


Fig. 3. Patulin production by *P. expansum* grown under patulin-permissive (▲) or restrictive conditions ( ), measured by HPLC-DAD at 277 nm and expressed in μg/mL of culture medium. Five replicates were performed for each day of culture.

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.

Supplementary materials

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

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.



CHAPITRE 3

Caractérisation biochimique des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la patuline

Maintenant que le cluster de la patuline a été identifié et caractérisé chez *P. expansum*, le défi à relever est d'attribuer un rôle aux gènes non caractérisés de ce cluster. Notre laboratoire est engagé depuis plusieurs années dans l'élucidation de la fonction de ces différents gènes. A l'heure actuelle, le rôle de trois gènes clés a été mis en lumière par notre équipe grâce à des expériences d'expressions en système hétérologue (Artigot et al. 2009; Snini et al. 2014). La principale limite à l'application de cette méthode de caractérisation réside dans la nécessité d'avoir une hypothèse évidente quant à la fonction du gène pour se servir du bon substrat et suivre sa métabolisation dans l'organisme transformé. Et quand bien même l'hypothèse posée est fortement plausible, la disponibilité commerciale du substrat potentiel en limite grandement l'utilisation. Pour pallier cette limite, une approche faisant appel à la construction de souches mutantes déficientes, couramment utilisée dans le domaine de la biologie fongique, s'est imposée progressivement au sein de notre laboratoire comme alternative à la technique utilisée dans les premiers travaux.

Dans ce chapitre de la thèse, nous nous sommes intéressés particulièrement aux deux gènes *patL* et *patE* du cluster de la patuline, dont la fonction n'a pas encore pu être déterminée avec certitude. L'élucidation du rôle biochimique de ces deux gènes a été rendue possible en inhibant leur fonction par le biais d'une mutation ciblée introduite par recombinaison homologue. L'observation ultérieure du comportement des mutants a permis d'identifier ces fonctions. Ces deux champs d'investigation sont présentés séparément ci-après sous forme de deux articles rédigés en langue anglaise.

3.1. Caractérisation du gène *patL* codant un facteur de transcription spécifique de la voie de biosynthèse de la patuline

3.1.1. Résumé de l'étude

Comme souligné précédemment dans l'introduction de ce manuscrit de thèse, dix enzymes au minimum, codées par dix gènes distincts sont impliquées dans la voie de biosynthèse de la patuline. Le cluster de la patuline comportant en totalité 15 gènes, les cinq gènes restant coderont pour d'autres protéines telles que des transporteurs et des facteurs de régulation.

La présence d'un facteur de régulation spécifique au sein des clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse de métabolites secondaires fongiques a été largement documentée. Ce facteur

est susceptible de moduler l'expression des autres gènes contenus au sein du même cluster et de contrôler par conséquent la production du métabolite en question. A ce jour, plusieurs facteurs de régulation spécifiques à des voies de biosynthèse de mycotoxines sont caractérisés. Cependant, l'identité du gène régulateur spécifique de la synthèse de la patuline demeurait inconnue avant la présente étude.

L'analyse BLAST protéique de la protéine codée par le gène *patL* chez *P. expansum*, suggère son implication dans la voie de biosynthèse de la patuline en tant que régulateur spécifique de cette voie vue l'existence de deux domaines conservés ; (i) le premier, un motif protéique de fixation à l'ADN en doigt de zinc de type C6 (Cys6) rencontré fréquemment dans les facteurs de transcription, tels que la protéine GAL4 qui est un activateur transcriptionnel caractérisé chez *Saccharomyces cerevisiae* ou la protéine FACB chez *Aspergillus nidulans*, et (ii) le deuxième, un domaine retrouvé dans la large famille des facteurs de transcription fongiques à doigts de zinc.

Cette étude visait deux objectifs qui se renforcent mutuellement. Le premier objectif envisagé consistait à valider l'hypothèse retenue quant au rôle du gène *patL* comme facteur de régulation spécifique de la voie de biosynthèse de la patuline, alors que comme deuxième objectif, visant à une meilleure compréhension de l'interaction hôte-pathogène, nous avons cherché à savoir si l'espèce *P. expansum* a besoin de produire la patuline pour se développer dans le fruit comme est le cas de certaines mycotoxines présentes sur le blé (DON et zéaralénone). La stratégie envisagée pour répondre simultanément à ces deux objectifs requiert dans un premier temps la délétion ciblée du gène *patL* et son remplacement par le gène de résistance à l'hygromycine chez *P. expansum*. En cas de validation de la première hypothèse, ce mutant ne doit évidemment pas produire de la patuline. Il servira par conséquent à confirmer ou infirmer l'implication de la patuline dans le processus de pathogénicité de *P. expansum* dans les pommes en comparant son développement à celui de la souche sauvage productrice de patuline.

Comme prévu, la suppression de ce gène a engendré chez la souche mutante PeΔ*patL*1 une incapacité de production de patuline associée à une sévère diminution de l'expression de tous les gènes du cluster. Chez la souche complémentée *ΔpatL:patL,* la capacité de production de patuline a été rétablie, de même que les expressions des gènes. L'impact de la délétion du gène *patL* sur les caractéristiques morphologiques du champignon a été également étudié sur différents milieux de culture. Cette étude morphologique a souligné des différences majeures entre la souche sauvage et la souche délétée pour le gène régulateur spécifique.

Les analyses de la pathogénicité effectuées sur des pommes de la variété Golden Delicious ont dévoilé une incapacité chez la souche mutante PeΔ*patL*1 à infecter les pommes à la même vitesse

que la souche sauvage. En contrepartie, les lésions externes brunes apparues sur les pommes infectées par la souche complémentée se sont propagées à la même vitesse en comparaison avec ceux générées par la souche sauvage. A notre connaissance, c'est la première étude concluant avec certitude à une implication évidente de la patuline dans le développement de la moisissure bleue sur les pommes.

Tous les détails au sujet de cette étude qui sera bientôt soumise pour publication, sont présentés ci-dessous sous forme d'un article.

3.1.2. Article: The disruption of *patL,* the patulin specific transcription factor affects *Penicillium expansum* virulence on apples ***(ARTICLE 3)***

(Voir manuscript qui suit)

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.

[*] Contact information about Corresponding Author:

Olivier PUEL

Immuno-Myco-Toxicology, INRA, UMR 1331 TOXALIM

180, Chemin de Tournefeuille

F-31027 Toulouse, FRANCE

E-mail address: 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 blue mold decay of apples, a disease caused by *Penicillium expansum*. Patulin is cytotoxic, genotoxic and has immunosuppressive properties but there is no evidence of carcinogenicity. As the other well-known mycotoxins, patulin is the final product of a string of enzymatic reactions. In filamentous fungi, the secondary metabolites' biosynthetic pathways are enzymatic cascades, where enzymes are activated at the same time and the new synthesized products are consecutively metabolized by the next enzyme. This phenomenon is due to the organization of the genes encoding these enzymes within a cluster. These genes are co-activated by a transcription factor often located in the metabolic gene cluster. Recently, the patulin gene cluster (*patA*-*patO*) was identified in *P. expansum*. A BLAST analysis has revealed that the gene *patL* encodes 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 the aflatoxin biosynthesis. Disruption of *patL* caused the inability to produce patulin with an important decrease of the expression of the *Pat* genes. In the complemented Δ*patL: patL* strain, the ability to produce patulin is restored. Pathogenicity studies performed on apples indicated that the Δ*patL* strain can infect apples but not in the same manner as the wild-type strain. Based on these results, we can conclude that patulin plays a significant role in the development of the blue mold decay on apples.

Keywords: *Penicillium expansum*, *patL*, specific transcriptional regulator, patulin, virulence factor, blue mold decay, apples.

1. INTRODUCTION

Blue mold, caused by *Penicillium expansum,* is the most important postharvest disease attacking apples. It represents a significant economic problem for the fresh-fruit industry, causing up to 80 % of decay in stored fruits (Morales et al. 2007). *Penicillium expansum* is a pathogen that infects the fruit tissues causing maceration and decays. Injuries on the fruit skin caused by birds, insects or even humans during the harvest or postharvest handling process are the principal sites of invasion by *P. expansum* conidia. However, the pathogenicity determinants of this fungus remains yet unknown. A great number of studies focused on the close relationship between the modulation of the host's ambient pH by the fungus and its pathogenicity. In this regard, *P. expansum* acidifies the apple tissues via the secretion of organic acids such as gluconic and fumaric acid accompanied by ammonium depletion (Vilanova et al. 2014). The Glucose oxidase (GOX), in this fungus, catalyzes the oxidation of β-D-glucose into gluconic acid. Similarly to other postharvest pathogens, the secretion of pectolytic enzymes is a key factor in the pathogenicity of *P. expansum*. The transcription of one of these enzymes, the polygalactorunase, is activated by the acidification of the apple tissue. The secretion of this enzyme by *P. expansum* depolymerizes pectin, thereby causing tissue maceration (Yao et al. 1996), hence the close association between the fruit acidification and the pathogenicity of this fungus.

The blue mold caused by *P. expansum* is often associated with patulin production that affects the apple products quality. Patulin is a toxic secondary metabolite that has been reported to cause intestinal disorders (McKinley and Carlton 1980) such as ulceration and bleeding (Speijers et al. 1988). Because of the patulin's cytotoxic, genotoxic and immunosuppressive properties (Moake et al. 2005), the European Union has fixed the maximum tolerated level at 50 µg/kg for fruit juice and derived products and 25 µg/kg for solid apple products. The tolerated level in food destinated for infants and young children was set at 10 µg/kg.

The biological role of mycotoxins has not been clearly established, but several studies attribute to these molecules a role in the pathogenicity and virulence in both animals and plants (Scharf et al. 2014). In humans, gliotoxin enhances the virulence of *Aspergillus fumigatus* by inhibiting the phagocytosis activity of neutrophils, that usually eliminate the fungus from the lung epithelium (Coméra et al. 2007). Melanin is another secondary metabolite that proved to be a virulence factor. DHN-melanin was essential for the virulence of *A. fumigatus* in humans, but also for the virulence of *Magnaporthe oryzae* in rice (Woloshuk et al. 1980; Langfelder et al. 1998). For instance, deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV), and fumonisin B1 (FB1) were proved to have a

well-established role in the onset of diseases caused by *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides* on cereals (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 studies have used the gene disruption technique in order to block the biosynthetic pathway in a step, leading to the accumulation of one intermediate or to completely turning off this pathway to remove the mycotoxin and all its intermediates (Proctor et al. 1995; Tsai et al. 1998).

In filamentous fungi, the production of secondary metabolites is usually orchestrated by a series of enzymes activated at the same time, so that the new synthesized products are consecutively metabolized by the subsequent enzyme in the biosynthetic pathway. This phenomenon is made possible by the organization of the genes encoding these enzymes within a cluster (Keller and Hohn 1997; Keller et al. 2005). A large number of gene clusters associated with the production of several mycotoxins have already been discovered, like the cluster responsible for the biosynthesis of 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. A cluster associated with the patulin biosynthesis was identified in *Aspergillus clavatus* (Artigot et al. 2009). In the latter species, two genes encoding cytochromes P450 (Artigot et al. 2009) and one encoding the 6-methylsalicylic decarboxylase (Snini et al. 2014) were characterized. Very recently, the gene cluster of the patulin biosynthesis was identified in *Penicillium expansum*, the main patulin producer in apples (Tannous et al. 2014).

The cluster genes are commonly co-activated by a specific transcription factor often localized within the cluster which is it-self activated by other global transcription factors such as LaeA and VeA. Occasionally, the gene coding for the transcription factor could be out the metabolic cluster (Flaherty and Woloshuk 2004). The transcription factors are proteins that regulate the gene expressions by binding to specific gene promoters sites. Positive acting pathway-specific transcription factors are known for trichothecenes (Proctor et al. 1995) and aflatoxins/sterigmatocystin (Payne et al. 1993; Woloshuk et al. 1994; Yu et al. 1996). Numerous studies have revealed that the 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 typically occurs in fungal transcription factors (Ehrlich et al. 1999a; Ehrlich et al. 1999b). 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). These specific transcription factors play the role of a switch between the production and the non-production of mycotoxins.

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 gene *patL* (Δ*patL* strain) and therefore showed the key role played by the PATL in the the patulin biosynthesis regulation. The involvement of patulin in the pathogenicity and the virulence of *Penicillium expansum* was studied as well.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Chemicals

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

2.2. Strains, media and culture conditions

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

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 and liquid Luria-Bertani medium, both containing ampicillin at the concentration of 100 μg/mL.

2.3. Adopted strategy to obtain peΔpatL mutant and complemented strain

2.3.1. Construction of the Δ*patL* gene disruption cassette

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

Table 1 : Primers used in this study

PRIMER	SEQUENCE (5'→ 3')	ANNEALING TEMPERATURE
5fdebpatLPex[1]	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGCGGACACTTCACCTTG TAAAGGATCTG	60 ˚C
debpatLPex1Rhygro[2]	GAGCCTGTGTGTAGAGATACAAGGGAATTCGACGGAGGCGTGGG GTGGA	60 ˚C
hphF1	GAATTCCCTTGTATCTCTACACACAGGCTC	62 ˚C
hphR1	CGAGTGGAGATGTGGAGTGGGCG	62 ˚C
finpatLPex1Fhygro[2]	GTGTAAGCGCCCACTCCACATCTCCACTCGGTCCGACTTAGAGTA CCGCCCTC	60 ˚C
3rfinpatLPex[1]	GCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCCCTATAGGCCTTGTG GGACCATAC	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 sequences underlined were added at the 5'end and were identical to the extremities of the pRS426 cloning vector

[2] The sequences 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 gene flanked by DNA sequences corresponding to the sequences located at the 5' (left jonction) and the 3' (right jonction) ends of the *patL* gene was constructed by homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae.*

The fragments required for the gene disruption cassette were amplified 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 the two respective primer pairs 5fdebPatLPex/DebPatLPex1Rhygro and FinPatLPex1Fhygro/3rfinPatLPex. The primer pair hphF1/hphR1 was used to amplify a 4107 bp fragment encoding for the hygromycin resistance cassette, containing the *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 underlined sequences of the primers DebPatLPex1Rhygro and FinPatLPex1Fhygro were added at their 5'end. These sequences are identical to the extremities of the PCR product generated by the primer set hphF1/hphR1, aiming to ensure the recombination between the PCR products. The underlined sequences of the primers 5fdebPatLPex and 3rfinPatLPex were added at their 5'end and represent the extremities of the pRS426 cloning vector used for the homologous recombination in *S. cerevisiae*. The PCR conditions for the left junction and the right junction amplifications were as follows: an initial denaturation for 30 s at 98°C, followed by 40 cycles of denaturation for 10 s at 98°C, annealing for 30 s at 60°C and an extension for 45 sec at 72°C. A final extension step for 10 min at 72°C was performed. The PCR conditions for the amplification of the hygromycin resistance cassette were identical as the previously described except for the extension cycle which was performed at 72°C for 2 min instead of 45 sec. The Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo scientific, Illkirch, France) was used for the PCR reactions. These three amplicons were purified using the GenElute™PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich) following the procedure specified by the manufacturer.

The two junctions were co-transformed into yeast along with the hygromycin resistance cassette and the pRS426 cloning vector digested with BamHI and EcoRI. The circular construct was generated by homologous recombination. The procedure allowing the yeast transformation was achieved according to Colot et al. (2006) with few changes and is detailed in the Figure S1. The yeast DNA extraction was performed using the Fastprep system (MP biomedical, France) with lysing matrix C (MP biomedical) and the yeast lysis buffer instead of the 0.5 mm glass beads. Subsequently, the resulting linear deletion cassette (6229 bp) was amplified from the pooled yeast DNA using the nested primer set (dPatL-NestedF and dPatL-NestedR) and the PCR conditions previously described with an adjustment of the extension time to 3.25 min. This DNA fragment carrying the hygromycin resistance cassette fused with the *patL* flanking regions was used to transform the protoplasts of *P. expansum* NRRL 35695 strain in order to generate the PeΔ*patL*

strain. For the complementation of the mutant strain, the primer set dPatLF3/dPatLR3 was used to generate the DNA fragment from the WT strain which is used to transform the protoplasts of the PeΔ*patL* strain.

2.3.2. 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 $MgSO_4$ 1.2 M, pH 5.8) for 3 hours at 26°C on an orbital shaker set at 60 rpm. After the appropriate incubation period, the protoplasts and the cellular debris were deposited to the bottom of a tube containing MS buffer (Sorbitol 0.6 M and MOPS 10 mM, pH 6.3), as previously described in Merhej et al. (2011). Cellular debris and protoplasts were separated by centrifugation. The interphase containing protoplasts was removed and washed with TMS buffer (Sorbitol 1 M and MOPS 10 mM, pH 6.3). Protoplasts were then 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 (1.10^7 protoplasts/mL) were added 5 µg of the target DNA immersed in 60 µL Tris-EDTA-$CaCl_2$ buffer (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, $CaCl_2$ 40 mM, pH 7.5). The DNA mixture was then combined with 160 µL of a 60 % solution of PEG (Polyethylene glycol). For the complementation, the target DNA was co-transformed 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. On the following day, 5 mL of TopAgar YPDS containing hygromycin (150 µg/mL) or geneticin (100 µg/mL) were poured on the plates that were re-incubated at 25°C. Transformants were purified by monoconidial isolation and screened for successful insertion as described further.

2.3.3. Nucleic acid manipulation

To confirm the insertion of the hygromycin resistance cassette at the *patL* locus in *P. expansum,* a PCR followed by enzymatic digestions were performed. The genomic DNA was first of all extracted as described by Puel et al. (2005). The transformants were screened for the desired

integration event by PCR using the primer pair dPatLF3/dPatLR3 which yielded a 5030 bp product for the wild-type (WT) strain and a 6681 bp only if the plasmid construct integrated the *P. expansum* chromosomal DNA by homologous recombination. These primers were designed outside the left and the right junction of the disruption cassette. The PCR conditions previously described with an adjustment of the extension time to 3.45 min were applied. Enzymatic digestions were performed for all the PCR products using the NdeI restriction enzyme. This enzyme produces three fragments of 122 bp, 1030 bp and 3878 bp for the WT strain, while it cuts the *patL* mutant strain DNA into four fragments of 122 bp, 1030 bp, 1570 bp and 3959 bp.

The Southern blot analyses were performed on 20 µg of genomic DNA digested with the StuI restriction enzyme, separated by electrophoresis on 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 the respective 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.

2.4. Comparative analyses between wild-type, mutant and complemented strains

2.4.1. *In vitro* growth, macroscopic and microscopic morphologies

The strains of interest were conserved at +4°C on Malt Extract Agar (MEA) medium. Prior to the morphological experiments, the strains were plated on MEA and grown for 7 days at 25°C to enhance the sporulation. The pore suspensions were prepared according to Adjovi et al. (2014). To compare the radial growth, a calibrated inoculum of 10^4 spores was plated centrally on both MEA and PDA and incubated at 25°C in the dark. The diameter of the colonies were measured after 7 days. For macroscopic and microscopic examination, a 3-point inoculation was done on the 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.

2.4.2. Quantitative analysis of the patulin gene cluster relative expression and patulin production *in vitro*

Cultures conditions used for the analysis of the patulin gene cluster relative-expression levels were identical to these previously described by Tannous et al. (2014). The apple based medium (APAM= Apple Puree Agar Medium), permissive substrate for patulin production was used (Baert et al. 2007) and the plates were incubated for 5 days at 25˚C in the dark. Six biological replicates were done for each strain. Cultures were also done on Czapek agar medium. After the appropriate incubation period, the total RNAs extraction and the reverse transcription were performed as previously described by Tannous et al. (2014). Real-Time-PCR was used to quantitatively evaluate the expression levels of the entire genes in the patulin cluster for each strain. The primers used and the real-time-PCR conditions were similar to those designed by Tannous et al. (2014). In parallel, patulin was extracted from the agar media as described by Tannous et al. (2014) and assessed by HPLC-DAD.

2.4.3. Patulin production analysis *in vivo*

The abilities to cause blue mold decay and to produce patulin by the WT, the mutant and the complemented strains were assessed *in vivo* on Golden Delicious apples. The apples used in these analyzes were collected from a supermarket in Toulouse (France) and visually inspected to be free of any injury or physical attack.

As previously described by Sanzani et al. (2012), apples were surface-sterilized with a 2 % sodium hypochlorite solution and rinsed with water. Apples were then wounded with a sterile toothpick to a depth of 1 cm. For each isolate, 10 µL of a spore suspension at a concentration of 10^4 conidia/mL were deposited into the wounds of apples. Six biological replicates were done for each strain. Apples were later incubated at 25°C in the dark for 14 days. The diameters of the rotten spots were measured regularly every two days and the growth rates were estimated. The rot volumes were determined following the method described by Baert et al. (2007).

At the end of the incubation period, apples were grinded and treated as previously described by MacDonald et al. (2000). An aliquot of 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. After the overnight incubation, the samples were centrifuged for 5 min at 4500 g and the supernatants were collected and macerated with 50 mL of ethyl acetate. The recuperated-organic phase was filtered through Whatman paper, concentrated using a rotary evaporator *in vacuo* set at 50°C and then evaporated to dryness using a Zymark TurboVap (McKinley Scientific, Sparta, NJ, United States) set at 60°C. The residues were later dissolved in 300 µL methanol/water (80/20), and filtered through a 0.45 µm pore-size filter prior to injection (25 µL) into the chromatography apparatus. Patulin production was determined by HPLC-DAD analysis.

2.4.4. Kinetic of patulin production by *P. expansum* on apples

In order to determine the time at which the patulin production by *P. expansum* starts after the apple infection, a kinetic study was performed. Eighteen Golden Delicious apples were inoculated in the same manner as described in the previous paragraph and were incubated at 25°C. For the duration of 6 days, three apples were analyzed daily. The rotten spot diameters were measured and the rotten tissues with a one centimeter margin of the healthy tissue were sampled in order to estimate the patulin production. Samples were grinded and patulin was extracted as previously described. The patulin production was determined by HPLC-DAD analysis.

2.4.5. HPLC-DAD analyses

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/min using the following gradient elution program: 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. Eluent A was water acidified with 0.2 % acetic acid and eluent B was methanol HPLC grade (Fisher Scientific, Illkirch, France). 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.

2.4.6. Statistics

Following the Fischer test based on the equality of variances, one-way ANOVA was used to analyze the differences between the 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). The differences were considered to be statistically significant when the *p*-value was less than 0.05.

3. RESULTS

3.1. Sequence analysis of *patL* gene from *Penicillium expansum*

The search for 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 conserved domain is exclusively found in fungi, and therefore the hypothesis of this study was that the *patL* gene encodes for the specific regulatory factor involved in the patulin biosynthesis.

3.2. The disruption and complementation of the *patL* gene in *P. expansum*

In order to study the role of PATL in the regulation of the *pat* gene expressions, the gene disruption cassette Δ*patL* shown in Figure 1, was transformed into the protoplasts of *P. expansum* wild-type NRRL 35695 strain, to generate PeΔ*patL* mutants. Following the transformation of the *P. expansum* WT strain, 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 who have proven to be non-producers were selected for the subsequent tests. Fourty-four fungal transformants were retained of which 19 were analyzed by PCR to confirm the correct integration of the gene disruption cassette.

Firstly, the presence of the disruption cassette in the mutants' genome was confirmed by the amplification of their genomic DNA with primers that anneal to the sequence of the hygromycin resistance gene. All the transformants tested presented the Δ*patL* disruption cassette. The presence of the disruption cassette at the *patL* locus was then confirmed using the primers dPatLF3/dPatLR3. These primers were designed to anneal on the *P. expansum* genomic DNA and not on the Δ*patL* disruption cassette. The difference between the obtained PCR product lengths generated from the WT strain and the mutant strains allowed their identification. The WT strain resulted in a 5030 bp amplicon whereas a 6681 bp amplicon was obtained from the mutant strains.

To further confirm the presence of the disruption cassette at the *patL* locus, an enzymatic digestion of the amplicons previously generated was performed using the restriction enzyme NdeI. Out of the 19 isolates tested 17 generated three fragments (122 bp, 1030 bp and 3878 bp) and were proven to have the right mutant profile.

Afterwards, the Southern blot confirmed the unique insertion of the disruption cassette into the *patL* locus in the PeΔ*patL*1 strain (Figure 2). The mutant strain PeΔ*patL*1 was used for the following experiments. To confirm that the phenotype exhibited by the mutant strain PeΔ*patL*1 was resulting from the mutation of the *patL* gene, the disrupted strain PeΔ*patL*1 was transformed with a WT copy of *patL* to generate the complemented strain PeΔ*patL*: *patL*. The targeted and unique insertion of the WT copy of *patL* was also confirmed by southern blot (Figure 2).

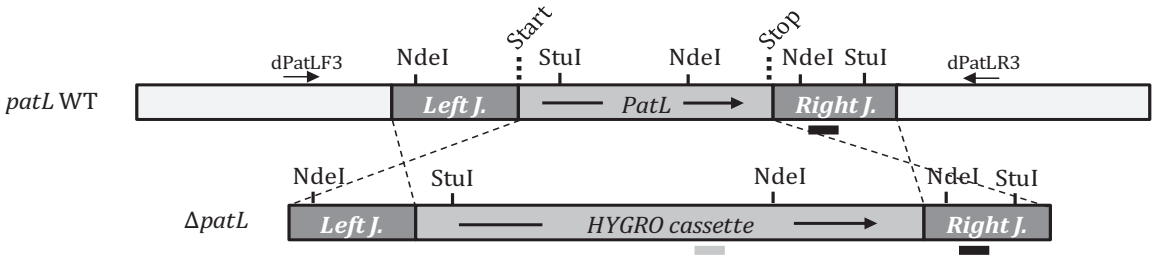


Figure 1 : Construction of Pe*ΔpatL* mutant.
Map of the *patL* WT locus and the replacement construct *ΔpatL* containing the hygromycin resistance cassette. Primers used to elaborate a PCR strategy for distinguishing between wild-type and locus integrated transformants are indicated with arrows. The direction of the arrows indicates the direction in which DNA synthesis is primed. Black bars and grey bars indicate 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.

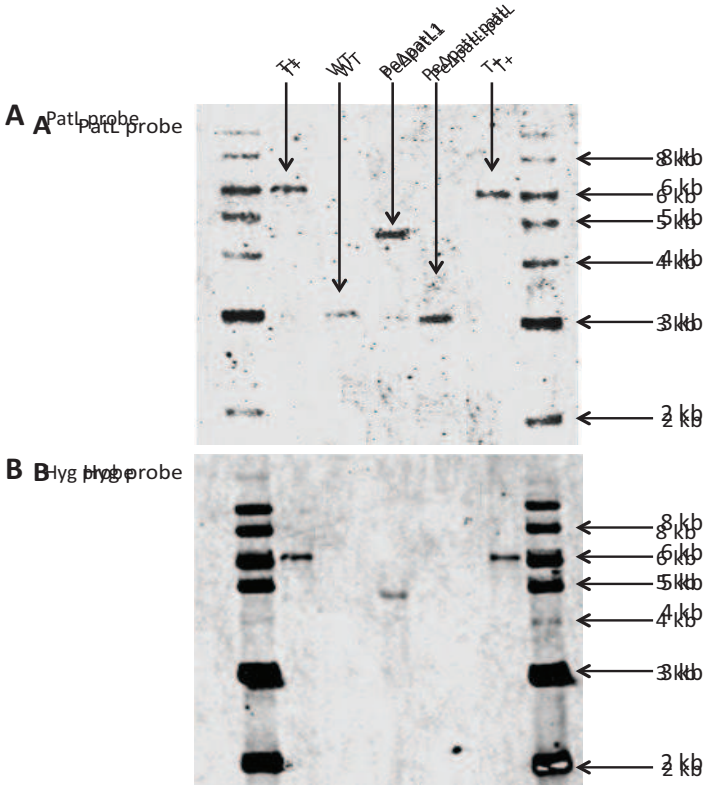


Figure 2 : Southern blot analysis of the genomic DNA of the wild-type, the Pe*ΔpatL*1 transformant and the complemented transformant Pe*ΔpatL: patL.*
DNA was digested with StuI and hybridized by the *patL* probe (A) and with the Hyg probe (B) both indicated on the map. A. The Pe*ΔpatL*1 transformant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

3.3. Effect of the *patL* gene disruption on macroscopic and microscopic morphologies

The three fungal isolates were examined macroscopically and microscopically on MEA and PDA media.

The Overall morphology of the WT and the mutant strains were very similar. No significant difference was observed between the radial growth of the PeΔ*patL*1 and the wild-type NRRL 35695 strains. After 7 days of incubation on MEA medium, the colony diameters were 39.3 ± 0.6 mm and 40 ± 1 mm for the WT and the mutant strains, respectively. Similar results were observed on PDA medium with respective colony diameters of 41.3 ± 0.6 mm and 40.5 ± 0.7 mm for the WT and the mutant strains.

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

Microscopically, both of the strain 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. Young conidia were ellipsoidal, then turned subglobose, greenish and smooth-walled (data not shown).

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

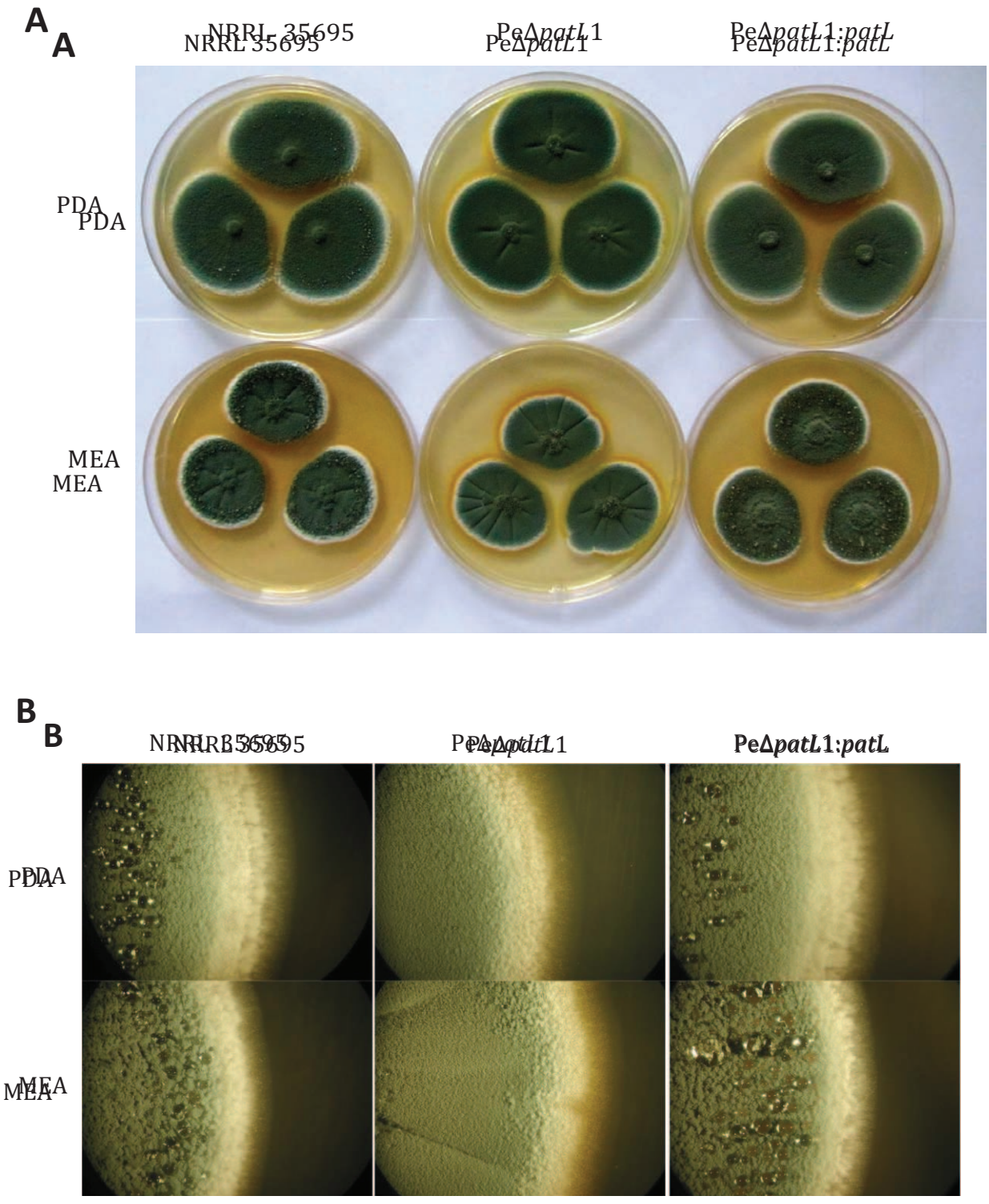


Figure 3 : Morphological aspect of NRRL 35695, PeΔ*patL*1 and complemented strains after 7 days of culture at 25°C on PDA and MEA.

A. Macroscopic aspect of colonies B. Observations under stereomicroscope (x12)

3.4. Effect of the *patL* gene disruption on patulin production *in vitro* and *in vivo* and on the growth characteristics of the fungus on apples.

The capacity to produce patulin was assessed *in vitro* by using apple based medium (APAM) and Czapek agar medium, two permissive substrates for patulin production and *in vivo* on Golden Delicious apples.

In vitro, no patulin was detected for the mutant strain Pe∆*patL*1. However, large amounts of patulin were detected in the WT and the complemented strains' cultures. After five days of incubation at 25˚C, the patulin concentrations averaged 0.098 mg/mL for the WT strain and 0.55 mg/mL for the complemented strain (Figure 4). Surprisingly, on Czapek agar medium citrinin was detected by HPLC in the mutant strain Pe∆*patL*1 extracts, however it was not detected in the WT strain extracts (Figure 5).

In vivo, the mutant strain Pe∆*patL*1 was able to cause blue mold on apples but not in the same manner as the wild-type strain. The WT and the mutant strain Pe∆*patL*1 shared the same development profile the first four days, and then a slowdown was observed for the mutant strain Pe∆*patL*1. However, the complemented strain Pe∆*patL*1: *patL* presented the same development profile as the WT strain. Growth rates were then calculated from the growth curves and in comparaison with the WT strain, the growth rate was significantly lower for the mutant strain Pe∆*patL*1 since the fourth day. No significant differences were observed between the WT and the complemented strain (Figure 6).

At the end of the incubation period, the rot volumes were determined as previously described by Baert et al. (2007). The volume of the rot in apples infected with the mutant strain was three times lower than that reported in apples infected with the WT strain and the complemented strain (Figure 7). 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. However, large amounts of patulin were detected in apples inoculated with the WT and the complemented strains. After fourteen days of incubation, the mean patulin concentration detected was of 4.9 µg per gram of apple infected with the WT strain and 11.3 µg per gram of apple infected with the complemented strain (Figure 4).

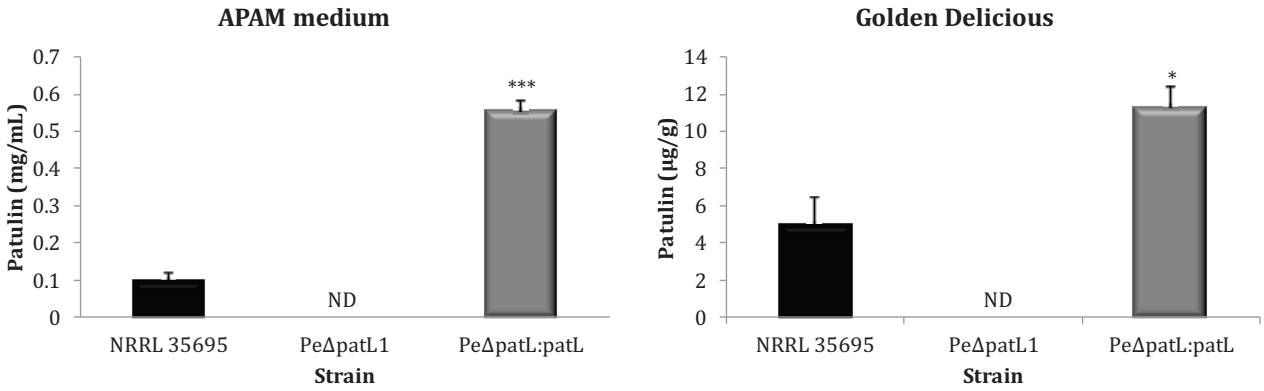


Figure 4 : Patulin production on APAM medium and on Golden Delicious apples.
Patulin production was evaluated by HPLC-DAD at 270 nm after five days on APAM medium and fourteen days on Golden Delicious. The graphs show the mean ± SEM of six replicates. Asterisks denote significant differences between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

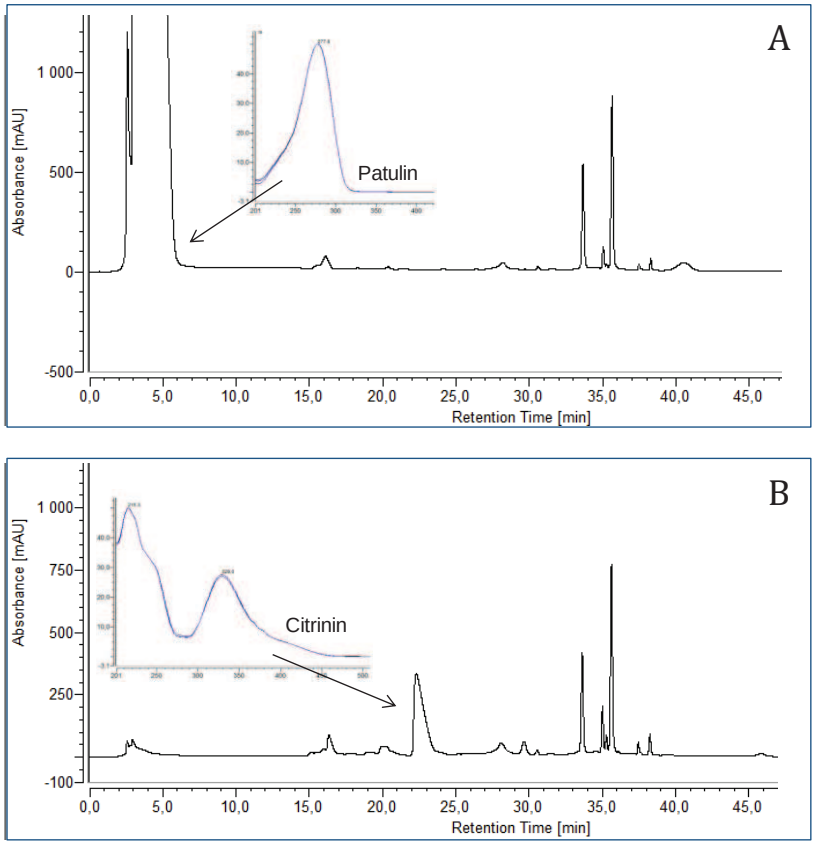


Figure 5 : HPLC analysis of the wild-type strain NRRL 35695 and the mutant strain PeΔpatL1 extracts from Czapek agar medium.
Patulin and citrinin production were evaluated by HPLC-DAD at 254 nm after ten days on Czapek agar medium at 25°C. (A) NRRL 35695 strain, (B) PeΔ*patL*1 strain.

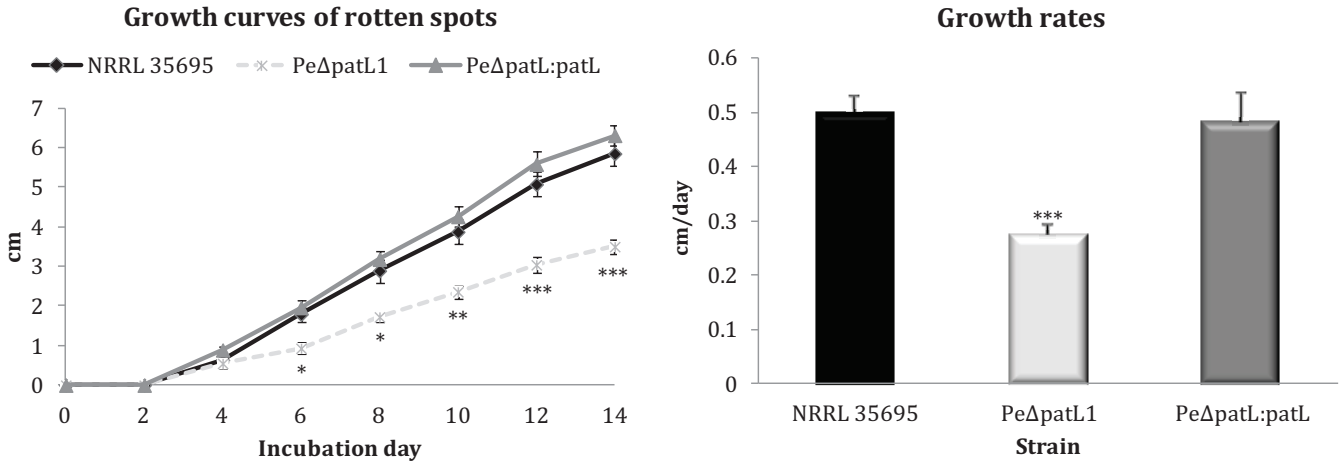


Figure 6 : Growth curves of the rotten spots and growth rates.
Golden Delicious apples were infected with each strain. Diameters of the rotten spots were measured every two days of the incubation period and growth rates were calculated. The graphs show the mean ± SEM of six replicates. Asterisks denote significant differences between the wild-type strain NRRL 35695, the mutant strain PeΔ*patL*1 and the complemented strain PeΔ*patL:patL*: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

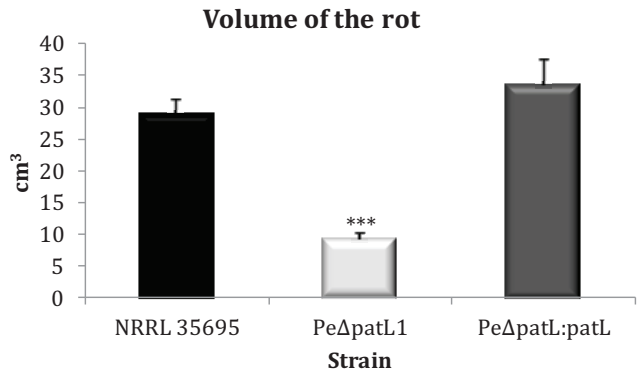


Figure 7 : Volume of the rot on Golden Delicious apples.
At the end on the incubation period the volume of the rot were calculated using the method described by (Baert et al. 2007a). The graphs show the mean ± SEM of six replicates. Asterisks denote significant differences between the wild-type strain NRRL 35695, the mutant strain PeΔ*patL*1 and the complemented strain PeΔ*patL*: *patL*: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

For the kinetics of patulin production, only the rotten parts of the apples were extracted and analyzed. In apples that were infected by the WT strain, no patulin was detected during the first three days. The patulin production started at the fourth day of the culture. Concentrations of 1.6, 4.3 and 6.3 µg/g of patulin were detected at the 4th, 5th and 6th days of the culture (Figure 8). These values are the average of three replicates for each day of the culture. The patulin production results were correlated with the development profiles of the blue mold observed on these apples; as the growth rate increases in the presence of patulin.

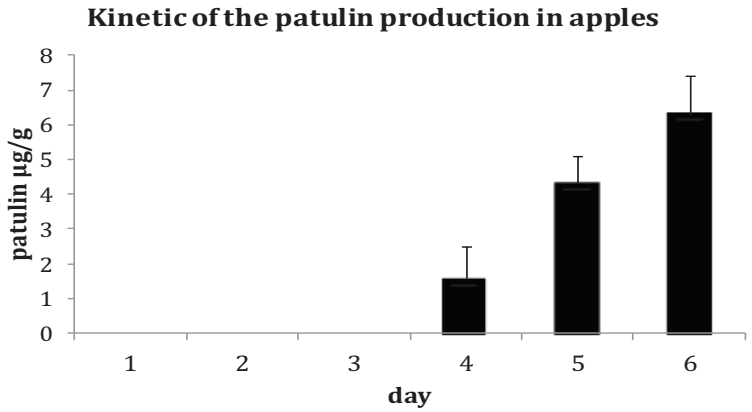


Figure 8 : Kinetic of the patulin production on apples.
At the end of each incubation day, the moldy part of each apple was extracted and patulin production was quantified by HPLC-DAD. The graphs show the mean ± SEM of three replicates.

3.5. Effect of the *patL* gene disruption on patulin gene cluster expression

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

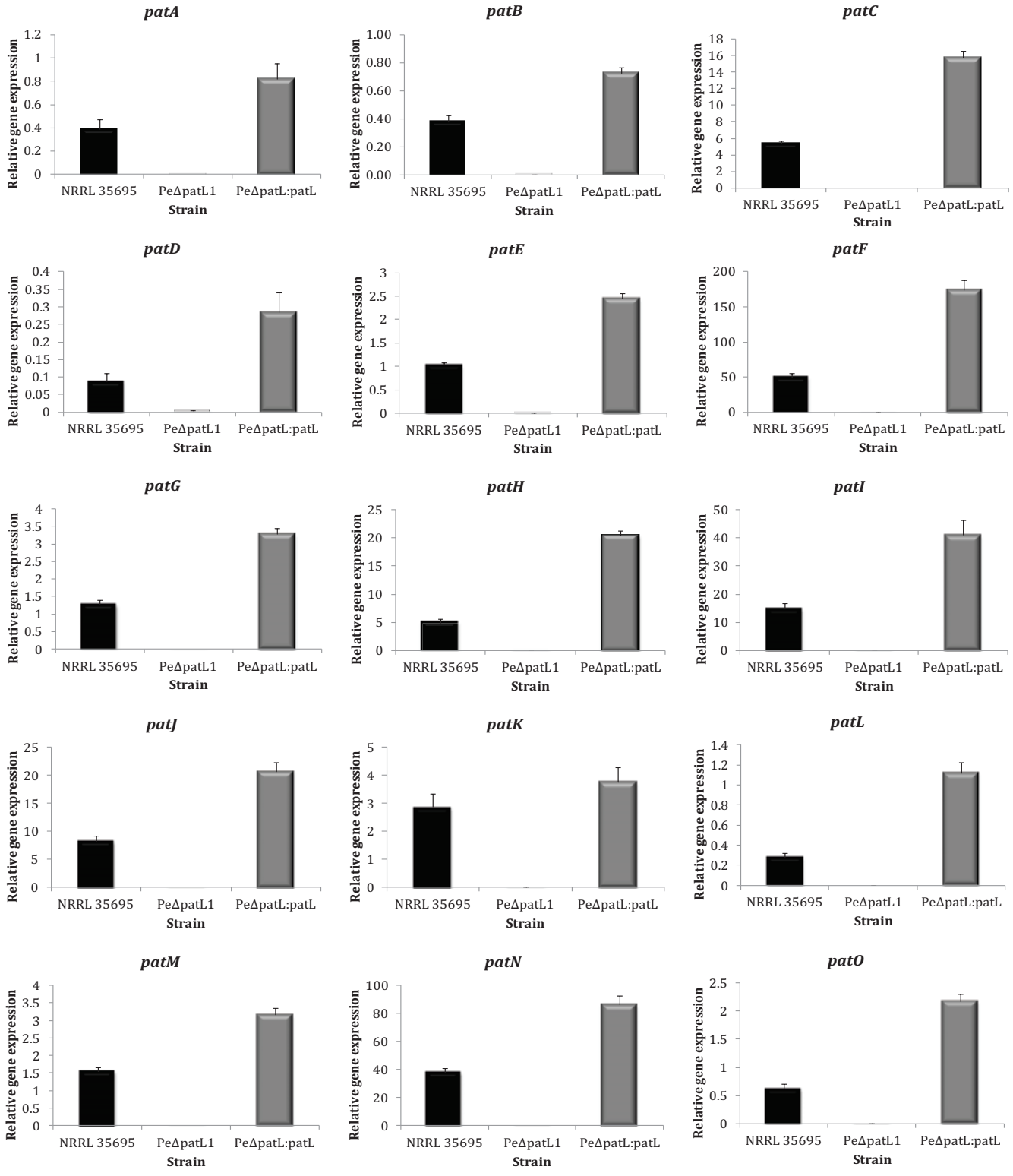


Figure 9 : Expressions of the patulin biosynthesis genes in the wild-type strain NRRL 35695, the mutant strain Pe*ΔpatL*1 and the complemented strain Pe*ΔpatL: patL.*
Values were normalized to the *β-tubulin* as reference gene. Data were represented as mean ± SEM of six replicates.

4. DISCUSSION

Although patulin is produced by different fungal species, the main producer is *Penicillium expansum*, responsible for the blue mold decay on apples. *Penicillium expansum* can infect apples before or during harvest via injuries, but symptoms like rotten spots, decays and patulin production appear during storage only.

Patulin is the final product of a succession of enzymatic reactions. Genes encoding for the patulin biosynthetic enzymes are gathered within a 40 kb gene cluster (Tannous et al. 2014). In this cluster, some genes encode enzymes directly involved in the biosynthetic pathway, while others encode transcription factors and transporters. The BLAST analysis has revealed that the *patL* gene encode a protein, which presents several characteristic patterns of Cys_6 zinc finger regulatory factors and shows a high homology with AFLR, the specific regulatory factor of the aflatoxin biosynthesis. In the mycotoxins' biosynthetic pathways, the specific transcription factor plays a role in switching between the production and non-production of the mycotoxin. The biological role of these mycotoxins has not been elucidated yet, but some studies have conferred them a role in the fungal pathogenicity during the infection process. In the study of Boddu et al. (2007), the *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides* strains, producing the highest amounts of deoxynivalenol (DON) and fumonisins, were significantly more aggressive and virulent than the other strains.

Regarding patulin, its potential role in the infection process of *P. expansum* has been recently reported by Sanzani et al. (2012). In this study, authors have disrupted the gene encoding the biosynthetic enzyme 6-MSA synthase (Pepks) in order to assess the putative role of patulin as a pathogenicity and virulence factor of *P. expansum*. Surprisingly, the generated mutant strains still produced patulin but in reduced amounts relative to the WT strain. Hence, the disease incidence and severity were less important in apples inoculated with the mutant strains in comparison with those inoculated with the WT strain. In the same study, the WT phenotype was restored by artificially adding patulin at the inoculation point. Using the RNAi (ribonucleic acid interference) technique, Barad et al. (2014) have generated *idh*-RNAi mutants, exhibiting a down regulation of the *idh* gene and consequently a reduced patulin production. In this study, a decrease of the disease incidence and severity was also noticed.

According to the definition of Yoder (1980), the pathogenicity is a qualitative term that refers to the ability of a fungus to cause a disease; while the virulence is a quantitative term that refers to the amount or the extent of the disease. In both previously referenced studies, the generated mutants

still produce patulin, and therefore it couldn't be validly concluded that patulin acts as a pathogenicity factor.

In our study, the *patL* gene encoding the specific regulatory factor of the patulin biosynthetic pathway was disrupted in order to assess the patulin's involvement in the ability of *P. expansum* to cause apple disease. The disruption of this gene engenders a lack of patulin production associated with an overall extinction of all the genes' expression within the patulin cluster. When the mutant strain was used to inoculate Golden Delicious apples, the latter did not produce patulin; however it was able to induce the disease similarly to the WT strain during the first four days of incubation. A slowdown was subsequently observed for the rotten spot development rate on the apples infected by the mutant strain. The rate at which the rotten spots appeared was strongly correlated to the patulin production. Prior to patulin production, the WT and the mutant strains shared the same development profiles; however an accelerated development of the rotten spot was noticed for the WT strain briefly after the initiation of patulin production. Based on these results, patulin could be considered as a virulence factor but not as a pathogenicity factor.

The importance of mycotoxins in the pathogenicity and virulence of the fungus has already been described for other fungal species. The deoxynivalenol (DON) produced by *Fusarium graminearum* has been proven to be essential for the disease severity but not for the initial infection of wheat ears (Bai et al. 2001). Another well studied example is that of fumonisins. Numerous studies agreed on the involvement of these mycotoxins in the development of the disease in maize (Desjardins et al. 1995; Desjardins et al. 1998; Desjardins et al. 2002). In fact, non-producing strains were not able to induce lesions on leaves and did not affect the root development and stem height. On the contrary, fumonisins producing strains caused a dose-dependent reduction of the root and stem development and necrotic lesions on leaves (Williams et al. 2007; Glenn et al. 2008). In the above cases, DON is only a virulence factor while fumonisins are both pathogenicity and virulence factors.

In the present study, important morphological changes were noticed between the WT and the *patL* deficient strains. Exudate was only produced by the WT strain and contained patulin. Two major hypotheses may be advanced; the first one is that the gene *patL* could encode a global transcription factor although it is located within the patulin biosynthetic gene cluster. This hypothesis is supported by the fact that the *tri6* gene in *Fusarium graminearum* located in the trichothecene gene cluster regulates not only the genes within the cluster but also other genes involved in the growth and development of this phytopathogen localized outside the cluster (Seong et al. 2009; Nasmith et al. 2011) The second hypothesis is that patulin may have an important

influence on the development of *P. expansum*. However, no previous studies have demonstrated the involvement of mycotoxins in the fungal development, thus the first hypothesis seems more likely.

This study was performed on one apple cultivar only. It will be interesting to assess the role of patulin in the pathogenicity and virulence of *P. expansum* on other apples varieties. It is possible that the sugar and phenolic compounds composition of apples influence the development of the disease. Therefore, some cultivars may be more resistant to the infection and patulin could then be identified as 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*." Molecular Plant-Microbe Interactions **27**(1): 66-77.

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.

Coleman, J. E. (1992). "Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins." Annual Review of Biochemistry **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." Proceedings of the National Academy of Sciences **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 and Infection **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." Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression **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." Applied and Environmental Microbiology **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 Genetic and Biology **21**(1): 17-29.

Keller, N. P., G. Turner and J. W. Bennett (2005). "Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics." Nature Reviews Microbiology **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." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **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 and Cosmetics Toxicology **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 Genetics and Biology **48**(3): 275-84.

Moake, M. M., O. I. Padilla-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. Marín, 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*." Applied and Environmental Microbiology **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*." Applied and Environmental Microbiology **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." Applied and Environmental Microbiology **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 Pathogens **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 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.

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.

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 and Chemical Toxicology **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." Applied and Environmental Microbiology **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.

Yao, C., W. S. Conway and C. E. Sams (1996). "Purification and characterization of a polygalacturonase produced by *Penicillium expansum* in apple fruit." Phytopathology **86**(11): 1160-1166.

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." 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

SUPPLEMENTARY MATERIAL

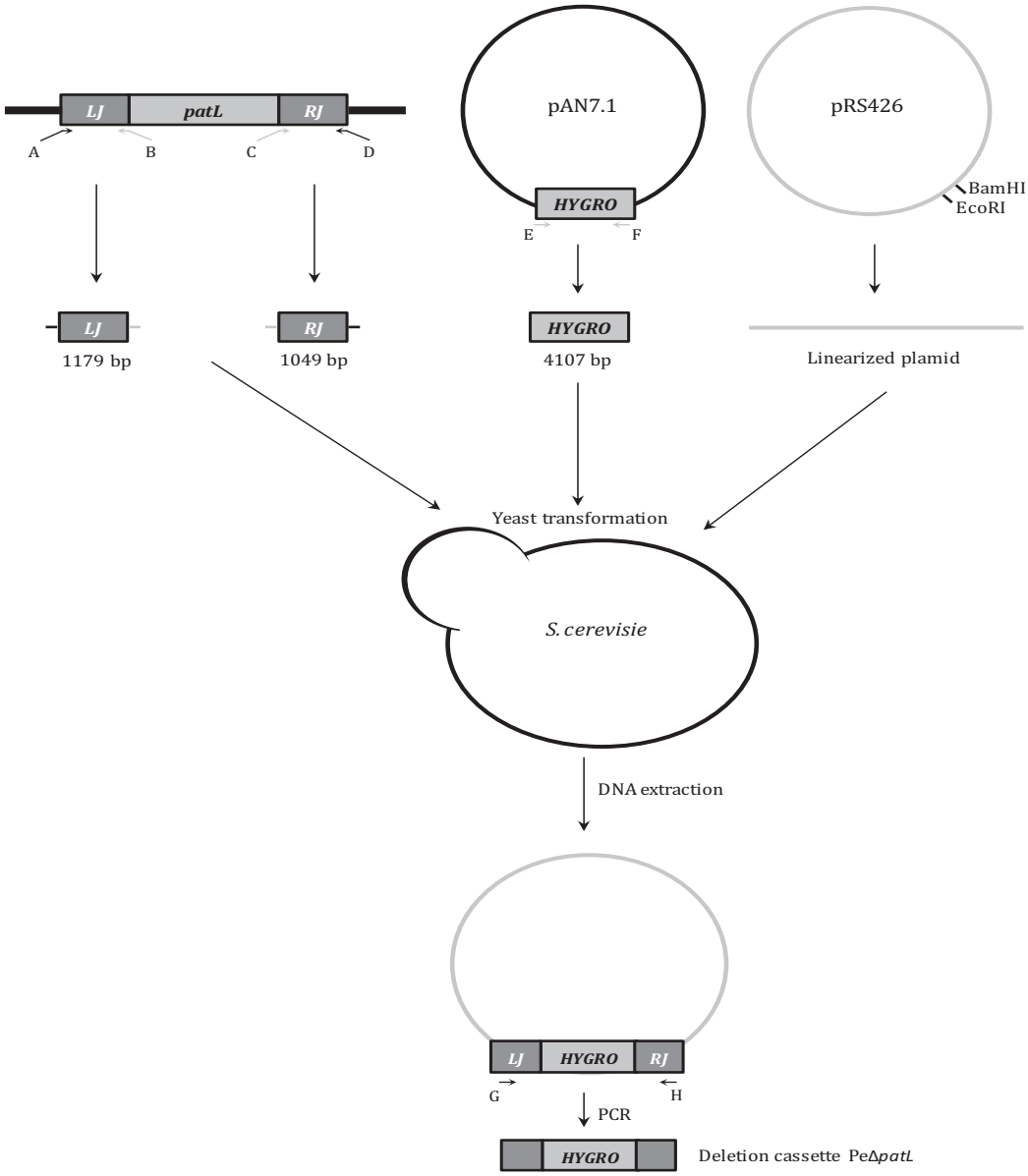


Figure S1: Strategy employed to construct the deletion cassette Pe*ΔpatL*.
The left junction and the right jonction (RJ) were amplified from the wild-type stain. Primers A and D 5'-extremities are identical to the extremities of the pRS426 cloning vector. Primers B and C 5'-extremities are identical 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 amplify the deletion cassette Pe*ΔpatL* 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.

3.1.3. Analyses complémentaires à l'étude : Etude de l'implication de la patuline dans la virulence de *P. expansum* sur d'autres variétés de pommes

I. Objectifs et problématique

Au sein de la filière « pomme » qui est la plus concernée par la contamination par la patuline, l'évaluation de l'impact du facteur « variété » à la fois sur la sensibilité du fruit au champignon que sur l´accumulation de patuline a éveillé, ces dernières années, l´intérêt d´un certain nombre de chercheurs (Marin et al. 2006; Salomao et al. 2009; Menniti et al. 2010).

Lors de notre première expérimentation effectuée sur des pommes de la variété Golden Delicious ayant pour but d'infirmer ou confirmer l'implication de la patuline dans le processus d'infection des pommes par *P. expansum*, il a été démontré que cette toxine agit plus précisément comme un facteur de virulence et non comme un facteur de pathogénicité. Effectivement, l'absence de la patuline dans les pommes infectées par la souche de *P. expansum* déficiente due à la délétion du gène *patL* (PeΔ*patL*1), n'a pas empêché l'apparition des taches brunes sur le fruit. En contrepartie, un ralentissement significatif du développement de la pourriture sur ces pommes infectées par la souche déficiente a été observé à partir du quatrième jour de l'infection en comparaison avec les pommes infectées par la souche sauvage productrice de patuline (NRRL 35695). Ces résultats ont révélé que la production de patuline n'est donc pas indispensable pour le déclenchement de la maladie sur les pommes mais favorise *a posteriori* la progression du développement de l'infection.

L'objectif de cette partie complémentaire était donc de reproduire cette expérimentation sur d'autres variétés de pommes, pour vérifier si les résultats retenus sur la variété Golden Delicious quant à la résistance de cette dernière à l'invasion de *P. expansum* en absence de patuline, pourraient être généralisés pour les autres variétés de pommes.

II. Matériels et Méthodes

a. Souche fongique

Le matériel fongique utilisé dans ces analyses était constitué de deux souches de *P. expansum* ; la souche sauvage productrice de patuline (*P. expansum* NRRL 35695), et la souche incapable de produire de la patuline (PeΔ*patL*1), générée au cours de ce travail par mutation ciblée du gène *patL* (les détails relatifs à la génération de la souche mutante sont fournis à la publication ci-avant).

b. Matériel végétal

Cinq variétés de pommes de table (à couteau) parmi les plus commercialisées sur le marché français et neuf variétés de pommes à cidre ont fait l'objet de ces analyses. Pour les pommes de table, il s'agit des variétés : Pink Lady, Ariane, Granny Smith, Reinette grise du Canada et Braeburn. Ces pommes ont été collectées dans un supermarché à Toulouse, inspectées visuellement et trouvées exemptes de toute blessure ou attaque physique. Pour les pommes cidricoles, les variétés testées sont : Douce Moën, Marie Ménard, Douce Coët Ligné, Saireline, Binet Rouge, Bedan, Frequin Rouge, Avrolles et Petit Jaune. Ces pommes ont été fournies par l'Institut Français des Productions Cidricoles (IFPC) (Sées, France) et analysées dans un délai de 7 jours à compter de la réception.

c. Préparation de l'inoculum et infection des pommes

Chaque souche de *P. expansum* a d'abord été cultivée sur milieu PDA. Les mycéliums âgés de 7 jours ont servi à la préparation des suspensions conidiennes. Le nombre de spores a été évalué à l'aide d'une cellule de numération de Malassez et les suspensions de spores ont par la suite été ajustées à une concentration de 10^4 spores/mL.

La stérilisation des pommes a été faite par immersion pendant deux minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium (2 %). L'inoculum ainsi préparé a servi à l'infection de trois pommes de chaque variété par injection stérile de 10 µL de cette suspension à une profondeur de 0,5 cm (Sanzani et al. 2012). Les pommes inoculées sont maintenues à la température de 25 ± 1 °C. Par ailleurs, le pH des différentes variétés de pommes a été mesuré avant inoculation en utilisant un pH-mètre avec électrode spécialement dédiée aux produits alimentaires semi-solides (Hanna instruments, Tanneries, France). Un *triplicata* de chaque variété de pomme a systématiquement servi aux mesures de pH, en pratiquant quatre mesures dans la pulpe du fruit, pratiquement au même endroit comme précisé dans la Figure 10.

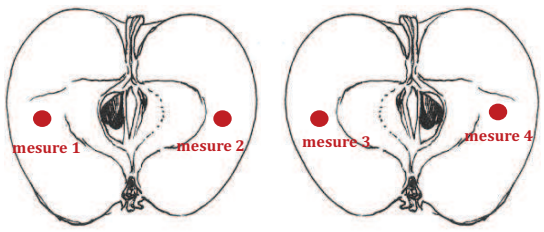
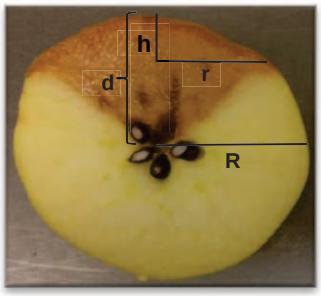


Figure 10 : Schéma de la mesure du pH des pommes à l'aide du pH-mètre à électrode spécialement conçue pour la mesure du pH des produits alimentaires.

d. Estimation des lésions brunes et des volumes de pourriture

La gravité de la maladie des pommes a été évaluée sur deux critères : (i) le développement des lésions brunes à la surface du fruit et (ii) le volume de pourriture qui reflète l'altération en profondeur. Le premier critère a été estimé par une mesure régulière de deux diamètres perpendiculaires des lésions brunes, ce qui permet de calculer la vitesse de développement radiale de ces lésions comme étant la pente des courbes de développement. La pourriture qui progresse vers l'intérieur de la pomme est déterminée par le calcul du volume de pourriture en appliquant la formule (1) empruntée à Baert et al. (2007a). La Figure 11 montre les différentes variables de la formule.



$V_{pourriture} = V_{segment\ de\ la\ sphère} + V_{cône}$

$$V_{pourriture} = \frac{\pi . h(3r^2 + h^2)}{6} + \frac{\pi . r^2(d - h)}{3} \quad \textbf{(1)}$$

Avec :
h, hauteur du segment de sphère = $R - \sqrt{(R^2 - r^2)}$
r, rayon du cône de la pourriture
R, rayon de la pomme (somme des deux diamètres de la pomme divisé par 4)
d, profondeur de la pourriture

Figure 11 : Photo montrant le tissu infecté d'une pomme avec les différentes variables utilisées pour le calcul du volume de la pourriture.
La pomme est considérée comme une sphère parfaite et le tissu infecté est divisé en un segment de sphère et de cône. Le volume de la pourriture est égal à la somme des volumes de ces deux segments.

e. Extraction et dosage de la patuline

La technique utilisée pour l'extraction de la patuline des différents échantillons de pommes a été celle préconisée par MacDonald et al. (2000). A partir des broyats de pommes entières, une prise d'essai de 10 g a été incubée toute la nuit à température ambiante avec 150 µL de pectinase provenant *d'Aspergillus aculeatus* (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) et 10 mL d'eau. Après incubation, le surnageant est recueilli par une centrifugation de 5 min à 4500 g et macéré dans 50 mL d'acétate d'éthyle pendant un jour. Par la suite, la phase organique a été récupérée et concentrée sous vide à l'aide d'un rotavapor (Büchi, Suisse) ensuite évaporée à sec dans un Turbovap (McKinley Scientific, Sparta, NJ, United States). L'extrait sec a été repris dans 300 µL d'un mélange méthanol-eau (80/20 ; v/v) pour réaliser les analyses en HPLC.

III. Résultats

a. Évaluation de la résistance des variétés de pommes au développement des lésions brunes en surface et en profondeur

Comme le montre la Figure 12, des différences significatives sur les diamètres de lésions atteints après deux semaines d'incubation à 25˚C ont été observées sur les variétés de pommes de table, Pink Lady et Ariane, entre les pommes infectées par la souche sauvage NRRL 35695 et celles infectées par la souche mutante PeΔ*patL*1. En ce qui concerne les pommes cidricoles, sept variétés sur neuf ont montré des lésions de pourriture nettement moins développées sur les pommes infectées par la souche mutante. Seules les variétés Douce Coët Ligné et Binet Rouge, n'ont pas montré de différences perceptibles sur les diamètres des lésions produites par la souche sauvage et la souche mutante (Figure 12H et J). Néanmoins, pour toutes les conditions expérimentales testées, le développement radial de ces lésions s'est avéré linéaire entre le 2ème et le 14ème jour d'incubation (Figure 13A-N). Les vitesses auxquelles se propagent ces lésions ont été calculées comme étant les pentes de la partie linéaire des courbes de développement des lésions brunes. Sur ce point, c'est toujours les variétés Pink Lady et Ariane qui ont présenté un ralentissement de la progression des lésions brunes induites par la souche PeΔ*patL*1 (Figure 13A-B), cette différence étant plus marquée sur la variété Pink Lady, où la vitesse de développement des lésions était réduite de moitié (Figure 13A). Concernant les pommes à cidre, aucune différence significative en termes de vitesse de développement des lésions brunes n'a été observée sur les variétés : Douce Coët Ligné, Binet Rouge, et Bedan (Figure 13H, J et K). Des différences légèrement significatives ont été observées sur les variétés : Douce Moën et Marie Ménard (Figure 13F et G). Par contre, le ralentissement de développement des lésions en absence de patuline s'est avéré être très prononcé sur les quatre variétés : Saireline, Frequin Rouge, Avrolles et Petit Jaune (Figure 13 I, L-N).

Les aspects de la maladie ont été également observés en termes de volume de pourriture. A ce niveau, les mêmes variétés de pommes de table, Pink Lady et Ariane, ont répondu différemment à l'infection par les deux souches. Sur ces deux variétés, l'infection par la souche PeΔ*patL*1 a été associée à une réduction significative des volumes de pourriture par confrontation aux résultats obtenus par la souche sauvage. En contrepartie, les pommes des variétés Granny Smith, Braeburn et Reinette grise du Canada n'ont pas montré de différences significatives sur tous les paramètres testés, entre les pommes infectées par la souche sauvage et celles infectées par la souche mutante (Figure 13C-E).

Sur les volumes de pourriture, c'est toujours les mêmes variétés cidricoles : Douce Coët Ligné, Binet Rouge et Bedan, qui n'ont pas souligné de différences significatives en termes de résistance vis-à-vis des deux souches (mutante et sauvage) (Figure 13H, J-K). Une diminution prononcée des volumes de pourriture a été observée sur la variété Saireline infectée par la souche mutante ; mais ces différences sont statistiquement non significatives (au seuil de 5 %) (Figure 13I). La différence la plus significative a été soulignée sur la variété Avrolles (Figure 13 M).

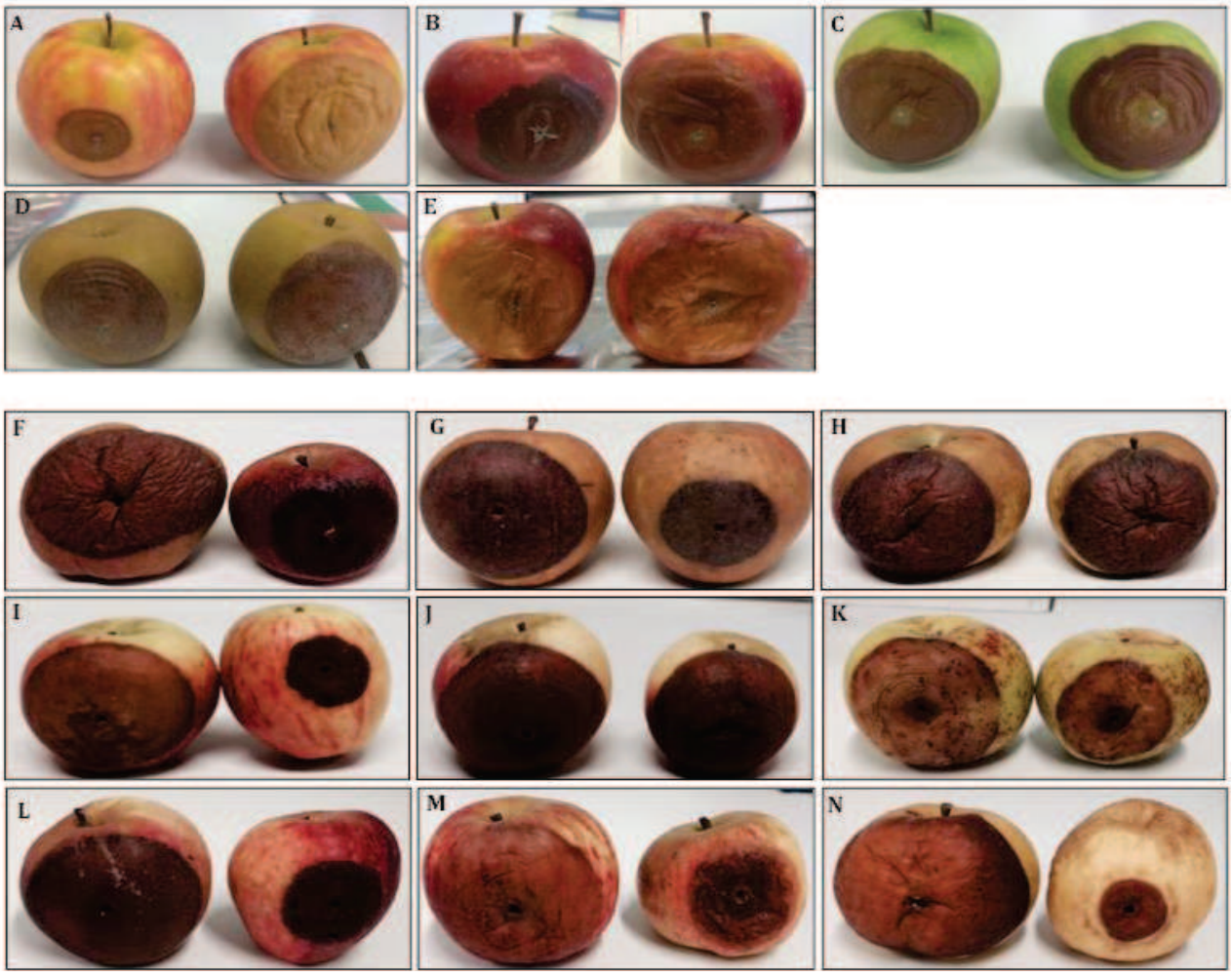


Figure 12 : Lésions dues à la pourriture bleue sur différentes variétés de pommes infectées par la souche sauvage de *Penicillium expansum* NRRL 35695 et la souche mutante PeΔ*patL*1.
Les variétés de pommes testées sont : A, Pink Lady ; B, Ariane; C, Granny Smith ; D, Reinette grise du Canada ; E, Braeburn ; F, Douce Moën ; G, Marie Ménard; H, Douce Coët Ligné ; I, Saireline ; J, Binet Rouge ; K, Bedan ; L, Frequin Rouge; M, Avrolles ; N, Petit Jaune. (Gauche), pommes infectées par la souche sauvage; (Droite), pommes infectées par la souche mutante. Les photos ont été prises après 2 semaines d'incubation à 25˚C.

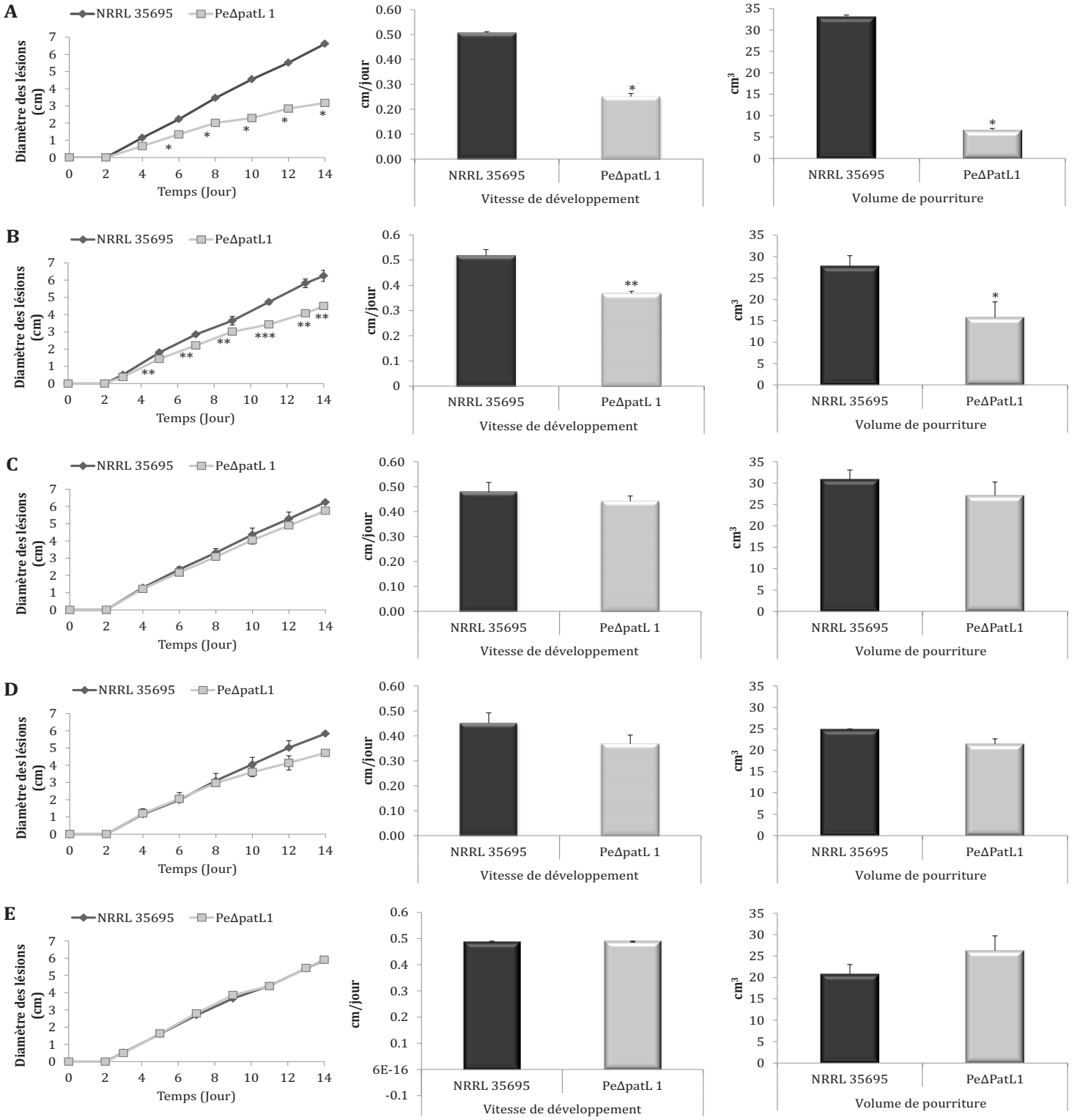


Figure 13 : De gauche à droite : Graphiques montrant l'évolution régulière des lésions brunes, Histogrammes montrant les vitesses de développement de ces lésions brunes et les volumes de pourriture pour les différentes variétés de pommes à couteau infectées par la souche sauvage de *P. expansum* (NRRL 35695) et la souche mutante (PeΔ*patL*1).
Les variétés de pommes testées sont : A, Pink Lady; B, Ariane; C, Granny Smith; D, Reinette Grise du Canada; E, Braeburn ; F, Douce Moën; G, Marie Ménard; H, Douce Coët Ligné; I, Saireline; J, Binet Rouge; K, Bedan; L, Frequin Rouge; M, Avrolles et N, Petit Jaune. Les barres d'erreur représentent l'écart-type (SEM) sur la moyenne de trois mesures avec les seuils de significativité suivants : p<0,05=* ; p <0,01=** et p<0,001=***.

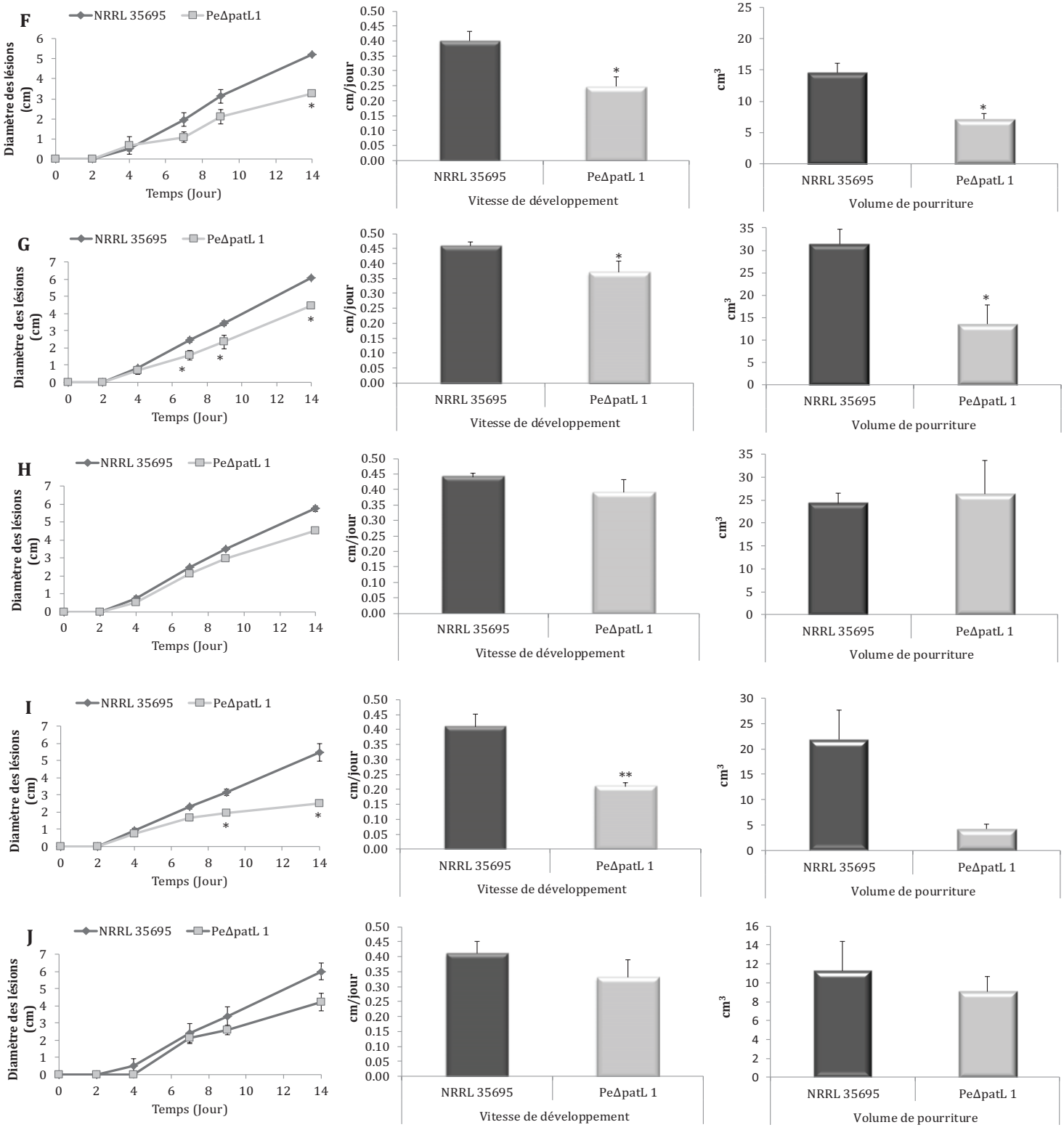


Figure 13 (SUITE)

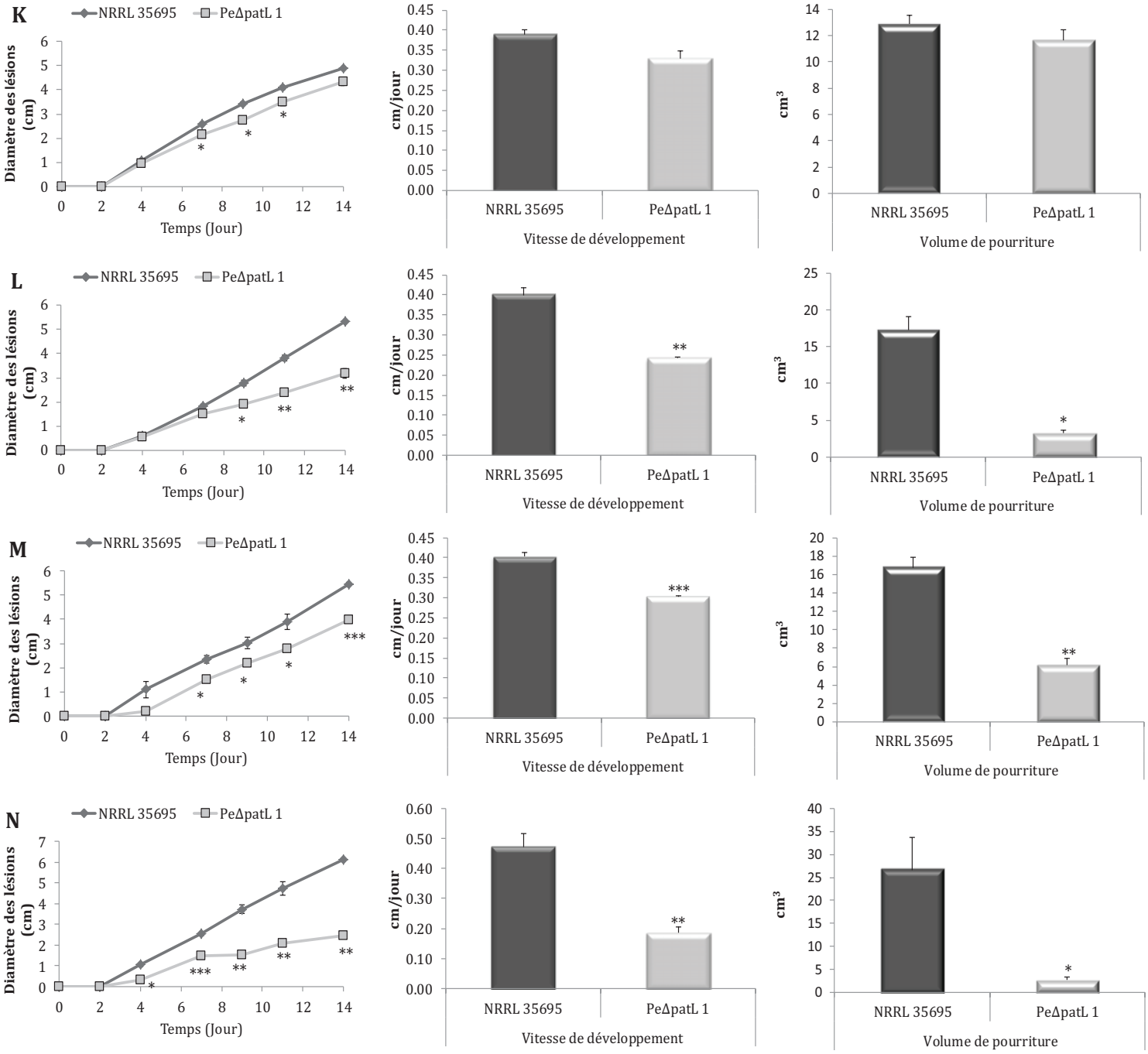


Figure 13 (SUITE)

b. Analyse de la production de patuline dans les pommes

Les analyses de la production de patuline dans les pommes ont fourni les résultats attendus. Toutes les pommes infectées par la souche mutante PeΔ*patL*1 étaient exemptes de patuline (Figure 14). En revanche, les pommes infectées par la souche sauvage NRRL 35695 ont montré des teneurs plus ou moins importantes en patuline, ainsi qu'une disproportion entre une variété et l'autre. Les variétés de pommes à couteau Ariane et Braeburn ont souligné les teneurs en patuline les plus importantes, alors que les variétés Granny Smith et Reinette grise du canada ont été les moins propices à la production de patuline par *P. expansum* avec des teneurs de patuline qui étaient de l'ordre de 2 µg/g de pomme après de 2 semaines d'incubation (Figure 14). En ce qui concerne les pommes à cidre, la variété Marie Ménard a été la plus favorable à la production de patuline par la souche sauvage NRRL 35695 (37,386 µg/g de pomme), suivie par la variété Frequin Rouge (15,439 µg/g de pomme). Les deux variétés Saireline et Binet Rouge ont souligné des teneurs en patuline similaires de l'ordre de 9 µg/g de pomme. Les variétés restantes ont été significativement moins propices à la production de patuline par *P. expansum* avec des teneurs de patuline qui étaient de l'ordre de 2 µg/g de pomme.

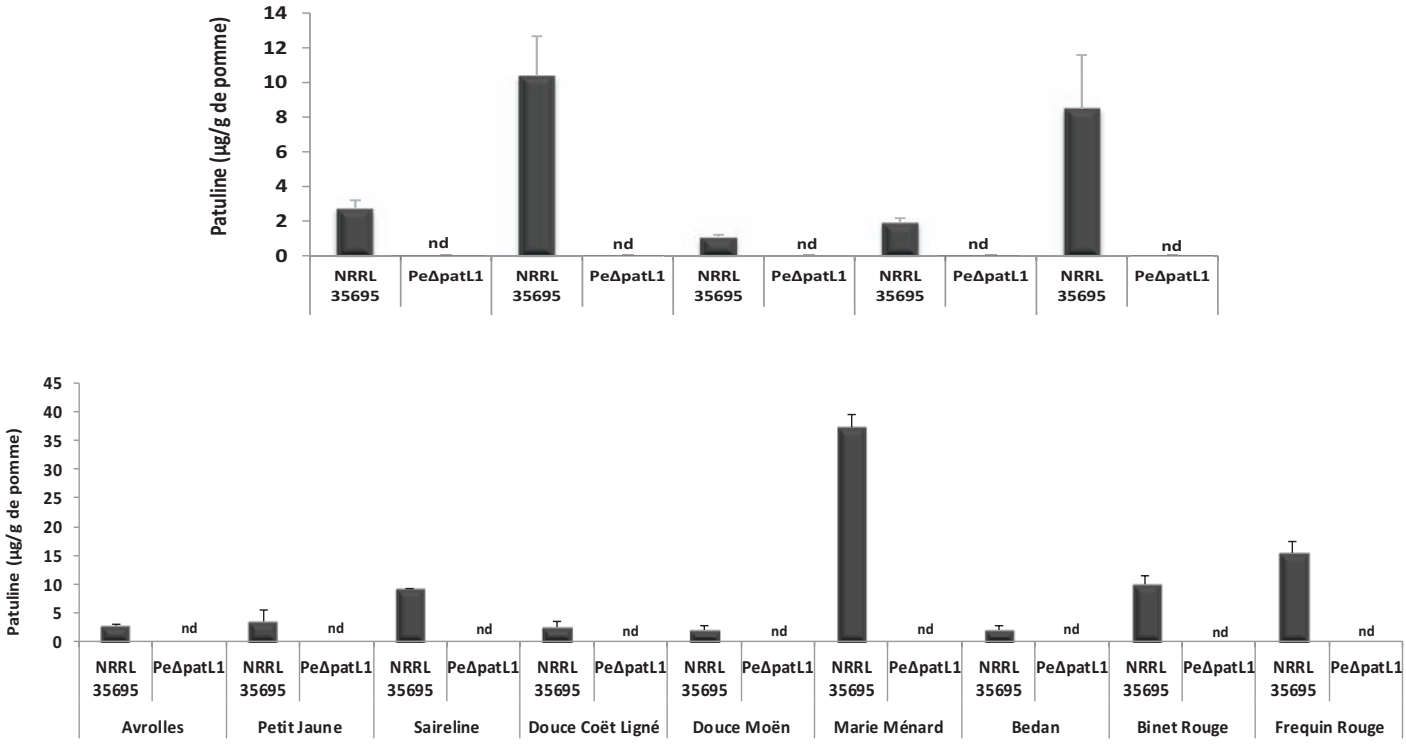


Figure 14 : Teneurs en patuline exprimées en µg/g de pommes dans les différentes variétés de pommes infectées simultanément par la souche sauvage de *P. expansum* NRRL 35695 et la souche mutante PeΔ*patL*1.
Les barres d'erreur représentent l'écart type sur la moyenne de trois mesures (SEM). nd signifie non-détecté

c. Analyse de pH des différentes variétés de pommes

Pour pouvoir comparer les niveaux d'acidité des différentes variétés de pommes étudiées, des mesures pH-métriques ont été effectuées avant l'inoculation. L'analyse des résultats de la mesure du pH (Tableau 2) montre que toutes les variétés de pommes de table ont des valeurs de pH qui s'échelonnent dans l'intervalle 3,1< pH < 3,75. La variété Ariane était la moins acide avec un pH moyen de l'ordre de 3,75, suivie par la variété Braeburn présentant un pH moyen de 3,6. Néanmoins, la variété Granny Smith est dotée du pH moyen le plus bas (3,10) et donc l'acidité la plus élevée. La plupart des variétés cidricoles présentent des valeurs de pH plus élevées que les pommes de table, s'échelonnant en moyenne entre 3,8 et 4,3. Seules les variétés Avrolles et petit Jaune sont dotées d'un pH très acide (3,1-3,3 et 3,15-3,55, respectivement).

Tableau 2 : pH moyen des différentes variétés de pomme.
Le pH est établi à partir de 4 mesures par pomme (N=3). Les pH des variétés cidricoles sont présentés en gras. Le pH de la variété Golden Delicious, utilisée au cours de notre étude précédente (Snini et al. non publié), est surligné en gris.

Variété de pomme	pH
Pink Lady	3,5-3,7
Ariane	3,6-3,9
Granny Smith	3,04-3,16
Reinette du Canada	3,3- 3,5
Braeburn	3,5-3,7
Douce Moën	**4- 4,1**
Marie Ménard	**3,9- 4,1**
Douce Coët Ligné	**3,8- 4,1**
Saireline	**4- 4,3**
Binet Rouge	**3,8- 4,2**
Bedan	**4- 4,2**
Frequin Rouge	**3,9-4,1**
Avrolles	**3,1-3,3**
Petit Jaune	**3,15-3,55**
Golden Delicious	3,4- 3,5

d. Discussion

Une première analyse de l'ensemble de données obtenues dans cette étude a révélé des teneurs en patuline qui varient considérablement entre les différentes variétés de pomme infectées par la même souche de *P. expansum* NRRL 35695. La confrontation de ces résultats avec les données de pH respectives, révèle une forte association entre le facteur pH et l'accumulation de patuline par ce champignon chez les variétés de pommes à couteau. A ce niveau, les deux variétés de pommes Granny Smith et Reinette grise du Canada qui étaient les plus acides avec des pH moyens respectives de 3,10 et 3,43 ; ont présenté des teneurs en patuline les plus basses. Cependant, les variétés Ariane et Braeburn sur lesquelles le champignon a produit les quantités de patuline les plus importantes (10,36 et 8,47 µg/g de pomme, respectivement), étaient les moins acides avec des pH respectives de 3,75 et 3,63. Finalement, les variétés Golden Delicious et Pink Lady présentant des valeurs de pH très voisines (Tableau 2), n'ont pas montré de différences significatives en termes de quantités de patuline produites par la souche sauvage de *P. expansum* (une moyenne de 4,9 µg/g dans les pommes Golden Delicious (Snini et al. non publié) et 2,77 µg/g dans les pommes Pink Lady). En contrepartie, cette association entre le pH du fruit et la production de patuline n'est pas complètement avérée dans le cas des pommes à cidre. Les variétés Avrolles et petit Jaune présentant les pH les plus faibles (3,1-3,5) ont montré des teneurs en patuline relativement basses. Les variétés les moins acides (pH 3,8-4,3), Saireline, Marie Ménard, Binet Rouge et Frequin Rouge ont souligné des teneurs en patuline importantes. Cependant, les variétés Douce Moën, Douce Coët Ligné et Bedan présentant aussi des pH avoisinant 4 étaient significativement moins propices à la production de patuline par *P. expansum*.

Cette observation d'une différence d'accumulation de patuline entre les variétés de fruits n'est pas nouvelle. A ce propos, Marin et al. (2006) avaient déjà montré que la variété de pomme était le principal facteur impactant la teneur en patuline. Cependant, en contradiction avec nos résultats, les auteurs soulignent dans leur étude une accumulation de patuline nettement plus élevée dans les pommes Golden Delicious que dans les pommes Fuji, attribuée au fait que ces dernières étaient moins acides. Ce même résultat a été reproduit par Morales et al. (2008b) en incubant ces mêmes variétés de pommes à une température de 1˚C. Par contre, quand ces deux variétés de pommes ont été stockées à une température de 20˚C, avoisinant la température adaptée dans notre étude, les pommes Fuji qui sont les moins acides, ont présenté les teneurs en patuline les plus élevées, suivies par les pommes Golden Delicious. Ces résultats révèlent alors que le pH des pommes n'est pas toujours le facteur déterminant de la production de patuline. Il est clair que cette

production est le fruit d'une synergie entre plusieurs caractéristiques intrinsèques du fruit et d'autres extrinsèques liées à l'environnement.

Cette étude complémentaire a mis en exergue une sensibilité diversifiée des variétés de pommes testées, à l'attaque de *P. expansum*. A l'instar des pommes Golden Delicious, les variétés Ariane et Pink Lady ont été les plus résistantes à l'attaque par ce champignon en absence de patuline, rapporté précédemment comme un facteur de virulence (Snini et al, non publié). En revanche, aucune influence significative de la présence de patuline n'a été observée pour les trois autres variétés de pommes de table testées, qui ont montré un développement des lésions brunes comparable en absence et en présence de la toxine. Ce phénomène observé est certainement associé aux caractéristiques intrinsèques du fruit, sachant que toutes les pommes testées ont été incubées sous les mêmes conditions environnementales extrinsèques (T°, composition atmosphérique, obscurité et autres). A ce niveau, il est évident de noter que la pomme est un mélange complexe de molécules telles que les pectines, les sucres, les différents acides ainsi que les différents composés phénoliques (Hecke et al. 2006). Chez les végétaux, le profil polyphénolique varie considérablement selon l'espèce, la variété, l'organe considéré, le stade physiologique et les conditions pédoclimatiques (Scalbert and Williamson 2000). Par ailleurs, la proportion et la diversité des composés phénoliques dans les variétés de pommes a été largement documentée (Pérez-Ilzarbe et al. 1991; van der Sluis et al. 2001; Hecke et al. 2006; Carbone et al. 2011; Thompson-Witrick et al. 2014). Ces composés sont réputés pour posséder de nombreuses propriétés bioactives intéressantes qui trouvent des applications dans divers domaines de la science, à savoir en médecine, pharmacie et nutrition. Outre leur pouvoir antioxydant, antiradicalaire et anti-inflammatoire, ces molécules phytochimiques sont pourvues d'une activité antimicrobienne à large spectre. A cet égard, elles sont depuis longtemps associées aux réactions de défense passives et actives développées par les végétaux à la suite de l'attaque de ces derniers par des microorganismes saprophytes (Nicholson and Hammerschmidt 1992; Sarni-Manchado and Cheynier 2006).

De nombreuses études ont mis en valeur le rôle crucial des composés phénoliques dans la protection des aliments face à l'invasion d'espèces fongiques. Torres et al. (2003) avaient suggéré l'efficacité de l'application des antioxydants pour le contrôle de la croissance de *Fusarium verticillioides* et *Fusarium proliferatum* ainsi que la production des fumonisines dans le maïs. Ce résultat fut plus tard reproduit par Samapundo et al. (2007a), quand une augmentation de la

concentration d'acide caféique et d'acide vanillique avait entraîné une diminution de la vitesse de croissance de ces deux mêmes espèces de *Fusarium*, accompagnée d'une réduction significative de la production de fumonisine B1 et d'aflatoxine B1. Dans le même contexte, la présence des extraits phénoliques dans un milieu de culture favorable à la croissance des champignons, s'est avéré très efficace dans l'inhibition de la croissance des trois espèces de champignons *Alternaria solani, Botrytis cinerea* et *Fusarium culmorum* (Winkelhausen et al. 2005). L'effet protecteur des composés phénoliques a été également étudié pour limiter le développement des champignons du genre *Penicillium*. Une étude *in vitro* d'Ortuño et al. (2006) a révélé que ces composés peuvent évidemment agir comme des agents antifongiques contre *Penicillium digitatum,* agent pathogène des agrumes. Cette étude a suggéré une participation éventuelle de ces composés phénoliques dans le mécanisme de défense des différentes espèces du genre *Citrus* contre *P. digitatum*.

L'effet protecteur des composés phénoliques a été également mis en évidence contre la production de patuline. Une inhibition complète de cette production par l'espèce *P. expansum* a été observée sur un milieu Czapek glucose-pomme, supplémenté de 0,2 % d'huile de citron, source de polyphénols naturels (Hasan 2000). Cette constatation faite *in vitro* a récemment été corroborée par une étude de Salas et al. (2012). En examinant l'effet de 10 flavonoïdes sur la production de patuline par *P. expansum* sur un milieu agar à l'extrait de malt (MEA), ces derniers ont révélé une réduction de production à 98 %. Dans la seule étude *in vivo* réalisée sur l'espèce *P. expansum* en vue d'évaluer l'efficacité d'une application exogène de composés phénoliques sur la croissance de cette espèce et l'accumulation de patuline, Sanzani et al. (2009a) ont relaté certains composés actifs à ce niveau, dont la quercétine et l'umbelliferone. Dans cette étude, l'efficacité du traitement a surtout été observée chez les pommes de la variété Golden Delicious et à un niveau moindre chez les Granny Smith. Dans leur étude, Imeh et Khokhar (2002), avaient noté une activité antioxydante plus élevée chez les pommes Golden Delicious que chez les Granny Smith. Les auteurs ont également souligné que cette teneur élevée en antioxydants était positivement corrélée avec la haute résistance de cette variété à plusieurs maladies. Similairement à ces deux études antérieures, notre travail a mis en évidence une résistance remarquablement développée par les pommes Golden Delicious face à l'invasion de *P. expansum* en absence de patuline, alors que les pommes Granny Smith n'ont montré aucune résistance particulière. Ces résultats suggèrent une implication éventuelle des composés phénoliques au caractère antioxydant dans le processus de défense développé par la pomme pour se protéger de l'invasion du champignon.

Ces dernières années, les obtenteurs de pommes qui tendent à accroitre la diversité génétique et à créer de nouvelles variétés de pommes se sont intéressés à l'étude de la teneur en antioxydants chez les ascendants potentiels et la transmission de ces traits nutritionnels à la descendance (Brown and Maloney 2005). Dans cette étude, une augmentation significative de la teneur en acide ascorbique qui est l'un des antioxydants majeurs a été signalée dans les semis issus de différents croisements. Sur les cinq variétés de pommes testées au cours de notre étude, deux partagent un fond génétique commun sachant qu'elles sont issues d'un croisement de la variété Golden Delicious, utilisée souvent comme géniteur dans la création de nouvelles variétés de pommes. Il s'agit des pommes Pink Lady et Ariane ; la première est obtenue par un croisement des pommes Golden Delicious et Lady Williams, tandis que la variété Ariane est le fruit de multiples croisements et compte alors plusieurs ascendants dont la Golden Delicious (Brown and Maloney 2005). Sur ces deux variétés de pommes, nos analyses avaient soulignés le même mécanisme de résistance développé face à l'infection par *P. expansum*, retenu chez la variété parentale. Ce résultat reflète d'une part la transmission génétique du caractère de résistance naturel de la variété Golden Delicious à ses descendances. D'autre part, cela va dans le sens de l'hypothèse retenue quant à l'implication des composés phénoliques dans le processus de défense des pommes contre l'attaque du champignon pathogène, en suggérant une transmission de la richesse en polyphénols lors des croisements de la Golden Delicious, comme cela a été souligné plus haut en ce qui concerne l'acide ascorbique dans l'étude de Brown et Maloney (2005). Pour confirmer la validité de ces hypothèses, il serait intéressant d'élargir notre étude en testant d'autres variétés de pommes issues d'un croisement de la Golden Delicious, dont les plus connues sont la Royal Gala et la Goldrush.

Il est aussi intéressant d'établir une comparaison entre les résultats observés sur les variétés de pommes de table et les variétés cidricoles. Sur les sept variétés de pommes de table analysées dans notre étude, trois variétés (42 %) seulement ont montré une résistance particulière à l'infection par *P. expansum.* Un pourcentage relativement plus important (77 %) a été souligné avec les pommes cidricoles, dont sept variétés sur neuf étaient résistantes au développement de la maladie en absence de patuline. Dans la littérature, très peu de données existent sur la différence entre les deux types de pommes. Longtemps les spécialistes en pomologie ont cru que les cultivars cidricoles descendaient de l'espèce *Malus sylvestris*, le pommier sauvage d'Europe contrairement aux variétés de pomme à couteau qui descendent d'une espèce asiatique sauvage *Malus sieversii* dont la zone de distribution se situe au confin du Tibet. Cette hypothèse basée sur les similitudes des caractères organoleptiques tels que l'astringence et l'amertume a été balayée suite à de

récentes études génétiques (Cornille et al. 2012; 2014). Les informations existantes aujourd'hui concernent surtout le contenu polyphénolique de ces pommes. En effet, les pommes utilisées pour la fabrication du cidre sont distinguées des variétés de pommes de table par leur richesse en polyphénols (Sanoner et al. 1999; Marks et al. 2007). Parmi les neuf variétés de pommes à cidre analysées dans notre étude, certaines ont été étudiées pour leur composition en polyphénols dans l'étude de Sanoner et al. (1999). Les résultats obtenus dans cette étude ne sont pas parfaitement en accord avec ce qui a été observé lors du présent travail en termes de susceptibilité du fruit aux attaques de *P. expansum*. En effet, la variété Douce Coët Ligné qui a montré la sensibilité la plus prononcée, présente le contenu en polyphénols totaux le plus important, par contre la variété Petit Jaune qui était parmi celles les plus résistantes vis-à-vis de *P. expansum,* est significativement moins riche en polyphénols. Cette observation soutient l'idée que la défense de l'hôte vis-à-vis des agents pathogènes est un mécanisme très complexe dans lequel plusieurs facteurs sont impliqués. Outre les caractéristiques physiologiques des fruits tels que la teneur en sucre, le pH, et les composés phénoliques préexistants, qui contribuent en grande partie à la résistance du fruit à une attaque exogène, d'autres mécanismes de défense sont impliqués (Figure 15). Les fruits peuvent systématiquement synthétiser des composés phénoliques antifongiques qui s'accumulent dans les zones très proches des sites d'infection pour restreindre la progression du pathogène. Ceci est illustré par l'acide chlorogénique, produit par les pommes pour se défendre contre une infection fongique (Petkovšek et al. 2003). En contact avec un pathogène, le fruit peut produire également du peroxyde d'hydrogène, comme cela a été décrit dans la réponse des fraises (Brown et al. 2008) et des tomates (Mellersh et al. 2002). Des protéines de défense sont également synthétiser pour limiter la pénétration du champignon et inhiber l'invasion fongique, tels que les inhibiteurs des polygalacturonases extraits de pommes, qui se sont montrés efficaces pour prévenir l'infection par *Colletotrichum acutatum* (Gregori et al. 2008). Une large variété de protéines de défense a également été repérée chez d'autres végétaux. Dans les plantes de tabac transgéniques, la surexpression du gène de la chitinase a conduit à une large résistance contre le champignon pathogène *Rhizoctonia solani* (de las Mercedes Dana et al. 2006). La diversité des résultats observés au terme de notre étude peut être éventuellement attribuée à la différence de performance des mécanismes de défense développés vis-à-vis du pathogène *P. expansum* par les différentes variétés de pommes.

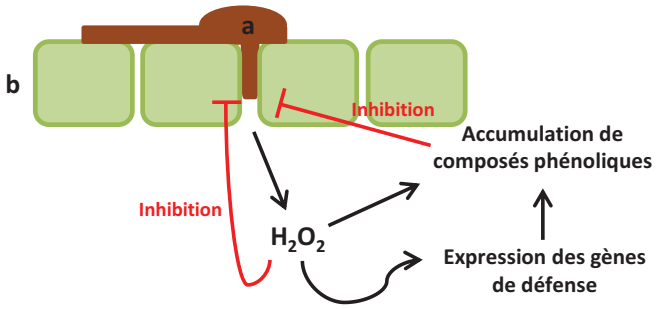


Figure 15 : Représentation schématique des mécanismes de défense impliqués dans l'inhibition de la pénétration fongique.
Adapté et modifié de Mellersh et al. (2002). Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) généré par le fruit suite à une attaque fongique inhibe la pénétration du champignon soit par déclenchement d'une nécrose rapide au niveau du site d'infection soit par activation des gènes liés à la défense et l'accumulation des composés phénoliques à activité antifongique. a, représente le champignon et b, schématise la membrane externe du fruit.

Enfin, il convient de noter que le sujet traité dans cette étude complémentaire est d'autant plus complexe que d'autres facteurs sont à prendre en considération. Il s'agit surtout des traitements reçus par les pommiers et les pommes qui pourraient avoir un effet déterminant sur le comportement de *Penicillium expansum* ainsi que la production d'autres métabolites secondaires par ce champignon. A ce niveau, il peut être intéressant pour répondre en partie au premier point d'intégrer une analyse des pommes issues de l'agriculture biologique, n'ayant subi aucun traitement chimique.

3.2. Caractérisation du gène *patE* codant pour l'enzyme impliquée dans la dernière étape de la voie de biosynthèse de la patuline

3.2.1. Résumé de l'étude

Cette étude s'inscrit dans la continuité des précédentes et vise à approfondir et compléter les connaissances acquises sur la voie de biosynthèse de la patuline. Comme évoqué précédemment, cinq gènes codant pour cinq enzymes biosynthétiques de la patuline sont uniquement caractérisés à ce jour ; il s'agit des gènes *6msas* (*patK*), *idh* (*patN*), des gènes codant pour deux cytochromes P450 (*patH* et *patI*) et du gène qui code pour la 6msa décarboxylase (*patG*). A l'exception du *patN*, les autres gènes caractérisés codent pour des enzymes impliquées dans les premières étapes de cette voie métabolique. Cependant les dernières étapes restent mal élucidées. Dans cette deuxième partie du chapitre 3, nous nous sommes intéressés à éclaircir la dernière étape de la cascade enzymatique aboutissant à la synthèse de la patuline.

La dernière étape de cette voie réside en la fermeture de cycle furane en passant de l'ascladiol à la patuline. Une réaction de cyclisation identique survient au cours de la biosynthèse des aflatoxines lors de la déshydratation du versiconal hémiacétal en versicolorine B. Cette dernière est catalysée par une versicolorine B synthase (VBS) qui appartient à la famille des Glucose Méthanol Choline (GMC) oxydoréductases. Une analyse BLASTp des séquences protéiques codées par les gènes du cluster de la patuline chez *P. expansum* a révélé 60 % d'identité entre la séquence protéique codée par le gène *patE* et la Versicolorine B Synthase (VBS) chez *Aspergillus nidulans*. De même, la recherche de domaines putatifs conservés sur la séquence protéique codée par le gène *patE* a révélé deux domaines conservés rencontrés dans la famille des GMC oxydoréductases. Par analogie, la GMC oxydoréductase codée par le gène *patE* identifié chez *P. expansum* est supposée être principalement responsable de la dernière étape de la voie de biosynthèse de la patuline.

Pour confirmer la validité de cette hypothèse, une mutation ciblée du gène *patE* chez la souche sauvage NRRL 35695 de *P. expansum* par remplacement avec une cassette de résistance à l'hygromycine, a été réalisée. Vingt-neuf souches transformées ont été repérées et isolées sur milieu YPD additionné d'hygromycine. La caractérisation chimique de ces souches a été faite par leur culture sur milieu PDA suivie par une analyse de leur profil métabolique en HPLC. Ces analyses ont permis de discriminer une seule souche transformée (PeΔ*patE*19) qui a montré sur son chromatogramme une absence du pic correspondant à la patuline, associée à l'apparition d'un autre pic qui a été identifié comme ascladiol en fonction de son temps de rétention, comparé à celui

d'un standard. La souche transformée qui a été retenue par caractérisation chimique a subi une caractérisation moléculaire. L'insertion de la cassette de délétion au locus a été validée génétiquement par le biais d'une PCR suivie d'une digestion enzymatique par EcoRI alors que l'insertion unique a été confirmée par analyse Southern blot. L'ascladiol a été purifié par HLPC à partir des cultures du mutant PeΔ*patE*19, en utilisant une colonne semi-préparative. Son identité a par la suite été confirmée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS).

Outre son rôle comme précurseur direct de la patuline, l'ascladiol a été identifié comme produit de biodégradation de cette mycotoxine par des microorganismes comme *Saccharomyces cerevisiae* (Moss and Long 2002) et *Gluconobacter oxydans* (Ricelli et al. 2007). Les produits de biodégradation des mycotoxines sont généralement reconnus comme étant moins toxiques que la molécule d'origine, voire non toxiques. Néanmoins, les données relatives à la toxicité de l'ascladiol sont limitées à une ancienne étude dans laquelle la toxicité de ce métabolite a été estimée au quart de celle de la patuline (Suzuki et al. 1971). Dans la deuxième partie de cette étude, la toxicité de l'ascladiol a été évaluée sur une lignée cellulaire tumorale humaine d'origine intestinale (Caco-2). Les cellules ont été exposées pendant 24 heures à sept doses croissantes d'ascladiol et de patuline allant de 0,1 à 100 µM. Le traitement avec la patuline a provoqué une diminution significative et dose-dépendante du nombre de cellules viables. Cependant, l'ascladiol a été prouvé non cytotoxique sur les Caco-2, pour toute la gamme de concentrations testées.

Au terme de cette étude, la dernière étape de la voie de biosynthèse de la patuline a été complètement élucidée et l'implication directe du gène *patE* codant pour une GMC oxydoréductase dans cette étape a été bien établie. Dans un deuxième temps, cette étude a apporté de nouveaux éléments sur la toxicité de la patuline et son précurseur direct, l'ascladiol.

3.2.2. Article: Targeted disruption of the *patE* gene: Characterization of the final step in the patulin biosynthesis and toxicity assessment of the last two products of this pathway ***(ARTICLE 4)***

(Voir manuscript qui suit)

Targeted disruption of the *patE* gene: Characterization of the final step in the patulin biosynthesis and toxicity assessment of the last two products of this pathway

Joanna Tannous[1,2,3], Leticia Murate[1], Cécile Canlet[1], Philippe Pinton[1], Thierry Gauthier[1,2], Selma P. Snini[1,2], André El Khoury [3], Ali Atoui[4], Ting Zhou[5], Roger Lteif[3], Isabelle P. Oswald[1,2], 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] Laboratory of Microorganisms and Food Irradiation, Lebanese Atomic Energy Commission-CNRS, P.O. Box 11–8281, Riad El Solh, 1107 2260 Beirut, Lebanon

[5] Guelph Food Research Center, Agriculture and Agri-Food Canada, 93 Stone Road West, Guelph, Ontario, Canada

[*] **Contact information about Corresponding Author:**
Olivier PUEL
Team '' Biosynthesis and Toxicity of Mycotoxins'', INRA, UMR 1331 TOXALIM
180, Chemin de Tournefeuille
F-31027 Toulouse, FRANCE
E-mail address: opuel@toulouse.inra.fr

ABSTRACT

Patulin is a mycotoxin produced by several fungal species belonging to the *Aspergillus*, *Byssochlamys* and *Penicillium* genera and is most commonly found as contaminant in apples and byproducts. This polyketide mycotoxin is derived from the condensation of one acetate and three malonate units by a polyketide synthase (PKS); however the biochemical events in its biosynthesis are not entirely outlined. Only five out of fifteen genes were characterized and shown to be mainly involved in the first part of the patulin biosynthetic pathway. However the enzymatic functions of the rest of the genes remain unknown. We report here the characterization of the gene *patE* encoding a putative GMC oxidoreductase. The replacement of the *patE* gene by the hygromycin cassette in *P. expansum* NRRL 35695 strain resulted in a transformant strain (PeΔ*patE*19) that was able to accumulate high levels of ascladiol instead of patulin, under permissive conditions for patulin biosynthesis. The desired integration event was confirmed by PCR and Southern blot. These data provide the first evidence that the last enzymatic step in the biosynthesis of patulin is catalyzed by a Glucose-Methanol-Choline (GMC) oxidoreductase encoded by the *patE* gene, giving a new interesting insight into the biosynthetic pathway of this toxin. The ascladiol has been isolated and purified from the *patE* deficient strain extract by semi-preparative High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and then analyzed by High resolution mass spectrometry (LC-HRMS). Ascladiol is not only the last intermediate in the patulin pathway but also the main product of patulin degradation during the alcoholic fermentation of apple juice. To date, there is numerous toxicity studies conducted on patulin, whilst available information regarding the toxic potential of ascladiol is limited to one publication. Thus, the cytotoxic activities of patulin and ascladiol were investigated against the human Caco-2 cell line, using the CellTiter-Glo assay. Our results showed that patulin presents high cytotoxic potential for this cell line in a dose-dependent. Otherwise, ascladiol was found to be non-cytotoxic at all tested concentrations.

Keywords: Patulin biosynthesis, *Penicillium expansum*, *patE* gene, GMC oxidoreductase, Ascladiol, cytotoxicity.

1. INTRODUCTION

Patulin is a secondary metabolite known to be produced by numerous fungal species, belonging predominantly to the *Aspergillus, Byssochlamys* and *Penicillium* genera (Dombrink-Kurtzman and Engberg 2006; Varga et al. 2007). The main responsible for patulin production is *Penicillium expansum*, known as the most serious apple post-harvest pathogen (Morales et al. 2008). Patulin has an electrophilic structure due to the conjugated double bonds, and hence it interacts irreversibly with cellular nucleophilic groups (Fliege and Metzler 2000a; 2000b) leading to genotoxicity and cytotoxicity by inducing chromosomal aberrations and micronucleus formation (Glaser and Stopper 2012). Patulin was also known for being a potent immunotoxin (Escoula et al. 1988; Llewellyn et al. 1998) but the absence of significant probes in human led IARC (International Agency for Research on Cancer 1985) to classify patulin in group 3 (not classifiable as to its carcinogenicity to humans). Tolerable daily intakes have been fixed at 0.4 µg/kg body weight/day (Joint WHO/FAO Committee on Food Additives, JECFA)(Welke et al. 2009).

The biosynthetic pathways are the main targets for reducing production and exposure to naturally arising mycotoxins. Regarding patulin, its biosynthesis has been investigated for many years and a biosynthetic scheme, accepted by most investigators, has been proposed (Figure 1) (Artigot et al. 2009; Puel et al. 2010). This pathway requires at least ten enzymatic steps and involves fifteen genes, recently localized within a cluster on a 40-kb DNA fragment in *Penicillium expansum* (Tannous et al. 2014). Similar to other polyketide mycotoxins, patulin derives from an acetate starter group with malonate being the chain extender (Steyn 1991). The four early steps of this pathway consist of the synthesis of 6-methylsalicylic acid, a backbone precursor catalysed by a polyketide synthase, and then a decarboxylation followed by two hydroxylation reactions leading to gentisyl alcohol. Both the chemical and molecular aspects of these steps have been fully elucidated. After molecular cloning and functional characterization of the first patulin gene (*patK*) encoding the 6-methylsalicylic acid synthase from *Penicillium griseofulvum* (Beck et al. 1990; Wang et al. 1991), the three subsequent genes were characterized alongside, from *Aspergillus clavatus*. The gene *patG* was proved to be responsible for the decarboxylation of the 6-methylsalicylic acid into *m*-cresol by encoding a 6 methyl-salicylic acid decarboxylase (Snini et al. 2014). Two cytochromes P450, CYP619C3 and CYP619C2 encoded by *patH* and *patI* were evidenced to be responsible for the transformation of *m*-cresol into *m*-hydroxybenzyl alcohol and the modification of *m*-hydroxybenzyl alcohol to gentisyl alcohol, respectively (Artigot et al. 2009). However, the subsequent steps of this pathway are significantly less understood and the mechanisms leading to the post-gentisyl alcohol

precursors are more blurred. Aside the enzymatic step allowing the isoepoxydon transformation into phyllostin, catalyzed by an isoepoxydon dehydrogenase encoded by the gene *patN* (Dombrink-Kurtzman and Engberg 2006; Dombrink-Kurtzman and McGovern 2007; Puel et al. 2007), none of the enzyme-catalyzed reactions and the gene identities mediating the latest steps of the patulin metabolic pathway is yet revealed.

From a chemical point of view, the main reactions and rearrangements leading to the bicyclic structure of patulin occur during the post-gentisyl alcohol and post-gentisaldehyde segments of the pathway (Figure 1). By inspecting the chemical structures of the latest aromatic precursors (isoepoxydon, phyllostin, neopatulin and ascladiol), evidence has been gathered to suggest that a monooxygenase-mediated epoxidation produces phyllostin from gentisaldehyde (Dewick 2002). The subsequent biosynthetic intermediate, neopatulin, appears to be the result of an hemiacetal and lactone groups' formation. From neopatulin to patulin, the conversion includes a a conformational change in the hemiacetal ring that is achieved by the enzymatic reduction of neopatulin to E-ascladiol, followed by the oxidative ring closure of this diol to the mycotoxin, patulin (Sekiguchi et al. 1983; Lykakis et al. 2009). This cyclization occurring in the last step of the patulin pathway was previously described in other metabolic pathways. In the aflatoxin biosynthetic pathway, a similar ring closure occurs during the step leading to the formation of versicolorin B from versiconal hemiacetal. This reaction was proved to be mediated by the Versicolorin B Synthase (VBS) in *Aspergillus parasiticus* (Lin and Anderson 1992; Silva et al. 1996), encoded by the gene *aflK,* according to the new nomenclature (Yu et al. 2004). This furan ring allows the aflatoxin binding to the DNA thus it is a prerequisite for its mutagenic activity. The amino acid sequence of this VBS protein was found to have the greatest homology with proteins in the Glucose-Methanol-Choline (GMC) oxidoreductase family (Silva et al. 1996). Within the 40 kb patulin gene cluster, a putative GMC oxidoreductase gene was identified (Artigot et al. 2009). In an analogical manner, this gene is suggested to have a potential role in the latest step of the metabolic pathway leading to patulin from ascladiol.

In this paper, we describe the insertional inactivation of the gene that encodes a putative GMC oxidoreductase in *P. expansum* NRRL 35695 strain. This enabled us to explore the biocatalytic properties of this enzyme, which turned out to be an effective FAD-containing oxidase that is able to oxidize ascladiol into patulin. Furthermore, the cytoxicity of those two compounds was also investigated against a human intestinal cell line.

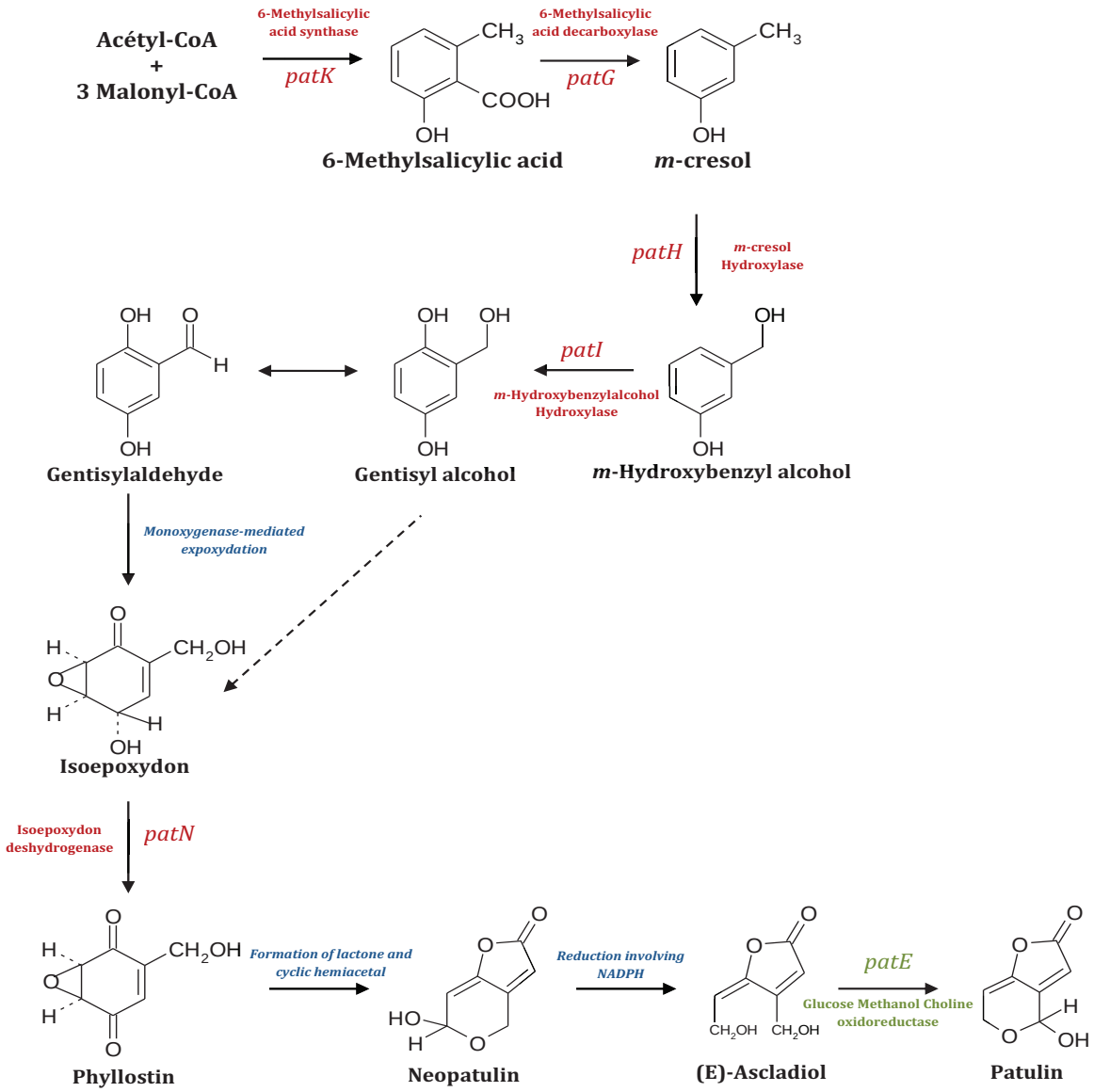


Figure 1 : The suggested biosynthetic pathway from acetyl-CoA and malonyl-CoA building blocks to patulin.

The characterized enzymes and their corresponding genes are shown in red. The putative chemical reactions and rearrangements are presented in blue, the enzymatic step characterized during this study is shown in green (Dewick 2002; Artigot et al. 2009; Puel et al. 2010).

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Chemicals

Patulin standard was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). The non-commercial ascladiol was a generous gift from Dr. Ting Zhou (Research Scientist at Guelph Food Research Center, Canada). 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-DAD and molecular biology procedures was purified by using a Millipore MilliQ purification system.

2.2. Microorganisms, media and growth conditions

The *Penicillium expansum* strain NRRL 35695 (National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Ill.) initially isolated from grapes in the Languedoc Roussillon region of 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 to enhance sporulation. For the protoplast regeneration, $3x10^7$ conidia were inoculated into 250 mL Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) medium (20 g dextrose, 10 g yeast extract, 20 g bactopeptone per litre) followed by shaking on an orbital shaker (150 rpm) at 25°C for 12 hours. The *Saccharomyces cerevisiae* strain FY1679 (MATa/MATα ura3-52/ura3-52; trp1Δ 63/TRP1; leu2Δ 1/LEU2; his3Δ 200/HIS3; GAL2/GAL2) was used to generate the Pe*patE* gene disruption cassette by homologous recombination. This strain was grown on solid (YPD) medium at 30°C for 5 days.

2.3. Generation and characterization of the PeΔ*patE* mutant strain

2.3.1. Construction of the *patE* disruption vector and fungal transformation

In order to characterize the function of the *patE* gene (KF899892) in *P.expansum*, a gene deletion strategy was undertaken by replacing the coding region with the hygromycin selection marker. The method used for the deletion cassette's construction is presented in Figure S1. To ensure high homologous recombination efficiency, two DNA fragments of 1021 and 1104 bp corresponding respectively to the upstream and downstream regions of the target gene (*patE*) were amplified from the genomic DNA of *P. expansum* NRRL 35695 strain using the two respective primer pairs 5fdebPatEPex/DebPatEPex1Rhygro and FinPatEPex1Fhygro/3rfinPatEPex. A 4107 pb fragment containing the hygromycin resistance cassette (*hph*) was amplified from the pAN7.1 expression vector (Accession number Z32698) carrying the *hph* cassette under the control of *gpdA*

promoter and *trpC* terminator from *A. nidulans* using the primer pair hphF1/hphR1. Subsequently, the three fragments were fused along with the pRS426 cloning vector linearized with BamHI/HindIII, by homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae* FY1679 strain. The yeast DNA extraction was processed by Fastprep (MP biomedical, Illkirch-Graffenstaden, France) using lysing matrix C (MP biomedical) and yeast lysis buffer. The resulting linear deletion cassette (6081 bp) was amplified from the pooled yeast DNA using the nested primers dPatE-NestedF and dPatE-NestedR. All the primer sets used are listed in Table 1.

Table 1 : Primers used in this study

Primer	Sequence (5'-3')	Annealing Temperature
5fdebPatEPex [1]	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGGTGCTGGATCTCAATC AGGCATGGG	61˚C
DebPatEPex1Rhygro [2]	GAGCCTGTGTGTAGAGATACAAGGGAATTCGGTCCCAATTACCGT CGCAGAAAGG	61˚C
hphF1	GAATTCCCTTGTATCTCTACACACAGGCTC	62˚C
hphR1	CGAGTGGAGATGTGGAGTGGGCG	62˚C
FinPatEPex1Fhygro[2]	GTGTAAGCGCCCACTCCACATCTCCACTCGCGGGCAATATAGCATC CAACCACAGG	61˚C
3rfinPatEPex[1]	GCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCCATTCCAGACCACGTC AATGCAGCC	61˚C
dPatE-NestedF	CCAAAGGATGAAGCGGTGGTGAAGG	61˚C
dPatE-NestedR	CACATGAAGATCCCACCGGGTGAAC	61˚C
dPatEF3	CTTCCGGAAGAGGAAATACCCCTCC	61˚C
dPatER3	CATTTCCCGAAATGGCGGCTGTATGTC	61˚C
hygF	TCGGAGGGCGAAGAATCTCG	55 ˚C
hygR	CCGAACATCGCCTCGCC	55 ˚C

[1] The sequences underlined were added at the 5'end and were identical to the pRS426 cloning vector edges

[2] The sequences underlined were added at the 5'end and were identical to the PCR product generated by primers hphF1/hphR1 edges

Genetic transformation of *P. expansum* was carried out following a procedure described in the study of Merhej et al. (2011). Twelve hours old fungal mycelium was used for the protoplast preparation. Briefly, the protoplasts were prepared using Glucanex (from *Trichoderma harzianum* L1412, Sigma Aldrich), at a concentration of 20 mg/mL in $MgSO_4$ (1.2M). About 5 µg of the purified PCR product was used for the fungal transformation. The screening for hygromycin resistance was

performed on YPD sorbitol medium containing 100 µg/mL of hygromycin. Transformants were purified twice by streaking spores to obtain single colonies on YPD (100 µg/mL of hygromycin). Single conidial cultures were established from hygromycin-resistant transformants on YES (Yeast Extract Sucrose) broth and used for DNA isolation.

2.3.2. Chemical characterization of the PeΔ*patE* mutant: HPLC-DAD analysis

To qualitatively determine the metabolites that were accumulated in transformant colonies, 10^6 spores of each purified transformant were centrally inoculated into plates containing 20 mL of PDA medium, known to support patulin production, and grown at 25˚C for 7 days. Three technical replicates were performed for each mutant strain. The wild-type NRRL 35695 strain, was cultured following the same conditions and used as an experimental positive control. After the appropriate incubation period, the agar media were scraped off the Petri plates and macerated for two days in 50 mL of ethyl acetate (Sigma Aldrich). The ethyl acetate filtrate was concentrated and evaporated to dryness on a rotary evaporator (Büchi, Flawil, Switzerland) and a Zymark TurboVap (McKinley Scientific, Sparta, NJ, United States). The residue was taken up into 500 µL of MeOH (80 %) and aliquots of 25 µL were injected into an Ultimate 3000 HPLC system (Dionex/ThermoScientific, Courtaboeuf, France) for analysis, using 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, from 60 to 65 min 0 % B at a flow of 0.9 mL/min. Eluent A was water acidified with 0.2 % acetic acid and eluent B was methanol of HPLC grade (Fisher Scientific, Illkirch, France). The HPLC column used was a 250 × 4.60 mm Gemini 5 µm C6-Phenyl column (Phenomenex, Torrance, CA, United States). Patulin (Sigma Aldrich) and purified ascladiol were used as reference standards to identify the production of ascladiol in *patE* gene-disrupted transformants.

2.3.3. Molecular characterization of the PeΔ*patE* mutant

The *patE* disruption was validated by PCR screening and by Southern blotting. Genomic DNA from the putative transformant and the parental strains was extracted following the protocol described by Puel et al. (2005). The extracted DNAs were subjected to PCR amplification with the primer pair dPatEF3/dPatER3. These primers yield a product of 6505 bp if the integration of the plasmid construct occurs at the *patE* locus and a 4409 bp product in the presence of parental genomic DNA. These primers were designed outside the left and the right fragments of the disruption cassette. The Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo scientific, Illkirch, France)

was used for the PCR reactions, using the following conditions : an initial denaturation for 30 s at 98°C, followed by 40 cycles of denaturation for 10 s at 98°C, annealing for 30 s at 60°C and an extension for 3min and 30 sec at 72°C. A final extension step for 10 min at 72°C was performed. For a further confirmation, the PCR products were digested by EcoRI and the digestion products were resolved using agarose gel electrophoresis.

Southern blotting was performed using XhoI-digested genomic DNAs (20 µg) from wild-type *P. expansum* (NRRL 35695) and the PeΔ*patE*19 strains. Samples were separated on a 0.8 % denaturating agarose gel, and transferred onto a nylon membrane Hybond N+ (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France). Southern blot hybridization was performed using biotin-labeled probe synthesized according to the manufacturer's instructions (Li-Cor, Lincoln, Nebraska, United-States) by incorporation of the desired nucleotide: Biotin-16-dUTP (Roche Applied Science, Neuilly sur Seine, France). The Hyg DNA probe (homologous to hygromycin resistance cassette) was generated using the primer pair hygF/hygR (Table 1). The probe was amplified from the pAN7.1 expression vector (Accession number Z32698). The Figure 2 is a schematic drawn to scale that illustrates the replacement of the *patE* ORF in *P. expansum* with the Hygromycin gene and the location of the EcoRI restriction enzyme cut sites in the wild-type and the PeΔ*patE* strains. The location of the probe used for the Southern blot of XhoI digested genomic DNA are also presented.

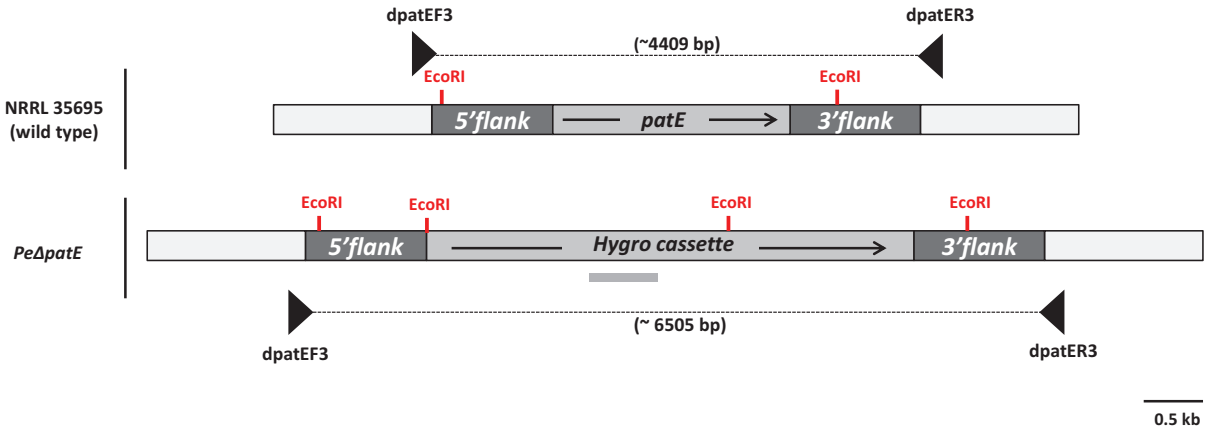


Figure 2 : Schematic representation to scale of the *patE* gene disruption in *Penicillium expansum*.
The PCR primers shown by arrow heads were designed to amplify the region across the *patE* -hygromycin cassette and used to screen by PCR the mutants carrying the disrupted *patE* gene. The positions of the EcoRI restriction sites are represented in red, while the grey bar indicates the position of the *Hyg* DNA probe used in the Southern blot analysis.

2.4. Ascladiol purification and identification

The *patE* deficient strain was cultured on fourty large PDA agar plates (140 mm) at 25 ˚C in order to produce large amounts of ascladiol. At the seventh day of incubation, the agar media were scraped off the Petri plates and macerated for two days with 100 mL ethyl acetate per plate. The organic filtrate was then concentrated and evaporated to dryness as described above. The final dry extract recovered from all the Petri plates was dissolved in 10 mL of MeOH (80 %).

Ascladiol purification was performed on the same HPLC appartus used above for analytical analysis. A Gemini C6- Phenyl semi-preparative column was used (250 mm length, 10 mm internal diameter and 5 µm particular size; Phenomenex, Torrance, CA, United States). The separation of ascladiol was achieved by isocratic elution using water as mobile phase, at a flow rate of 4.3 mL/min. The preparative flow was pumped through a valve at the ultimate 3000 Fraction Collector (Dionex/ThermoScientific, Courtaboeuf, France). Multiple fractions were pooled, and the solvent was evaporated under reduced pressure. After drying, the weight of the purified sample was determined as 1 mg. The dry residue was dissolved in 2 mL of Milli-Q water.
Prior to toxicity experiments, the identity of the purified metabolite was confirmed by HPLC-DAD and High resolution mass spectrometry (LC-HRMS) analyses.

The identity of the purified compound 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 according to Cano et al. (2013). A reverse phase 150×2.0 mm Luna C18 (2) column (Phenomenex, Torrance, CA, United States) was used. Twenty microliters of the purified product suspension in water was injected directly into the LC system. The flow rate was 0.2 mL/min. The chromatography gradient was performed with 0.1 % formic acid (eluent A) and acetonitrile (eluent B) as mobile phase. The elution started with a linear gradient from 20 % to 50 % over 30 min. The solvent B part increased then to 90 % within 5 min. After a 10 min isocratic elution, the gradient decreased to the initial value within 5 min and remained constant for the last 10 min. HRMS acquisitions were achieved with electrospray ionization in the positive mode as follows: spray voltage +4 kV, capillary temperature and voltage were set to 300°C and 25 V, respectively. Normalized collision energy was set to 35 %. HRMS and HRMS/MS spectra were acquired at a resolution of 60 000 and 7 500 respectively.

2.5. Cytotoxicity assessment by CellTiter-Glo assay

The human colon carcinoma cell line Caco-2 (TC7 subclone, passage 114) used in the cytotoxicity assays was grown in Dulbecco's modified eagles (DMEM 1X) medium with glutamax (Gibco, Saint-Aubin, France) supplemented with 0.5 % gentamycin (10 mg/mL) (Eurobio, Les Ulis, France), 10 % fetal bovine serum (Eurobio) and 1 % MEM Non-Essential Amino Acids non-essential amino acid (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier France).

The luminescent assay CellTiter-Glo (Promega) was used to measure the cell viability by ATP level. Measurements were done according to the manufacturer's instructions. Briefly, Caco-2 Cells (5×10^3 cells/100 µL of medium) were seeded into 96-well flat-bottomed plates (white for Titer-Glo) and incubated at 37°C for 24 h. After 24 h, the medium was replaced by a fresh one without serum and containing increasing patulin and ascladiol concentrations (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 and 100 µM) (in triplicates). Three identical test runs were performed for each condition. After 24 h of incubation, plates were removed from the incubator and allowed to equilibrate at room temperature for 20 min. The CellTiter-Glo reagent was then added to the wells (100 µL) and incubated for 30 min at room temperature in the dark. The luminescence was recorded on the Infinite 200 Pro multimode microplate reader (Tecan, Lyon, France). The relative metabolic activity was determined as the ratio of measured luminescent signal proportional to the amount of ATP present under the different experimental conditions over the signal of untreated cells.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Sequence analysis of the putative GMC oxidoreductase from *P. expansum*

The *patE* gene sequence of *P. expansum* was identified in our previous study (Tannous et al. 2014), and is located within a gene cluster involved in patulin biosynthesis. The translation of this gene's coding sequence results in a protein of 629 amino acids (GenBank AIG62134).

Searching the conserved domain database (CDD) at NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi) revealed that the *patE* gene product belongs to a group of glucose-methanol-choline (GMC) flavoprotein oxidoreductases. The members of this protein family, firstly defined by Douglas (1992), are defined by two Pfam conserved domains. The first one is the N-terminal GMC domain (Pfam 00732), involved in the binding of the Flavin Adenine Dinucleotide (FAD) as a prosthetic group. The FAD cofactor in the GMC-type

oxidases provides the oxidative power required in the reactions and is reduced to $FADH^-$ upon the oxidation of the substrate. The second conserved domain is the C-terminal GMC domain (Pfam 05199)(Etxebeste et al. 2012). This domain of approximately 150 amino acids includes the active-site residues, comprising a strictly conserved histidine (Dijkman and Fraaije 2014). These conserved domains were detected in GMC oxidoreductases including the Versiconal B synthase (VBS).

The protein encoded by the *patE* gene was then subjected to a BLASTp. The NCBI blast search revealed high similarities with a large number of GMCs, including a 60 % of identity with the versicolorin B synthase from *Aspergillus niger*. The latter enzyme catalyzes the transformation of versiconal hemiacetal to versicolorin B, an essential transformation in the aflatoxin biosynthetic pathway (Silva et al. 1996). Similarities exist between the reaction leading to the closure of bisfuran ring in the aflatoxin biosynthetic pathway and the transformation of the patulin precursor, ascladiol into patulin (Figure 3). Such structural similarities allowed us to propose ascladiol as a plausible substrate of PATE.

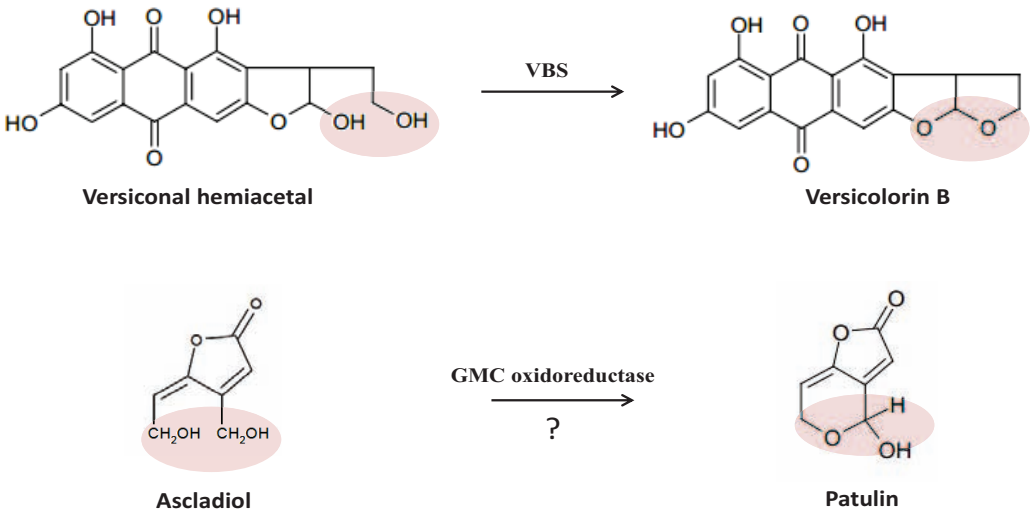


Figure 3 : Cyclization of versiconal hemiacetal to versicolorin B and ascladiol to patulin.
The red circles designate the closure of the furan (versicolorin B) or pyran (patulin) rings during these two reactions.

3.2. Generation and Characterization of the *patE* - deficient mutant

In order to study the function of the *patE* gene in the patulin biosynthetic pathway, the ORF of *patE* gene in *P. expansum* was replaced by the hygromycin resistance marker.

A total of 29 independent transformants were picked randomly, streak purified, transferred to PDA plates and subsequently subjected to HPLC-DAD in order to investigate patulin production. After the first round of screening, one mutant strain out of 29 (PeΔ*patE*19) lacked the patulin peak in its chromatogram (Figure 4C) in comparison with the wild-type strain (Figure 4B). The absence of patulin in the PeΔ*patE*19 strain's extract was associated with the appearance of a new peak that eluted before patulin, with a retention time of 12 min. This product was determined to be ascladiol, the last intermediate in the patulin biosynthetic pathway, according to its retention time and UV spectrum compared with an authentic standard (Figure 4A). This mutant strain was thus identified as promising candidate, having apparently undergone the desired homologous integration.

Hence, the hygromycin-resistant transformants were screened by PCR and southern blot to investigate the gene-targeting events. Relying on the PCR analysis, the PeΔ*patE*19 mutant strain retained by the first chemical characterization lacks a 4409-bp band present in the wild-type strain and was found to have the correct *patE* deletion as they yielded the required 6505-bp fragment (Figure 5A). The 6505-bp band, however, did not appear in the other mutants, that have been excluded from the analysis (data not shown). The Full-length PCR products generated from the PeΔ*patE*19 and the wild-type strains were digested with EcoRI restriction enzyme and the resulting restriction fragments were as expected: three fragments of 226 bp, 3312 bp and 883 bp for the wild-type strain, and five fragments of 226 bp, 894 bp, 2544 bp, 1992 bp and 883 bp from the transformant strain (data not shown). The PCR and the subsequent digestion results confirmed that the disruption construct was integrated at the endogenous locus of interest (*patE*) by the means of homologous recombination in the PeΔ*patE*19 strain.

The latter was further confirmed to have undergone a unique homologous recombination by Southern blot analysis. Genomic DNA from the wild-type NRRL 35695 and the PeΔ*patE*19 stain were digested with XhoI and probed firstly with a 500 bp DNA fragment from the 3' flanking region of the *patE* gene and then with a 500 bp DNA fragment of the hygromycin cassette. The hygromycin probe hybridized once to a fragment of 5196 bp from the transformant strain but not to the wild-type NRRL 35695 DNA, lacking the hygromycin cassette. The positive control used in the southern blot was to the Δ*patE* cassette of 6081 bp (Figure 5B).

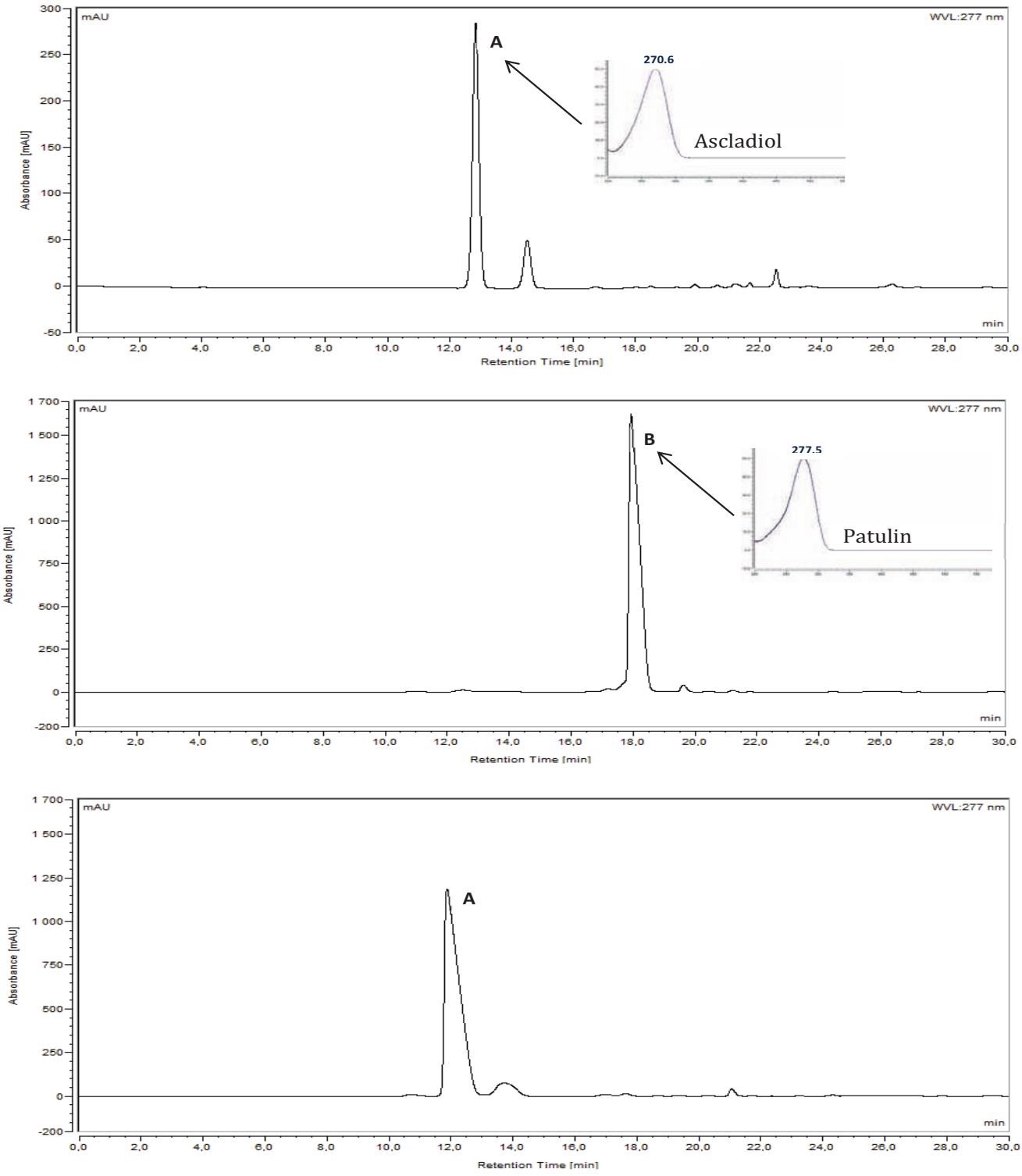


Figure 4 : High-performance liquid chromatography (HPLC)-UV chromatograms of the ascladiol standard solution (A), the wild-type NRRL 35695 extract (B) and the PeΔ*patE*19 extract (C).
The UV spectrum of peak A and B, recorded from the diode array detector, corresponds to the typical UV spectrum of ascladiol and patulin with a maximal absorbance at 270 nm and 277 nm, respectively.

Taken together these data provide consistent evidence that the protein encoded by *patE* catalyzes the last step of the patulin biosynthetic pathway, in which ascladiol is oxidized to patulin. In the aflatoxin biosynthetic pathway, the cyclization of versiconal hemiacetal was proved to be also carried out non-enzymatically, under acidic conditions, to yield versicolorin B (Hsieh et al. 1989; Anderson and Chung 1990; Lin and Anderson 1992; Silva et al. 1996). The similarity between the latter reaction and the one leading to the transformation of ascladiol into patulin, both undergoing a common side chain cyclization to form a furan or pyran ring respectively, suggest that a potential non-enzymatic pathway may also occur in the last step of the patulin biosynthesis. However, this expected transition has not yet been described in the case of patulin.

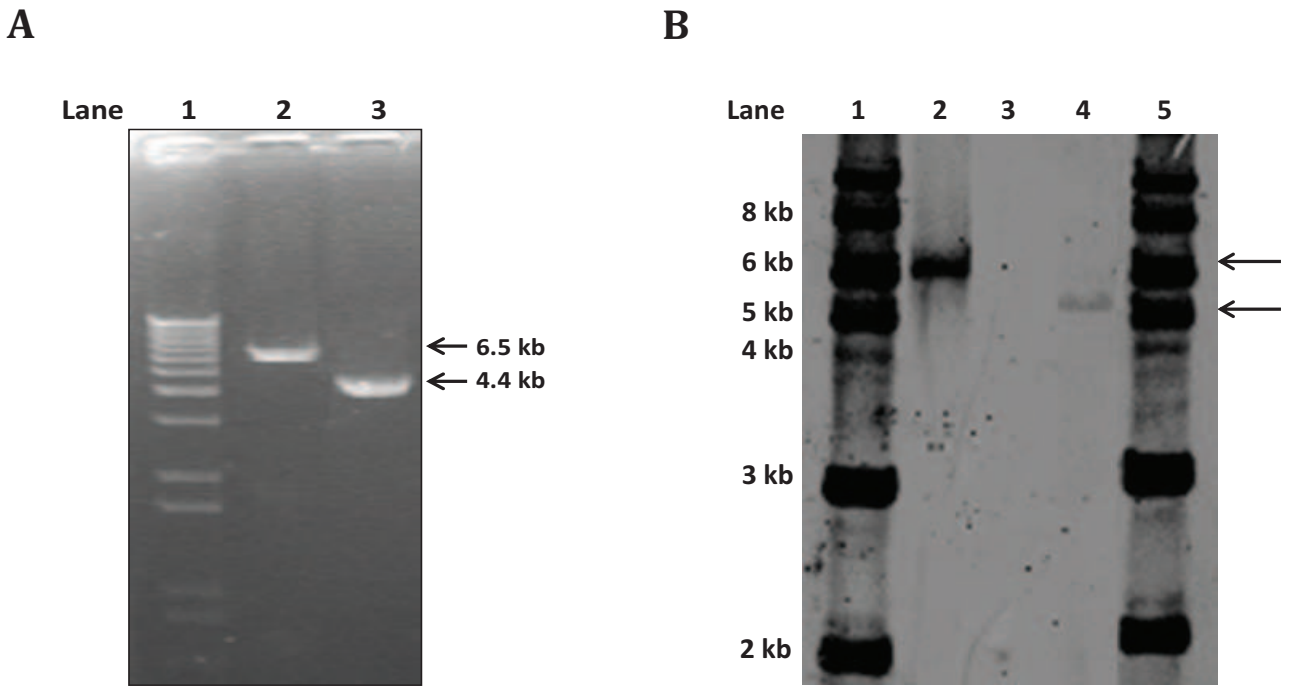


Figure 5 : Confirmation of the PeΔ*patE*19 deletion mutant by PCR and Southern blotting.
(A) PCR confirmation of the insertional inactivation of the *patE* gene. Lane 1: 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), Lanes 2 and 3: PCR amplifications with dpatEF3 and dpatER3 primers, using respectively the PeΔ*patE*19 and the NRRL 35695 genomic DNAs as template. Sizes of the generated bands are shown on the right. (B) Southern blot analysis of genomic DNA from the wild-type and PeΔ*patE*19 mutant strains. Twenty micrograms of total DNA from each strain was digested with XhoI and subjected to Southern blot analysis using the Hygromycin fragment as a probe. Lane 1: marker (Biotinylated 2-Log DNA ladder, New England Biolabs, Evry, France); lane 2: Δ*patE* cassette (positive control); lane 3: wild-type strain; lane 4: PeΔ*patE*19 mutant strain; Lane 5: marker. The PeΔ*patE*19 transformant shows a unique fragment of 5.1 kb with the replacement of the *patE* gene with the Δ*patE* cassette. The wild-type strain did not hybridize due to the absence of the Δ*patE* cassette. The arrows on the right indicate the position of the obtained bands.

3.3. Separation, identification and confirmation of ascladiol

The purified compound from the PeΔ*patE*19 culture following the purification procedure described above was analyzed by HPLC-DAD. The analysis revealed a single peak that eluted at 9 min. No degradation peaks were observed in the chromatogram (Figure 6A).

The identity of ascladiol was confirmed by high resolution mass spectrometry on the basis of MS2 spectra. In positive mode, it showed a base peak at m/z 157.04935 (calculated exact mass: 157.04953; deviation: -1.12 ppm). These data correspond to a molecular weight of 156.04 and the formula $C_7H_8O_4$. As shown in Figure 6B, the MS-MS spectrum of ascladiol ($[M+H]^+$, m/z 157.04935), acquired in positive-ion mode, showed main fragments at m/z 111.04390 (calculated exact mass: 111.04405; deviation: -1.32 ppm) and m/z 139.03873 (calculated exact mass: 139.03897; deviation: -1.59 ppm), according to data previously published (Ricelli et al. 2007).

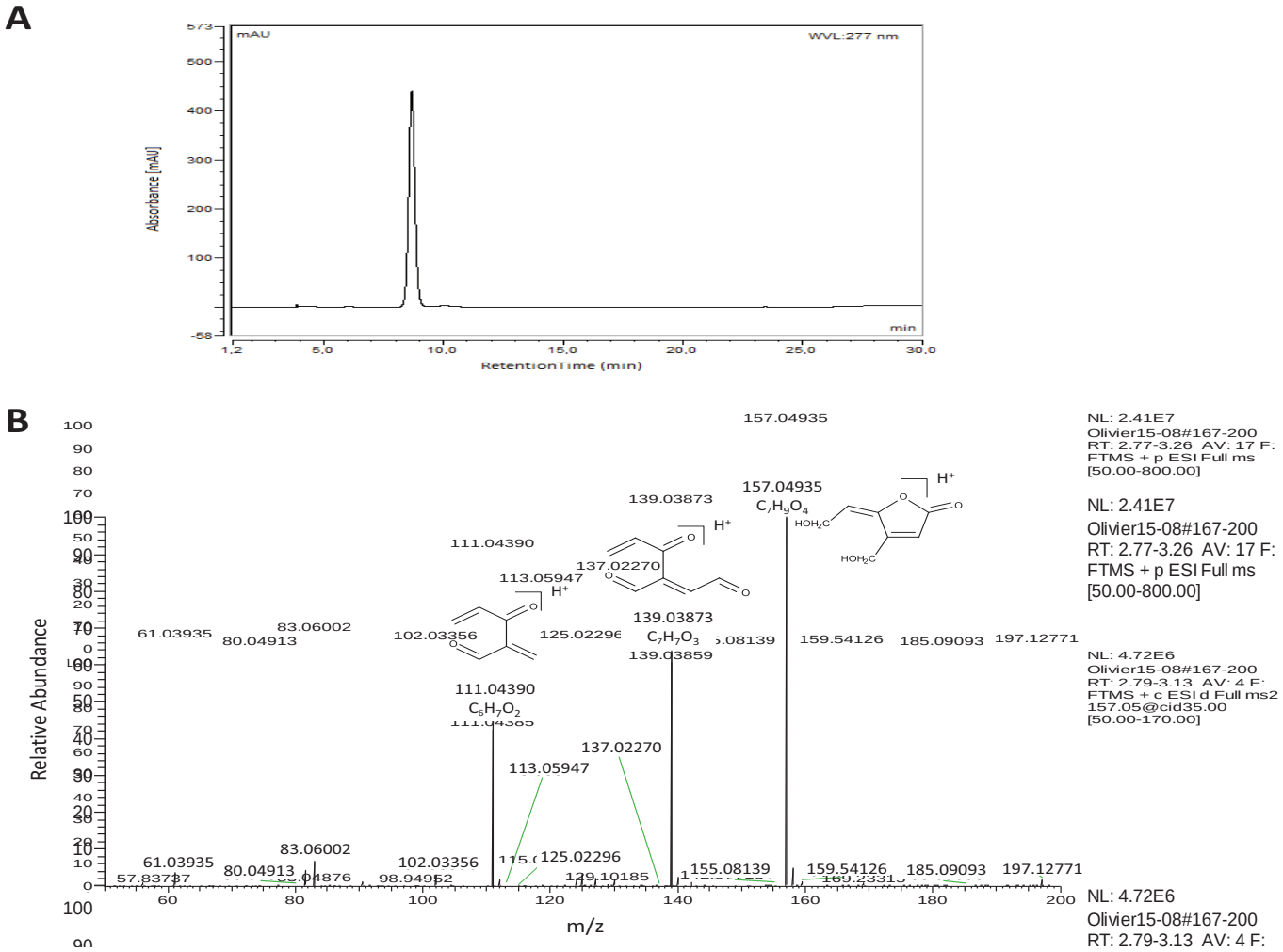


Figure 6 : (A) High-performance liquid chromatography (HPLC)-UV chromatograms of the PeΔ*patE*19 purified metabolite and (B) High resolution MS/MS spectra of ascladiol

The (E)-ascladiol initially isolated from *Aspergillus clavatus* (Suzuki et al. 1971) was identified as a direct precursor of patulin in cell-free extracts from *Penicillium griseofulvum* patulin-minus mutants (J1 and S11) (Sekiguchi et al. 1983). In addition to its biosynthetic role as a direct precursor, several studies revealed that ascladiol plays a role in the degradation pathway of patulin. The degradation of patulin into ascladiol was described during the fermentation of apple juice to cider using the commercial ascomycetous yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Moss and Long 2002). Accordingly, the presence of this degradation product in cider is an indicator of the use of poor quality fruits for its production. This transformation was also encountered by other fungal species belonging to *ascomyceta* and *basidiomyceta* phyla. In a recent study, a *Sporobolomyces* sp. strain from the subphylum *Pucciniomycotina* was found to be able to degrade patulin to form two different breakdown products, desoxypatulinic acid and (Z)-ascladiol (Ianiri et al. 2013). Some bacterial species such as *Gluconobacter oxydans*, a gram-negative aerobic bacterium isolated from rotted apple puree (Ricelli et al. 2007) was also reported to be able to produce ascladiol from patulin. Likewise, the patulin was biotransformed into E- and Z-ascladiol after an exposure to *Lactobacillus plantarum* cells (Hawar et al. 2013). In the same study, the ascladiol was further transformed, over the long term exposure to this biocontrol agent, into a novel metabolite, the hydroascladiol. Another patulin degradation product by the basidiomycetous yeast *Rhodotorula glutinis* LS11 strain (formerly identified as *Rhodotorula glutinis*) was detected *in vitro* and identified as desoxypatulinc acid (DPA) (Wright et al. 2007). This compound previously isolated from *Penicillium griseofulvum* (Scott et al. 1972) lacks both hemiacetal and lactone functions and thus is unable to react with thiol groups. In an assay with human lymphocytes, this biodegradation compound was significantly less toxic than patulin (Castoria et al. 2011). Unlike DPA, the E-ascladiol has no hemiacetal group but retains the integrity of the lactone ring in its chemical structure. This lack of hemiacetal functional group could possibly account for a slightly lesser toxicity of ascladiol compared to that of patulin. However, the latest study on the ascladiol toxicity dates from long time ago (Suzuki et al. 1971) and this finding has not been confirmed yet by subsequent studies.

3.4. Cytotoxicity's assessment after exposure of Caco-2 cell line to patulin and ascladiol

As the digestive system (stomach and intestine) is the main target of the potentially harmful effects of patulin (Mahfoud et al. 2002), the cytotoxicity of this mycotoxin and its degradation's

compound ascladiol, were evaluated on the human colon carcinoma cell line (Caco-2), using the highly sensitive CellTiter-Glo assay (Pinton et al. 2012).

Overall, the treatment with patulin caused a significant decrease in the number of viable cells in a dose-dependent manner. The lowest patulin concentration that had a significant effect on the viability of Caco-2 cells was 1 µM, causing a decrease of approximately 77 % of viable cells after 24 h of exposure. A concentration of 10 µM of patulin was found to be effective in decreasing the Caco-2 cell viability by 75 % after 24 h of exposure. On the contrary, the ascladiol was proven to be non-cytotoxic on the Caco-2 cell line over the incubation period and for the whole range of concentrations tested (Figure 7).

The patulin cytotoxicity has been previously assessed against the Caco-2 cell line. The exposure of this cell line to micromolar concentration of patulin resulted in a significant decrease of the transepithelial resistance (TER), however nonspecific cell damage was reported (Mahfoud et al. 2002). This finding has been later reproduced in subsequent studies (McLaughlin et al. 2009; Kawauchiya et al. 2011).

The patulin cytotoxicity reported in the current study matches with that observed by other researchers on various cell lines. Treatment with patulin concentrations of 1 and 2.5 µM has decreased the human promyelocytic leukemia cells (HL-60) viability to respectively 95.1 and 88 % of the control cells. In the same study, the viability of the human embryonic kidney cells (HEK 293) was decreased to respectively 70 and 55 % of the control cells after an exposure to 5 and 7.5 µM of patulin (Wu et al. 2008). These findings have been mainly attributed to the thiol-attacking and the Reactive Oxygen Species (ROS)-inducing abilities of this mycotoxin (Fliege and Metzler 2000b). A marked decrease of the Human lymphocytes viability to 25 % was also observed after 24h treatment with the highest patulin dose (100 µM) (Castoria et al. 2011). A similar result has been reported on the HepG2 cell line exposed to patulin concentrations ranging from 5 and 100 µM (Ayed-Boussema et al. 2011).

Evidence of lower toxicity in comparison with that of the parent mycotoxin has been reported for many of the mycotoxins' biodegradation compounds. The microbial transformation of the most potent natural carcinogen, aflatoxin B1, by the gram positive bacterium *Rhodococcus eythropolis*, leaded to the production of a less mutagenic compound (Alberts et al. 2006). The biodegradation of zearalenone by some microorganisms including *Rhizopus arrhizus* (El-Sharkaway et al. 1991), *Thamidium elegans* and *Mucor bainieri* (El-Sharkawy and Abul-Hajj 1987) has resulted in many metabolites that lack of an estrogenic activity. The decarboxylcitrin, which is the converted

product of the citrinin by the bacterium *Moraxella sp.* (Devi et al. 2006) has been reported as non-toxic when injected to mice (Jackson and Ciegler 1978). Likewise, many yeast strains were able to hydrolyze the amide bond of ochratoxin A yielding non-toxic products like ochratoxin α and phenylalanine (Schatzmayr et al. 2003; Molnar et al. 2004; Abrunhosa et al. 2010). In the same manner, some enterobacterial species including *Serratia, Clostridium, Citrobacter* and *Enterococcus* have been found to efficiently detoxify the deoxynivalenol (DON) under aerobic conditions by leading to De-epoxy deoxynivalenol (DOM-1)(Islam et al. 2012). The latter showed a 54 times decrease in potency compared to the parent compound (Sundstøl Eriksen et al. 2004). Along the same line, Grenier et al. (2012) have shown that the hydrolyzed fumonisin B_1 (HFB_1), obtained by the consecutive action of two bacterial enzymes on the mycotoxin fumonisin B_1, presents a low intestinal and hepatic toxicity compared to the parent molecule.

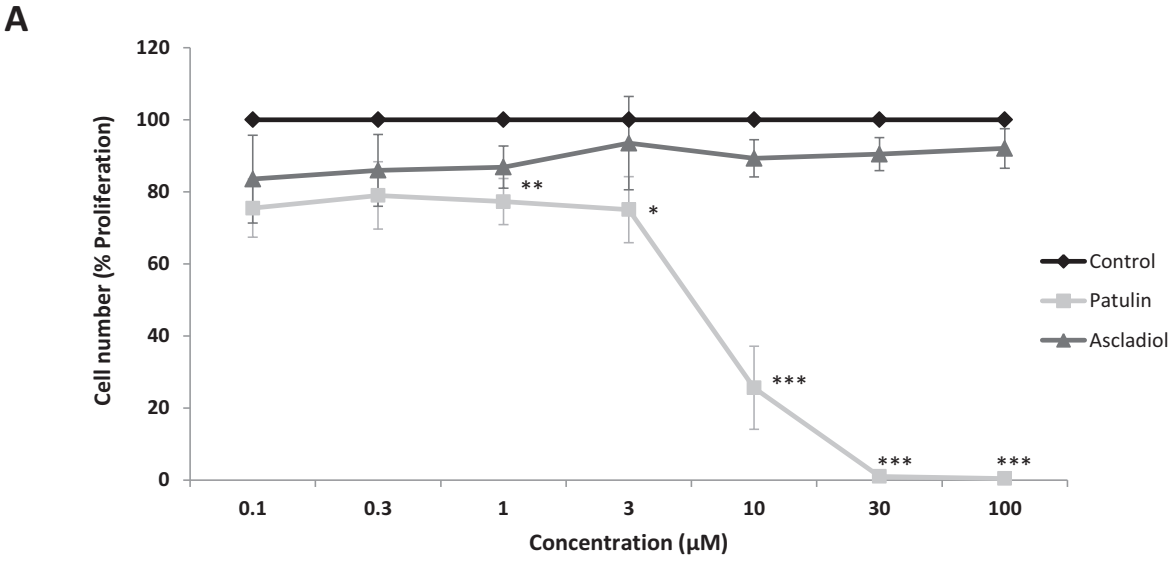
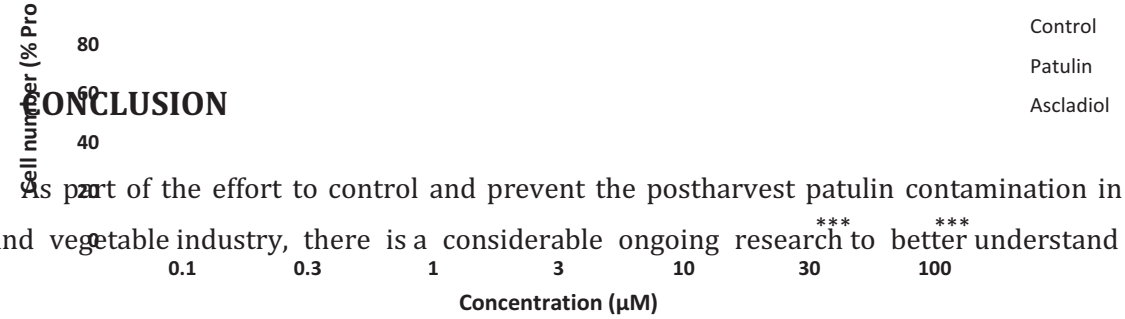


Figure 7 : Percentage of proliferation of Caco-2 cells treated with increasing patulin and ascladiol concentrations determined by CellTiter-Glo assay.

The percentage of proliferation of 100 % was defined for untreated cells and all other values are in reference to this value. The proliferation percentages are expressed as mean ± SEM of 3 independent experiments. The one-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine the significance of the patulin and ascladiol treatments: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.



4. CONCLUSION

As part of the effort to control and prevent the postharvest patulin contamination in the fruit and vegetable industry, there is a considerable ongoing research to better understand the

biosynthesis of this mycotoxin on both molecular and chemical levels. A gene cluster containing 15 open reading frames (ORFs) has been recently sequenced and analyzed for the biosynthesis of patulin from *Penicillium expansum* (Tannous et al. 2014). However, biosynthetic functions for only five of the fifteen genes have been elucidated to date. Most of the data regarding the enzymatic aspects of the patulin pathway have been provided in *A. clavatus* and other less-problematic species including *Penicillium griseofulvum* and *Byssochlamys nivea*. None of the characterization work has been previously conducted in *P. expansum*.

In this work, the *patE* gene which encodes a putative GMC oxidoreductase was disrupted in *P. expansum*, and the resulting knockout mutant shows a high accumulation of ascladiol, the direct patulin precursor. This finding provides a clear evidence that the last step in the patulin biosynthetic pathway is catalyzed by the PATE enzyme. Furthermore, this work provides the first clear evidence that ascladiol which is also a detoxification product of patulin do not show any cytotoxicity on the human intestinal Caco-2 cell line in comparison with the parental mycotoxin that exhibited a high cytotoxicity even at low micromolar levels. Taking this result into consideration, the cider intake appears to be less worrisome than the apple juice intake, since cider is expected to contain more ascladiol than patulin, that is usually found in infinitesimal quantities compared to apple juices (Harris et al. 2009). However, additional ascladiol toxicity studies should be undertaken *in vivo* to ensure the safety of this degradation product.

REFERENCES

Abrunhosa, L., R. R. M. Paterson and A. Venâncio (2010). "Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination." Toxins **2**(5): 1078-1099.

Alberts, J. F., Y. Engelbrecht, P. S. Steyn, W. H. Holzapfel and W. H. Van Zyl (2006). "Biological degradation of aflatoxin B_1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures." International Journal of Food Microbiology **109**(1): 121-126.

Anderson, J. A. and C. H. Chung (1990). "Conversion of versiconal acetate to versiconal and versicolorin C in extracts from *Aspergillus parasiticus*." Mycopathologia **110**(1): 31-35.

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**(5): 1738-1747.

Ayed-Boussema, I., H. Abassi, C. Bouaziz, W. B. Hlima, Y. Ayed and H. Bacha (2011). "Antioxidative and antigenotoxic effect of vitamin E against patulin cytotoxicity and genotoxicity in HepG2 cells." Environmental Toxicology **28**(6): 299-306.

Beck, J., S. Ripka, A. Siegner, E. Schiltz and E. Schweizer (1990). "The multifunctional 6-methylsalicylic acid synthase gene of *Penicillium patulum*." European Journal of Biochemistry **192**(2): 487-498.

Cano, P. M., E. L. Jamin, S. Tadrist, P. Bourdaud'hui, M. Péan, L. Debrauwer, I. P. Oswald, M. Delaforge and O. Puel (2013). "New untargeted metabolic profiling combining mass spectrometry and isotopic labeling: Application on *Aspergillus fumigatus* grown on wheat." Analytical Chemistry **85**(17): 8412-8420.

Castoria, R., L. Mannina, R. Durán-Patrón, F. Maffei, A. P. Sobolev, D. V. De Felice, C. Pinedo-Rivilla, A. Ritieni, R. Ferracane and S. A. I. Wright (2011). "Conversion of the mycotoxin patulin to the less toxic desoxypatulinic acid by the biocontrol yeast *Rhodosporidium kratochvilovae* strain LS11." Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**(21): 11571-11578.

Devi, P., C. G. Naik and C. Rodrigues (2006). "Biotransformation of citrinin to decarboxycitrinin using an organic solvent-tolerant marine bacterium, *Moraxella sp.* MB1." Marine Biotechnology **8**(2): 129-138.

Dewick, P. M. (2002). Medicinal natural products: A biosynthetic approach, John Wiley & Sons.

Dijkman, W. P. and M. W. Fraaije (2014). "Discovery and characterization of a 5-hydroxymethylfurfural oxidase from *Methylovorus sp.* strain MP688." Applied and Environmental Microbiology **80**(3): 1082-1090.

Dombrink-Kurtzman, M. A. and A. E. Engberg (2006). "*Byssochlamys nivea* with patulin-producing capability has an isoepoxydon dehydrogenase gene with sequence homology to *Penicillium expansum* and *P. griseofulvum*." Mycological research **110**(9): 1111-1118.

Dombrink-Kurtzman, M. A. and A. E. McGovern (2007). "Species-specific identification of *Penicillium* linked to patulin contamination." Journal of Food Protection **70**(11): 2646-2650.

El-Sharkaway, S. H., M. I. Selim, M. S. Afifi and F. T. Halaweish (1991). "Microbial transformation of zearalenone to a zearalenone sulfate." Applied and Environmental Microbiology **57**(2): 549-552.

El-Sharkawy, S. and Y. Abul-Hajj (1987). "Microbial transformation of zearalenone, I. Formation of zearalenone-4-O-β-glucoside." Journal of Natural Products **50**(3): 520-521.

Escoula, L., M. Thomsen, D. Bourdiol, B. Pipy, S. Peuriere and F. Roubinet (1988). "Patulin immunotoxicology: effect on phagocyte activation and the cellular and humoral immune system of mice and rabbits." International Journal of Immunopharmacology **10**(8): 983-989.

Etxebeste, O., E. Herrero-García, M. S. Cortese, A. Garzia, E. Oiartzabal-Arano, V. De los Ríos, U. Ugalde and E. A. Espeso (2012). "GmcA Is a Putative Glucose-Methanol-Choline Oxidoreductase Required for the Induction of Asexual Development in *Aspergillus nidulans*." PloS One **7**(7): e40292.

Fliege, R. and M. Metzler (2000a). "Electrophilic properties of patulin. Adduct structures and reaction pathways with 4-bromothiophenol and other model nucleophiles." Chemical Research in Toxicology **13**(5): 363-372.

Fliege, R. and M. Metzler (2000b). "Electrophilic properties of patulin. N-acetylcysteine and glutathione adducts." Chemical Research in Toxicology **13**(5): 373-381.

Glaser, N. and H. Stopper (2012). "Patulin: Mechanism of genotoxicity." Food and Chemical Toxicology **50**(5): 1796-1801.

Grenier, B., A.-P. F. Bracarense, H. E. Schwartz, C. Trumel, A.-M. Cossalter, G. Schatzmayr, M. Kolf-Clauw, W.-D. Moll and I. P. Oswald (2012). "The low intestinal and hepatic toxicity of hydrolyzed fumonisin B_1 correlates with its inability to alter the metabolism of sphingolipids."Biochemical Pharmacology **83** (10): 1465-1473.

Harris, K. L., G. Bobe and L. D. Bourquin (2009). "Patulin surveillance in apple cider and juice marketed in Michigan." Journal of Food Protection **72**(6): 1255-1261.

Hawar, S., W. Vevers, S. Karieb, B. K. Ali, R. Billington and J. Beal (2013). "Biotransformation of patulin to hydroascladiol by *Lactobacillus plantarum*." Food Control **34**(2): 502-508.

Hsieh, D. P. H., C. C. Wan and J. A. Billington (1989). "A versiconal hemiacetal acetate converting enzyme in aflatoxin biosynthesis." Mycopathologia **107**(2-3): 121-126.

Ianiri, G., A. Idnurm, S. A. Wright, R. Durán-Patrón, L. Mannina, R. Ferracane, A. Ritieni and R. Castoria (2013). "Searching for Genes Responsible for Patulin Degradation in a Biocontrol Yeast Provides Insight into the Basis for Resistance to This Mycotoxin." Applied and Environmental Microbiology **79** (9): 3101-3115.

International Agency for Research on Cancer (1985). "Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation." Apresentado em: IARC Working Group on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: some Naturally Occurring and Synthetic Food Components, 1985.

Islam, R., T. Zhou, J. Christopher Young, P. Goodwin and K. Peter Pauls (2012). "Aerobic and anaerobic de-epoxydation of mycotoxin deoxynivalenol by bacteria originating from agricultural soil." World Journal of Microbiology and Biotechnology **28**(1): 7-13.

Jackson, L. K. and A. Ciegler (1978). "Production and analysis of citrinin in corn." Applied and Environmental Microbiology **36**(3): 408-411.

Kawauchiya, T., R. Takumi, Y. Kudo, A. Takamori, T. Sasagawa, K. Takahashi and H. Kikuchi (2011). "Correlation between the destruction of tight junction by patulin treatment and increase of phosphorylation of ZO-1 in Caco-2 human colon cancer cells." Toxicology Letters **205**(2): 196-202.

Lin, B.-K. and J. A. Anderson (1992). "Purification and properties of versiconal cyclase from *Aspergillus parasiticus*." Archives of Biochemistry and Biophysics **293**(1): 67-70.

Llewellyn, G. C., J. A. McCay, R. D. Brown, D. L. Musgrove, L. F. Butterworth, A. E. Munson and K. L. White Jr (1998). "Immunological evaluation of the mycotoxin patulin in female b6C3F_1 mice." Food and Chemical Toxicology **36**(12): 1107-1115.

Lykakis, I. N., I.-P. Zaravinos, C. Raptis and M. Stratakis (2009). "Divergent Synthesis of the Co-isolated Mycotoxins Longianone, Isopatulin, and (Z)-Ascladiol via Furan Oxidation." The Journal of Organic Chemistry **74**(16): 6339-6342.

Mahfoud, R., M. Maresca, N. Garmy and J. Fantini (2002). "The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinal epithelium: mechanism of action of the toxin and protective effects of glutathione." Toxicology and Applied Pharmacology **181**(3): 209-218.

McCormick, S. P. (2013). "Microbial detoxification of mycotoxins." Journal of Chemical Ecology **39**(7): 907-918.

McLaughlin, J., D. Lambert, P. J. Padfield, J. P. H. Burt and C. A. O'Neill (2009). "The mycotoxin patulin, modulates tight junctions in caco-2 cells." Toxicology in vitro **23**(1): 83-89.

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): 275-84.

Molnar, O., G. Schatzmayr, E. Fuchs and H. Prillinger (2004). "*Trichosporon mycotoxinivorans sp.* nov., A New Yeast Species Useful in Biological Detoxification of Various Mycotoxins." Systematic and Applied Microbiology **27**(6): 661-671.

Morales, H., V. Sanchis, J. Coromines, A. J. Ramos and S. Marín (2008). "Inoculum size and intraspecific interactions affects *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in apples." Food Microbiology **25**(2): 378-385.

Moss, M. O. and M. T. Long (2002). "Fate of patulin in the presence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Food Additives & Contaminants **19**(4): 387-399.

Pinton, P., D. Tsybulskyy, J. Laffitte, P. Callu, F. Lyazhri, F. Grosjean, A.-P. Bracarense, K.-C. Martine and I. P. Oswald (2012). "Toxicity of deoxynivalenol and its acetylated derivatives on the intestine: differential effects on morphology, barrier function, tight junctions proteins and MAPKinases."Toxicological Sciences: kfs239.

Puel, O., P. Galtier and I. P. Oswald (2010). "Biosynthesis and toxicological effects of patulin." Toxins **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): 131-139.

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): 550-553.

Ricelli, A., F. Baruzzi, M. Solfrizzo, M. Morea and F. P. Fanizzi (2007). "Biotransformation of patulin by *Gluconobacter oxydans*." Applied and Environmental Microbiology **73**(3): 785-792.

Schatzmayr, G., D. Heidler, E. Fuchs, S. Nitsch, M. Mohnl, M. Täubel, A. P. Loibner, R. Braun and E. M. Binder (2003). "Investigation of different yeast strains for the detoxification of ochratoxin A." Mycotoxin Research **19**(2): 124-128.

Scott, P. M., B. Kennedy and W. Van Walbeek (1972). "Desoxypatulinic acid from a patulin-producing strain of *Penicillium patulum*." Cellular and Molecular Life Sciences **28**(10): 1252-1252.

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): 1939-1942.

Silva, J. C., R. E. Minto, C. E. Barry, K. A. Holland and C. A. Townsend (1996). "Isolation and Characterization of the Versicolorin B Synthase Gene from *Aspergillus parasiticus*: Expansion of the aflatoxin B1 biosynthetic gene cluster." Journal of Biological Chemistry **271**(23): 13600-13608.

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.

Steyn, P. S. (1991). "The biosynthesis of polyketide-derived mycotoxins." Journal of environmental pathology, toxicology and oncology: official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer **11**(1): 47-59.

Sundstøl Eriksen, G., H. Pettersson and T. Lundh (2004). "Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites." Food and Chemical Toxicology **42**(4): 619-624.

Suzuki, T., H. Tanabe and M. Takeda (1971). "A new mycotoxin produced by *Aspergillus clavatus*." Chemical & pharmaceutical bulletin **19**(9): 1786-1788.

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.

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.

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.

Welke, J. E., M. Hoeltz, H. A. Dottori and I. B. Noll (2009). "Effect of processing stages of apple juice concentrate on patulin levels." Food Control **20**(1): 48-52.

Wright, S. A. I., G. Ianiri, D. V. De Felice, R. Castoria and P. Berolini (2007). A rapid assay for patulin degradation by the basidiomycetous yeast *Rhodotorula glutinis* strain LS11. Novel approaches for the control of postharvest diseases and disorders. Proceedings of the International Congress, Bologna, Italy, 3-5 May, 2007., CRIOF, University of Bologna.

Wu, T.-S., Y.-C. Liao, F.-Y. Yu, C.-H. Chang and B.-H. Liu (2008). "Mechanism of patulin-induced apoptosis in human leukemia cells (HL-60)." Toxicology Letters **183**(1): 105-111.

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): 1253-1262.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

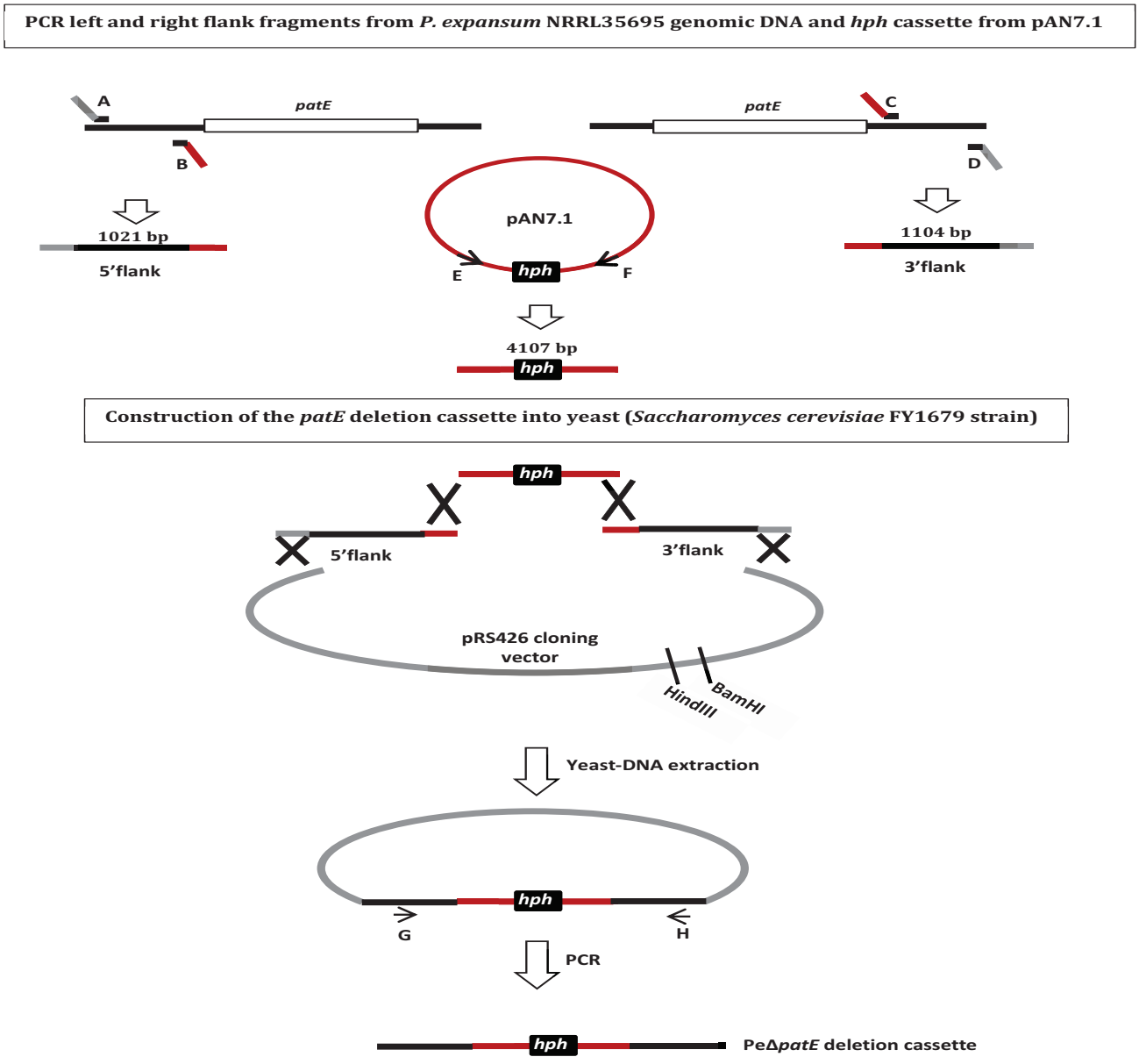


Figure S1: Strategy employed to construct the deletion cassette PeΔ*patE*.

The 5' and 3' flanking regions of the *patE* gene were amplified from the wild-type stain NRRL 35695 using respectively the primers A, B and C, D. The 5'-extremities of the primers A and D are identical to the extremities of the pRS426 cloning vector, while those of the primers B and C are identical to the extremities of the PCR product generated by the primers E and F. The hygro resistance cassette (hph) was amplified from pAN7.1 vector using primers E and F. The primers G and H were used to amplify the deletion cassette PeΔ*patE* from the DNA transformed *S. cerevisiae*. A: 5fdebPatEPex; B: DebPatEPex1Rhygro; C: FinPatEPex1Fhygro; D: 3rfinPatEPex; E: hphF1; F: hphR1; G: dPatE-NestedF and H: dPatE-NestedR.



CHAPITRE 4

Développement d'un système qPCR pour la quantification de *P. expansum* et la patuline dans les pommes

Ce dernier chapitre du travail expérimental est également présenté sous forme d'article qui a été accepté pour publication dans *Food Microbiology* en Mars 2015. Cet article rapporte une application directement liée aux connaissances acquises sur le cluster des gènes de la patuline chez *P. expansum* et présentées dans le chapitre 2 de ce manuscrit de thèse. Ces connaissances ont été exploitées sous la forme du développement d'un système PCR en temps réel, permettant la détection et la quantification *in vivo* du champignon *P. expansum* avec une grande spécificité.

4.1. Résumé de l'étude

La patuline est une mycotoxine très stable, pour laquelle aucun processus crédible d'élimination garantissant un produit non endommagé n'est présent à ce jour. Etant donné sa grande stabilité aux différents traitements technologiques que subissent les pommes, la patuline peut ensuite être retrouvée dans tous les produits issus de la transformation de cette matière première. Pour cela un intérêt particulier est porté aux stratégies de détection précoce des champignons producteurs de patuline, en vue de prévenir l'apparition de cette mycotoxine dans la chaîne alimentaire. A cet égard, les techniques moléculaires de détection et d'identification des mycètes se révèlent particulièrement prometteuses comparées aux méthodes traditionnelles basées sur la mise en culture et la reconnaissance de la morphologie spécifique du champignon. Ces dernières années, la PCR en temps réel (qPCR) a émergé comme un outil très robuste, garantissant la détection et la quantification rapide et spécifique des agents pathogènes fongiques contaminants de divers produits alimentaires. Concernant la patuline, le travail pionnier de Rodríguez et al. (2011) est resté le seul à décrire la mise au point d'un système de qPCR élaboré sur la base du gène *idh* (*patN*), impliqué dans la voie de biosynthèse de cette toxine, pour cibler les espèces fongiques productrices de patuline.

L'objectif de cette partie de la thèse est la mise au point d'un système de PCR en temps réel pour la détection quantitative et spécifique du champignon représentant le plus grand défi pour la filière ''pomme'', *P. expansum.* La connaissance nouvellement acquise des séquences des gènes du cluster de la patuline chez cette espèce a servi grandement dans le développement de cet outil prévisionnel, notamment du point de vue choix du gène sachant que l'identification du cluster complet met à notre disposition plusieurs gènes candidats potentiels. La logique a été de choisir un gène codant pour une enzyme de grande spécificité. L'utilisation du gène *patF* a été envisageable

dans cette perspective compte tenu du fait que ce gène est présent dans un nombre très limité d'espèces fongiques, ce qui accroît la spécificité de ces analyses vis-à-vis de l'espèce d'intérêt.

Pour répondre à cet objectif, une paire d'amorces spécifiques à *P. expansum* (patF-F/patF-R) a été dessinée à partir de la séquence du gène *patF*, impliqué dans la biosynthèse de la patuline. La spécificité du couple d'amorces vis-à-vis de l'espèce visée a été testée et confirmée en PCR conventionnelle avant de l'appliquer en qPCR. Ces amorces ont été par la suite utilisées avec succès dans un système de PCR en temps réel pour la quantification directe de ce champignon dans les pommes. Cette étude présente, dans un deuxième temps, une corrélation moyenne de R^2= 0,701 entre la quantité d'ADN de *P. expansum* et le taux de patuline estimé par HPLC sur la base de 28 échantillons de pommes infectées artificiellement.

Cette étude est la première à appliquer la PCR en temps réel pour la discrimination et la quantification du champignon *P. expansum* dans les pommes. Comparée aux techniques microbiologiques appliquées auparavant, la méthode développée dans la présente étude apporte un avantage surtout en termes de spécificité, de sensibilité et de rapidité des analyses. De plus, grâce à la corrélation développée entre la quantité d'ADN de *P. expansum* et les teneurs en patuline, la quantification précoce de la contamination des pommes par cette espèce sera un indicateur du niveau de contamination en patuline. Cette corrélation empêchera l'utilisation continue de grandes quantités de solvants organiques employées lors des dosages par HPLC ou LC-MS de patuline, dont l'élimination est relativement coûteuse et pourra s'appliquer tout le long de la chaine alimentaire pour garantir la salubrité microbiologique des aliments à risque.

4.2. Article: Development of a Real-Time PCR assay for *Penicillium expansum* quantification and patulin estimation in apples ***(ARTICLE 5)***

(Voir le manuscrit qui suit)

Food Microbiology 50 (2015) 28–37

Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

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

Development of a real-time PCR assay for *Penicillium expansum* quantification and patulin estimation in apples

Joanna Tannous [a, b, c], Ali Atoui [d, *], André El Khoury [a], Sally Kantar [a], Nader Chdid [a], Isabelle P. Oswald [b, c], Olivier Puel [b, c], Roger Lteif [a]

[a] Université Saint-Joseph, Centre d'Analyses et de Recherche (Faculté des Sciences), Campus des Sciences et Technologies, Mar Roukos, Mkallès, P.O Box 11-514, Riad El Solh, 1107 2050 Beirut, Lebanon
[b] INRA, UMR 1331 Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, 180 Chemin de Tournefeuille, F-31027 Toulouse, Cedex, France
[c] Université de Toulouse III, ENVT, INP, UMR 1331, Toxalim, F-31076, Toulouse, France
[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 29 October 2014
Received in revised form
19 January 2015
Accepted 2 March 2015
Available online 10 March 2015

Keywords:
Patulin
Penicillium expansum
Specific primers
Real-time PCR (SybrGreen)
IAC
Apples

ABSTRACT

Due to the occurrence and spread of the fungal contaminants in food and the difficulties to remove their resulting mycotoxins, rapid and accurate methods are needed for early detection of these mycotoxigenic fungi. The polymerase chain reaction and the real time PCR have been widely used for this purpose. Apples are suitable substrates for fungal colonization mostly caused by *Penicillium expansum*, which produces the mycotoxin patulin during fruit infection. This study describes the development of a real-time PCR assay incorporating an internal amplification control (IAC) to specifically detect and quantify *P. expansum*. A specific primer pair was designed from the *patF* gene, involved in patulin biosynthesis. The selected primer set showed a high specificity for *P. expansum* and was successfully employed in a standardized real-time PCR for the direct quantification of this fungus in apples. Using the developed system, twenty eight apples were analyzed for their DNA content. Apples were also analyzed for patulin content by HPLC. Interestingly, a positive correlation ($R^2 = 0.701$) was found between *P. expansum* DNA content and patulin concentration. This work offers an alternative to conventional methods of patulin quantification and mycological detection of *P. expansum* and could be very useful for the screening of patulin in fruits through the application of industrial quality control.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Unwanted fungal growth and mycotoxins contamination have become major problems in the Food chain (Negedu et al., 2011). Nowadays, the mycotoxins' topic has reached its paroxysm since these toxic molecules are being detected in the majority of food commodities. According to the Food and Agriculture Organization (FAO), approximately 25% of the world's food crops are annually contaminated with mycotoxins (Adams and Motarjemi, 1999; Negedu et al., 2011; Upadhaya et al., 2010). Among these well studied molecules, patulin is a toxic extrolite produced as a secondary metabolite by numerous species of filamentous fungi belonging to the genera *Penicillium*, *Aspergillus*, *Byssochlamys* and *Paecylomyces* (Moake et al., 2005; Puel, 2007). The genus *Penicillium* appears to be the major patulin producer, of which *Penicillium expansum* is by far the most worrisome species and the most commonly associated with patulin incidence (ElHariry et al., 2011; Morales et al., 2007). Although the presence of patulin is reported in various food commodities, its occurrence in pomaceous fruits, especially in apples and byproducts, remains the major concern (Baert et al., 2012; Salomão et al., 2009). Patulin has been revealed as acutely and chronically toxic causing genotoxic, cytotoxic, mutagenic as well as immunotoxic health effects (Puel et al., 2010). Due to its related hazards, the European Union has set maximum acceptable levels of 50, 25 and 10 μg patulin/Kg, respectively for fruit juices, nectars and fermented apple beverages, solid apple products and apple-based products for infants and young children (European Commission Regulation No 1425/2003 and No 1881/2006).

Lately, numerous surveys of patulin contamination levels in apples and derived products have been conducted in various countries around the world, including Turkey (Gökmen and Acar, 1998), Brazil

* Corresponding author. Tel.: +961 1 450 811; fax: +961 1 450 810.
E-mail address: a.atoui@cnrs.edu.lb (A. Atoui).

http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.03.001
0740-0020/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

(De Sylos, 1999; Iha and Sabino, 2008), South Africa (Leggott and Shephard, 2001), Belgium (Tangni et al., 2003), Iran (Majid Cheraghali et al., 2005), Italy (Spadaro et al., 2007), India (Saxena et al., 2008), Spain (Cano-Sancho et al., 2009; Murillo-Arbizu et al., 2009), Argentina (Funes and Resnik, 2009), Portugal (Barreira et al., 2010), China (Yuan et al., 2010), Saudi Arabia (Al-Hazmi, 2010), Tunisia (Zaied et al., 2013) and others. Most of these surveys were performed by a direct extraction of the toxin and revealed high percentages of contaminated samples, some of which have exceeded the tolerated patulin levels. As the other common mycotoxins, patulin is an appreciably stable compound, for which no credible removal process that guarantees a non-damaged product is present to date. Therefore, it is important to prevent its presence in the food chain by ensuring a fast and specific method to early detect the potential producing fungi before reaching the toxin's unacceptable level or even prior its synthesis. In this regard, there has been a recent wide-spread interest in molecular techniques such as the polymerase chain reaction (PCR) that ensures the fastest detection of fungal contamination in comparison with the conventional time consuming microbiological analysis. Several publications described the practical use of PCR in detecting mycotoxigenic fungi in food samples (Luque et al., 2011; Manonmani et al., 2005; Noorbakhsh et al., 2009; Shapira et al., 1996; Spadaro et al., 2011). With the continuous research improvement, the food sector has integrated the use of real time PCR (qPCR) and lately the multiplex real time PCR as new useful tools for detecting as well as quantifying the DNA of a specific or a broad-spectrum of mycotoxigenic species in a wide variety of food products (Hayat et al., 2012; Konietzny and Greiner, 2003; Rodríguez et al., 2012; Sardiñas et al., 2011; Selma et al., 2008; Vegi and Wolf-Hall, 2013). Regarding patulin, some conventional PCR assays have been reported for the detection of patulin-producing molds (Dombrink-Kurtzman, 2007; Paterson, 2004; Paterson et al., 2000). Recently, Rodríguez et al. (2011) reported the development of the first molecular method allowing the quantification of patulin-producing species in different food matrices by real-time PCR assay, using SYBR Green and TaqMan. However to our knowledge, no qPCR protocol has been elaborated yet to selectively detect and quantify the species with the highest economic impact on apples regarding patulin production, *P. expansum*.

In literature, the use of the qPCR technique was not only restricted to the quantification of the fungal contamination level in foodstuffs but a direct application of this method was also described to estimate the content of the associated mycotoxin level. In this regard, a number of papers have demonstrated the correlation between the amount of toxin and fungal DNA content (Atoui et al., 2007, 2012; Fredlund et al., 2008; Mulè et al., 2006; Schnerr et al., 2002). There are however no previous studies describing the development of such correlation to estimate the patulin levels in apples. Consequently, the objectives of the present work were to develop a quantitative real-time PCR assay to quantify the DNA amounts of the main patulin producer *P. expansum* in apple samples and to correlate *P. expansum* DNA with patulin content in apples in order to have an approximately estimation of the patulin contamination level.

2. Material and methods

2.1. Fungal strains

The fungal reference strains used throughout this study (Table 1) were obtained from the research unit TOXALIM of the National Institute for Agricultural Research (INRA), Toulouse, France. The isolates were maintained by regular subculturing on Potato Dextrose Agar (PDA) (Biolife, Milano, Italy) at 25 °C for 7 days and then stored as spore suspension in 15% glycerol at −80 °C.

Table 1
Fungal strains used in this study to test the specificity of the primer pair patF-F/patF-R.

Strain	Reference number
1 *Penicillium expansum*	NRRL 35694[a]
2 *Penicillium expansum*	NRRL 35695
3 *Penicillium griseofulvum*	NRRL 2159A
4 *Penicillium paneum*	M515[b]
5 *Penicillium carneum*	M521
6 *Penicillium chrysogenum*	NRRL 35692
7 *Penicillium glabrum*	NCPT 279[c]
8 *Penicillium nordicum*	NRRL 3711
9 *Penicillium vulpinum*	NRRL 2031
10 *Penicillium roqueforti*	P4 z88[d]
11 *Penicillium glandicola*	NRRL 2036
12 *Penicillium claviforme*	NCPT 39
13 *Penicillium brevicompactum*	NCPT 398
14 *Aspergillus clavatus*	NRRL 1980
15 *Aspergillus clavatus*	NRRL 1
16 *Aspergillus flavus*	NRRL 62477
17 *Aspergillus parasiticus*	NCPT 217
18 *Aspergillus fumigatus*	NRRL 35693
19 *Aspergillus niger*	NCPT 209
20 *Byssochlamys nivea*	NRRL 2615
21 *Byssochlamys nivea*	ATCC 24008[e]
22 *Byssochlamys fulva*	MUCL 14267[f]

[a] NRRL, Northern Regional Research Laboratory, Illinois, USA.
[b] Provided by M. Olsen, National Food Administration, Sweden.
[c] NCPT, New Collection Pharmacology-Toxicology Laboratory, INRA, France.
[d] Provided by J. Bauer, Technical University Munich.
[e] ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, USA.
[f] MUCL, Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain, Louvain, Belgium.

2.2. DNA isolations from pure fungal mycelia

All fungal strains listed in Table 1 were freshly cultivated on PDA media (Fluka, Saint-Quentin Fallavier, France) and allowed to grow for 7 days at 25 °C to enhance sporulation. The cultures were then used to inoculate with 10^5 spores a 250 ml Erlenmeyer flask containing 100 mL of Yeast extract Sucrose (YES) broth and incubated at room temperature under constant agitation for 4 days. Each liquid culture was then filtered through Whatman No. 42 filter paper and the mycelium was ground to fine powder under liquid nitrogen. Genomic DNA of the strains was obtained using the method described by Gardes and Bruns (1993) with some modifications. In this method, 200 mg of powdered mycelium was collected into microfuge tubes, homogenized with 700 μL of lysis buffer [2% CTAB (Amresco, Solon, USA), 1.4 M NaCl (Merck, Darmstadt, Germany), 20 mM EDTA pH 8 (Fisher Scientific, Illkirch, France), 100 mM Tris–HCl pH 8 (Biobasic Inc, Mundolsheim, 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 1 min and the supernatant was taken after centrifugation at 13,000 rpm for 15 min at 4 °C. The DNA was precipitated with an equal volume of ice-cold isopropanol (Amresco, Solon, USA) and incubated overnight at −20 °C. After incubation, the sample was again centrifuged at 13,000 rpm 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 the Multiskan GO Microplate spectrophotometer (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France).

2.3. Artificial contamination and incubation of apple samples

Twenty eight apples of different varieties (Fuji, Royal Gala and Golden Delicious), not showing any symptoms of fungal attack were randomly collected from the Lebanese markets. They were

surface-sterilized with 70% ethanol to exclude the presence of wild-type fungi on fruit. Apples were then artificially contaminated in the laboratory by injecting with a sterile syringe, at a depth of 0.5 cm, different volumes of an aqueous spore suspension of a *P. expansum* strain (NRRL 35695) (10^8 spores/mL), and incubated at room temperature until a desirable extent of decay was observed. Once moldy, all the apples were aseptically cut into small pieces and ground in 400 mL BagLight (Interscience, Paris, France) using a pulsifier equipment (Interscience, Paris, France). Apple puree was then collected into 150 mL sterile disposable flasks and frozen at −20 °C for later use.

2.4. DNA isolations from apple samples

DNA extractions from apple samples were performed according to the protocol described by Rodríguez et al. (2011), with slight modifications. About 5 g of apple puree were weighted into a 50 mL Falcon flask. Ten milliliters of Tris–HCl buffer (pH 8) were added to each sample and vortexed for homogenization. Samples were then centrifuged at 8000 rpm for 10 min after being filtered through a gauze paper. The resulting pellet was suspended in 100 μL of sterile water pre-heated to 95 °C to release DNA and then cooled on ice for 10 min. The samples were later treated with 500 μL of lysis buffer (defined in paragraph 2.3) and 20 μL of proteinase K from *Tritirachium album* (Sigma–Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), incubated at 65 °C for 1 h and again centrifuged at 8000 rpm for 10 min. The supernatant was transferred to a new micro centrifuge tube to which 500 μL of chloroform were added. The solution was thoroughly mixed then centrifuged at 13,000 rpm for 20 min at 4 °C. The upper layer was carefully transferred to a new micro centrifuge tube and 10 μL of RNase solution (Sigma–Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) were added before incubation at 37 °C for 1 h. An equal volume of chloroform was added, then the mix was vortexed and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min. The layer on top was again transferred to a new micro centrifuge tube. The DNA was precipitated with an equal volume of ice-cold isopropanol, and incubated overnight at −20 °C. The pellet obtained was rinsed with 70% ethanol, air-dried and suspended in 30 μL of sterile water. Before proceeding with the qPCR analysis, all the DNA samples were tested in conventional PCR to exclude false negative results due to inhibition by substances originating from the apple sample or due to other flaws during the qPCR reaction.

2.5. Design and evaluation of specific qPCR primers

In this study a *patF* gene (GenBank Acc No. AIG62137) involved in patulin biosynthesis in *P. expansum* was used as a target in order to design specific primer pair. A set of primer Pexp_patF_F/Pexp_patF_R was designed using the PrimerExpress 1.0 software (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). This set of primers amplified a PCR product of 92 bp. All the primers used were commercially synthesized by Sigma–Aldrich and their sequences are shown in Table 2. To determine specificity towards *P. expansum*, Pexp_patF_F/Pexp_patF_R was tested on total genomic DNA from target and non-target organisms (Table 1). All the PCR amplifications were performed in a total reaction volume of 50 μl consisting of 1 μl DNA template, 5 μl of 10× PCR buffer, 1.5 μl of 50 mM $MgCl_2$, 4 μl of dNTP (2.5 mM each) (Bio basic Inc, Mundolsheim, France), 1.5 μl of each primer, 0.5 μl of Taq DNA Polymerase, recombinant (Invitrogen, Saint Aubin, France) and H_2O up to 50 μl. Template DNA was initially denatured for 5 min at 94 °C. Subsequently, a total of 40 cycles of amplification were carried out in Eppendorf Mastercycler (Montesson, France). Each cycle consisted of denaturation for 45 s at 94 °C, primer annealing for 45 s at 65 °C and extension for 30 s at 72 °C. The last cycle was followed by a final extension at 72 °C for 10 min. Presence and absence of amplification bands for each species tested were visually noted and compared with the amplified gene fragment from *P. expansum*.

All genomic DNAs used in this work were tested for suitability for PCR amplification using primers TubF and TubR (Table 2) in the conditions indicated above.

Table 2
List of primers used in the study.

Primer	Sequence (5′–3′)
PatFdeb_F1[a]	CKCGSGTGAAGATGTCGATRAANGC
PatFdeb_R1	CCATTGTTCAGCTCRTAGAAGCCNCC
Pexp_patF_F	ATGAAATCCTCCCTGTGGGTTAGT
Pexp_patF_R	GAAGGATAATTTCCGGGGTAGTCATT
TubF	CTCGAGCGTATGAACGTCTAC
TubR	AAACCCTGGAGGCAGTCGC

[a] A "K" represents a nucleotide that could be either a G or a T; a "S" represents a nucleotide that could be either a C or a G; a "R" represents a nucleotide that could be either an A or a G and "N" represents any nucleotide.

2.6. Internal amplification control design

An internal amplification control (IAC) was designed to be included as a positive control in every reaction mixture, to ensure that a negative result would be due to the absence of target sequences rather than to inhibition of the PCR. The IAC consisted of the 92 bp DNA fragment amplified from the *patF* gene of *P. expansum*, using the Pexp_patF_F/Pexp_patF_R primers (Table 2). The IAC sequence was cloned into pCR2.1 TOPO vector (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and transferred into *E. coli* competent cells (Agilent TechnologiesLes Ulis, France), according to the manufacturer's instructions. The selection of recombinant clones was performed on ampicillin (100 μg/mL)-containing agar plates. The plasmid was later extracted from the *E. coli* cells using the standard alkaline lysis procedure (Sambrook et al., 1989). Positive clones were determined through screening by PCR, using the same set of primers. The IAC DNA concentration was determined spectrophotometrically at 260 nm and was stored at −20 °C. To determinate the lowest reproducible IAC concentration that amplified consistently and did not interfere with the amplification of the target sequence, seven serial dilutions from the plasmid DNA were tested in a 20 μL reaction mixture. Thus, the usage of 1 μL of IAC (0.2 pg/μL) that resulted in a Ct value of 31 was found to be the optimal condition to be used in order to exclude the risk of false negative results.

2.7. Real time PCR development and optimization

Before proceeding with Real-Time PCR assays, the primer set has been checked for the absence of primer dimers. Four combinations of 300 and 900 nM for each primer were tested in triplicate then the optimal combination was chosen.

Real-time PCR reactions were performed in an iCycler iQ5™ Real Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The PCR thermal cycling conditions were as follows: 95 °C for 3 min, 40 cycles of 95 °C for 20 s and 65 °C for 20 s (during which the fluorescence was measured). Following the final amplification cycle, a dissociation curve analysis was constructed by continuously measuring the fluorescence when heating from 55 to 95 °C at the rate of 0.5 °C per s in order to confirm the specificity of the amplification. Reactions were performed in a total volume of 20 μL consisting of 10 μL of Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green (Agilent Technologies, Courtaboeuf, France), 0.8 μL of each primer (300 nM), 0.3 μL of Reference dye (using a 1:500 dilution), 1 μL template DNA, 1 μL of IAC (0.2 pg/μL) and sterile water up to 20 μL. In order to

estimate the *P. expansum* DNA concentration from apples, a standard curve was generated. Ten-fold dilutions (ranging from 1 μg to 1 pg) of *P. expansum* (NRRL 35695) pure genomic DNA whose concentration was previously determined, were subjected to qPCR under the same conditions described above. Quantification values as well as the threshold cycle (Ct) values were automatically determined by the IQ5™ optical system software version 2 (Bio-Rad). The standard curve is a plot of the Ct versus log DNA concentration. In all the experiments, appropriate negative controls containing no template were subjected to the same procedure to exclude or detect any possible DNA contamination. In all the experiments, each sample was amplified in duplicate.

2.8. Extraction and analysis of patulin in apples

The cell wall of apples is a complex mixture of cellulose, hemicellulose, pectin and proteins. The particles smaller than 0.5 microns such as the patulin are very likely to be retained in the pectin net, hence the usage of pectinase while extracting patulin from apples is highly recommended and increases the recovery of the toxin. In this study, the apple puree samples were treated following the AOAC Official Method 2000.02 described by MacDonald et al. (2000) with slight modifications for patulin extraction. About 10 g of apple puree were weighed into a Falcon flask of 50 mL to which 150 μL of pectinase enzyme solution were added followed by 10 mL of H_2O. The mixture was thoroughly homogenized then retained overnight at room temperature. After incubation, samples were centrifuged at 4500 × g for 5 min and the supernatant was pipetted into a 250 mL flask and toughly macerated for 1 day in 50 mL of ethyl acetate. Afterward, the organic phase was recovered and evaporated to dryness under nitrogen stream. The dry extract is suspended in 500 μL of methanol and then filtered through a 0.45 μm syringe filter (Navigator, Huayuan Tianjin, China) into a clean 2 mL vial. The performance of the adopted extraction technique in terms of recovering patulin was assessed by the analysis of apples spiked with patulin concentration of 130 μg/kg of apple (6 independent replicates). Recovery was calculated as the relative difference between the observed and expected concentrations. One hundred microliter aliquots of these extracts were injected onto the Waters Alliance HPLC system (Saint-Quentin en Yvelines, France) for the quantitative determination of the patulin concentration. The patulin was detected with a Waters 2998 Photodiode Array Detector, using a 25 cm × 4.6 mm Supelco 5 μm Discovery C18 HPLC Column (Sigma–Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) at a flow rate of 1 mL/min. A gradient program was used with water (Eluent A) and acetonitrile HPLC grade (eluent B) and the following elution conditions: 0 min 5% B, 16 min 2% B, 20 min 60% B, 32 min 5% B. The presence of patulin was monitored at a 277 nm wavelength. A calibration curve was constructed with patulin standard (Sigma–Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) at concentrations ranging from 0.05 to 10 μg/mL. Accordingly, the patulin concentrations in the artificially contaminated apples were determined and results were expressed in μg/kg. The HPLC method was validated in terms of limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ). The LOD and LOQ of the method were calculated using the slope (S) of the calibration curve, obtained from linearity assessment, and the standard deviation of the response (SD). These values were determined as follows: LOD = 3.3 × SD/S, LOQ = 10 × SD/S.

2.9. Statistical analysis

Statistical analyses were performed to evaluate the significance of the correlation coefficient using the t-test. Statistical significance was set at $P \leq 0.001$.

3. Results

3.1. PCR primer design

The current knowledge of the completed sequence of patulin pathway gene cluster in *P. expansum* (Tannous et al., 2014) was invested in the development of a predictive tool based on real-time PCR for the early detection and quantification of *P. expansum* in apple samples. The selection of a highly specific gene to the patulin biosynthesis and not involved in other metabolic pathway remains the most logical. In this context, the selection of the *patF* gene was conceivable since its Blastn in Genbank reveals nucleotide sequence identity to those of only two fungal species (85% identity to *Penicillium digitatum* and 74% to *Aspergillus clavatus*) while the others are bacterial species. This finding leads to the hypothesis that the *patF* gene encodes an extremely rare enzyme, intensifying then the specificity of the developed molecular diagnosis. For a higher success in the design of the specific primer set to *P. expansum*, a partial region of the *patF* gene was amplified in other *Penicillium* related species (*Penicillium griseofulvum*, *Penicillium carneum* and *Penicillium paneum*) using degenerate primers designed on the basis of the *patF* gene sequence available in *P. digitatum* (Marcet-Houben et al., 2012; GenBank Acc No. PDIG_86350), *A. clavatus* (Artigot et al., 2009; GenBank Acc No. ACLA_093620) and *P. expansum* (Tannous et al., 2014; GenBank Acc No. AIG62137). The partial sequences of the *patF* gene amplified from the *Penicillium* species were deposited in the GenBank database under accession numbers KM980456 (*P. carneum* M521), KM980457 (*P. paneum* M515) and KM980458 (*P. griseofulvum* NRRL 2159A). All available sequences were aligned using the Clustal X software. On the basis of this alignment, a primer pair patF-F/patF-R specific to *P. expansum* that targets the less conserved region was subsequently chosen (Fig. 1). This set of primers amplified a product of 92 bp in *P. expansum*.

3.2. PCR reaction specificity

All extracted DNA from various mycotoxigenic fungi (Table 1) were used in the specificity validation of patF-F/patF-R. As illustrated in Fig. 2A, the two *P. expansum* isolates tested were amplified with patF-F/patF-R primer set, resulting in a single PCR product of 92 bp. These primers did not amplify the DNA extracted from the 20 other fungal strains (comprising 11 *Penicillium* strains, 6 *Aspergillus* strains and 3 *Byssochlamys* strains), whereas these DNAs were tested for their abilities to be amplified with the beta-tubulin primers and generated bands with the expected size of 340 bp (Fig. 2B).

3.3. Development of the qPCR assay for the specific quantification of *P. expansum*

After specificity validation of patF-F/patF-R primers two different primer concentrations (300 nM and 900 nM) and their combinations in an optimization matrix were investigated for real time PCR reactions. A combination of 300:300 nM of each primer was considered to be optimal where the following conditions were met: a low Ct value and the absence of primer dimers. The analytical sensitivity of the developed qPCR assay was determined using serially 10 fold diluted *P. expansum* pure genomic DNA ranging from 1 μg to 1 pg in the presence of 1 μL of IAC (0.2 pg/μL). The detection limit of the assay was as low as 0.1 ng. For each dilution, the ΔRn (increase in fluorescence emission due to template amplification, subtracted by the background fluorescence signal) was measured and plotted against the cycle number (Fig. 3A). By plotting Ct values against the logarithm of the quantity

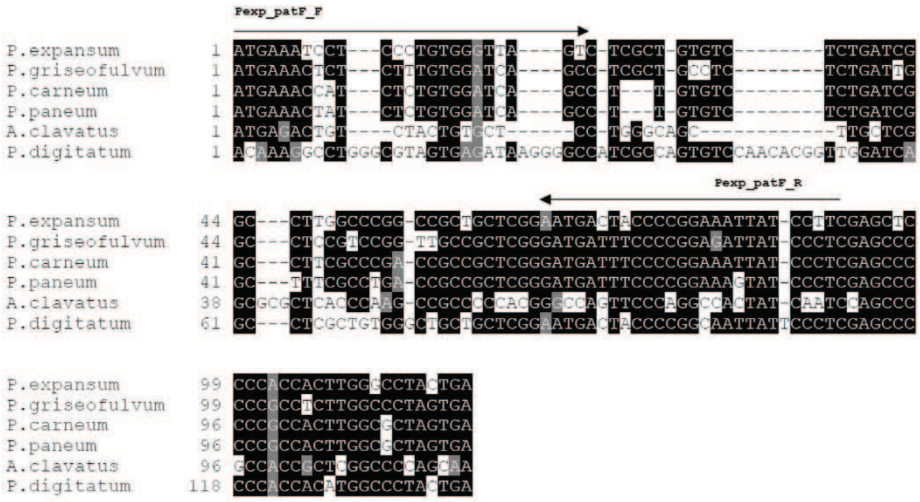


Fig. 1. Partial alignment of the *patF* gene from *P. expansum* and other related species (*P. paneum*, *P. carneum*, *P. griseofulvum*, *P. digitatum* and *A. clavatus*), obtained using Clustal X software. Black shading represent conserved nucleotides, non-shaded regions represent nucleotide differences. The absence of a single nucleotide is indicated by a dash. Black arrows indicate the positions of the patF-F/patF-R primers.

of each DNA dilution in the presence of IAC, a good linear correlation was obtained with R^2 value close to 0.984, confirming the precision and accuracy of the PCR-based quantification. The slope of the linear regression curve was −3.362 and the efficiency value was 99.7% (http://aac.asm.org/content/55/9/4038.long, Fig. 3B). In addition, to verify that the SYBR Green dye detected only one PCR product, a dissociation curve analysis was performed resulting in a single PCR product with a specific melting temperature of 83.5 (Fig. 4). No primer dimers were generated during the applied 40 real-time PCR amplification cycles.

3.4. Application of the developed qPCR method for P. expansum quantification and assessment of patulin content in apples

The developed qPCR assay provides a basis for a fast and highly specific quantification of the toxigenic fungi *P. expansum* in apples. The 28 artificially contaminated apple samples showed a wide range of *P. expansum* infection symptoms (Fig. 5). Patulin was identified by its retention time (9 min) according to a standard (Fig. 6) and quantified by measuring peak area according to the constructed standard curve of 0.919% coefficient of variation. A mean recovery of 89% (4.1% coefficient of variation) was found for patulin extracted from all spiked apples. The values of limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for patulin were 0.04 μg/mL and 0.1 μg/mL, respectively. HPLC results showed that patulin levels were ranged from 0.4056 to 514.389 μg/kg in the artificially contaminated apples. Significant differences were also found for fungal biomass estimated by qPCR, where the amounts of *P. expansum* DNA ranged from not detectable to 1138.769 ng DNA/mg of apple. These differences were mainly due to the initial spores count. However, no significant differences were noticed among the apple varieties. The negative results obtained with the qPCR

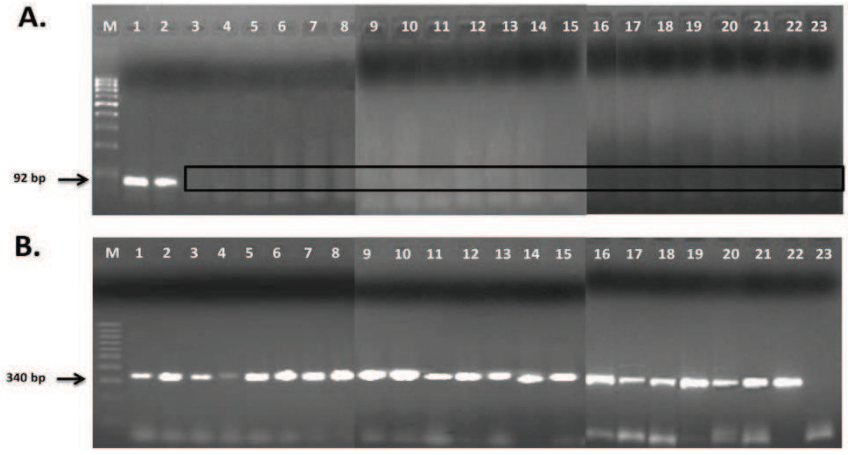


Fig. 2. Agarose gel (2%) electrophoresis patterns showing PCR-amplified products with (A) Pexp_patF_F/Pexp_patF_R primers (*patF* gene) and (B) TubF/TubR primers (*ß-tubulin* gene). Lane M, DirectLoad PCR 100 bp Low ladder (Sigma–Aldrich); Lane 1, *P. expansum* NRRL 35694; Lane 2, *P. expansum* NRRL 35695; Lane 3, *P. griseofulvum* NRRL 2159A; Lane 4, *P. paneum* M515; Lane 5, *P. carneum* M521; Lane 6, *P. chrysogenum* NRRL 35692; Lane 7, *P. glabrum* NCPT 279; Lane 8, *P. nordicum* NRRL 3711; Lane 9, *P. vulpinum* NRRL 2031; Lane 10, *P. roqueforti* P4 z88; Lane 11, *P. glandicola* NRRL 2036; Lane 12, *P. claviforme* NCPT 39; Lane 13, *P. brevicompactum* NCPT 398; Lane 14, *A. clavatus* NRRL 1980; Lane 15, *A. clavatus* NRRL 1; Lane 16, *A. flavus* NRRL 62477; Lane 17, *A. parasiticus* NCPT 217; Lane 18, *A. fumigatus* NRRL 35693; Lane 19, *A. niger* NCPT 209; Lane 20, *B. nivea* NRRL 2615; Lane 21, *B. nivea* ATCC 24008; Lane 22, *B. fulva* MUCL 14267; Lane 23, Negative control. Sizes are marked in base pairs on the left. The black frames indicate the absence of the expected band.

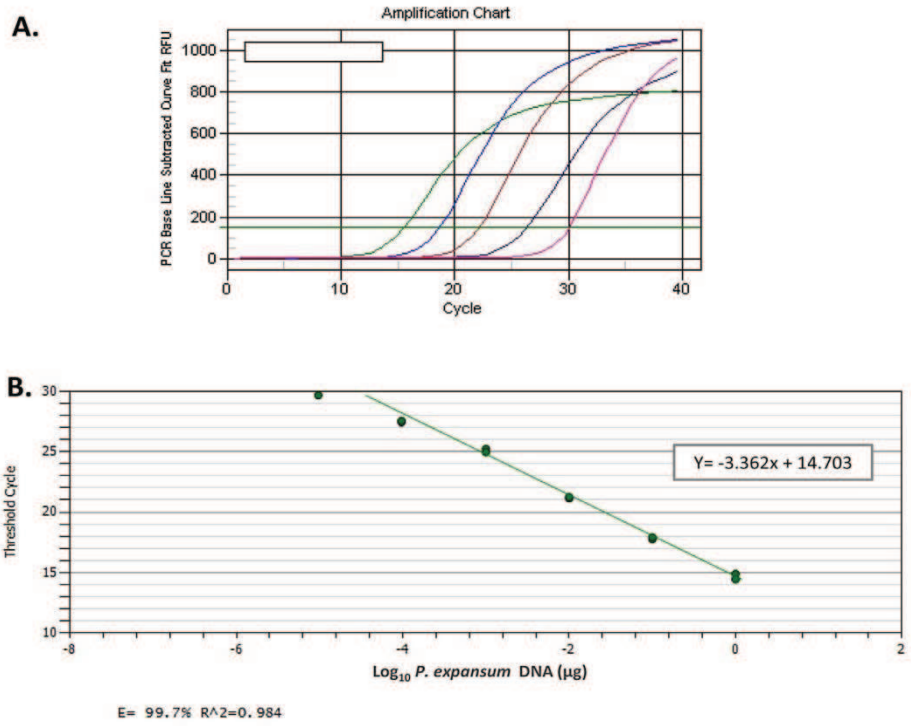


Fig. 3. (A) Amplification curves of a set of seven 10-fold serial dilutions of *P. expansum* genomic DNA showing the fluorescence signal plotted against PCR cycle number. (B) Standard curve generated by qPCR assay using serial (10-fold) dilutions of *P. expansum* pure genomic DNA. Ct values were obtained for each dilution and plotted against known input DNA amount.

analysis were truly negative since for these DNA samples no amplification bands were obtained with the conventional PCR (Data not shown).

To establish the correlation between *P. expansum* DNA and patulin content in apples, *P. expansum*-DNA concentration (ng DNA/mg of apple), was plotted against its respective patulin concentration (in µg/kg) (Fig. 7). The coefficient of the correlation between the DNA content and the patulin concentration was found to be $R^2 = 0.701$ on the basis of all twenty eight samples analyzed. This correlation coefficient R^2 reveals the strength of the linear relationship between those to variable. However, the reliability of the linear model also depends on how many observed data points are in the sample. Although this correlation is not too high for an accurate and precise quantification of the patulin's levels, it would be useful to identify the safe and unsafe exposure zones and to have an approximate estimation of the patulin's concentrations. The significance of the correlation coefficient was then evaluated by using the t-test. The resulting P-value for the correlation test was less than 0.001, indicating that the linear relationship in the sample data is reliable. Therefore, the results of *P. expansum* DNA quantification in apple samples could be used for the indirect quantification of patulin in apples and probably in other fruits.

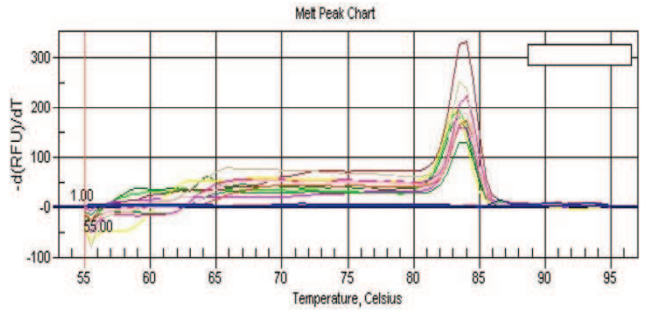


Fig. 4. Melting-curve profile obtained by fluorescence measurement during the slow denaturation of PCR amplicons by increasing the temperature. The melting temperature of the target amplicon occurs at 83.5 °C.

4. Discussion

DNA-based diagnostic tools have increasingly become widespread for pathogen detection and monitoring in food manufacturing. These tools are often more sensitive and specific than the traditional techniques based on microscopic examination and identification (Paterson, 2006). Some previous works described the development of PCR primer systems for patulin producers-DNA detection. Referring to the isoepoxydon dehydrogenase (*idh*) gene of the patulin metabolic pathway that catalyzes the conversion of isoepoxydon to phyllostin (Fedeshko, 1992), a PCR system able to detect patulin producers belonging to the *Penicillium* genera in environmental samples was developed by Paterson et al. (2000). In their study, all the *P. expansum* isolates revealed a patulin production capacity in the presence of this gene. However some isolates of *Penicillium brevicompactum* possessing the *idh* gene showed an inability to produce patulin. This latter species, which was revealed as false positive in the study of Paterson et al. (2000), was not amplified by the species-specific primers used in our study. In a subsequent work, Paterson (2004) showed that the *idh* encoding gene is widely distributed in the genus *Penicillium*, but also present in the genera *Aspergillus*, *Byssochlamys spp.* and *Paecilomyces*. Based

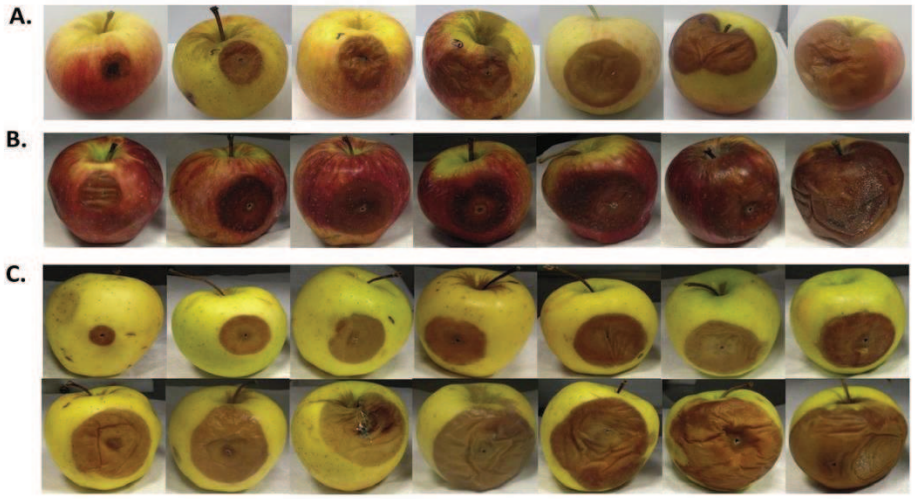


Fig. 5. The 28 apples of different varieties (A, Fuji; B, Royal Gala; C, Golden Delicious) inoculated with different spore concentrations of *P. expansum* and incubated at room temperature.

on these studies, it is clear that the *idh* gene found in the genome of several fungal species and even in patulin non-producer ones is not the best candidate for the development of a specific detection of patulin producer species. However, the use of the *idh* gene detection method is yet being used due to the unavailability of other gene sequences. Dombrink-Kurtzman (2007) has designed PCR primers on the basis of the *idh* gene sequence in *Penicillium* species for the specific detection of patulin-producing species. Along the same line, Rodríguez et al. (2011) have recently reported the use of the same gene to develop the first real-time PCR assay for collective detection and quantification of patulin producing species in different food matrices. This encountered problem, consisting of the impossibility of the discrimination between mycotoxin producers and non-producers using a PCR system based on a single gene was also perceived in the detection of aflatoxigenic fungi (Geisen, 1996).

All the methods described above are limited to the use of a single gene present in non-patulin producing species as well. This limitation lies in the fact that the patulin gene cluster has long remained unknown in the *Penicillium* genus. Recently, a gene cluster of the patulin biosynthesis consisting of 15 genes has been identified in *P. expansum* (Tannous et al., 2014). The elucidation of this cluster puts at the researchers' disposal a wide range of genes showing greater advantages than the broadly used *idh* gene. Among the other biochemically characterized genes, none appears to be a good candidate to develop a specific qPCR system for the quantification of *P. expansum* in apples. The gene *patK* characterized from *Penicillium patulum* and *Penicillium urticae* (Beck et al., 1990; Wang et al., 1991) encodes a 6-methylsalicylic acid synthase. This PKS is widely present in fungi and is implicated in different secondary metabolites' biosynthetic pathways, like terreic acid pathway in *Aspergillus terreus* (Guo et al., 2014) and asperlactone biosynthesis

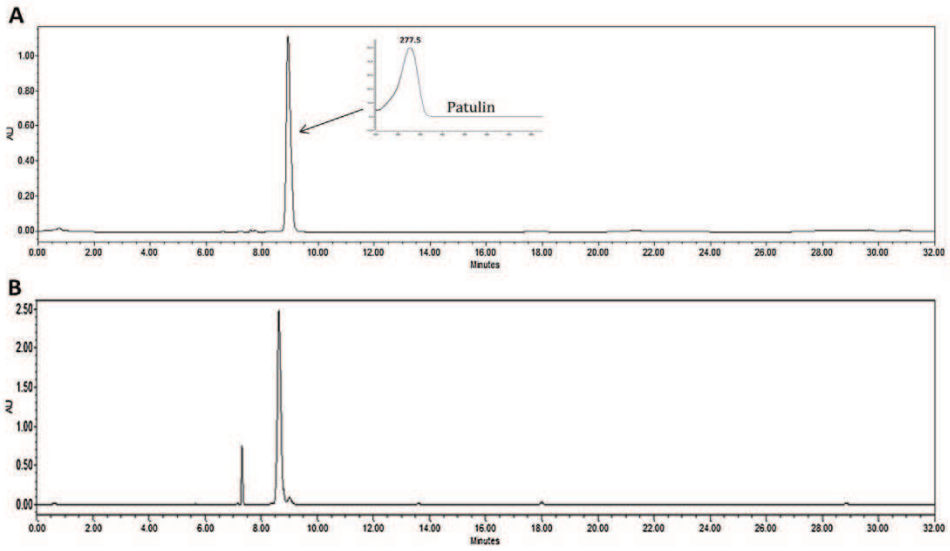


Fig. 6. HPLC chromatograms, (A) For patulin standard solution (10 μg/mL) and (B) for apple puree sample.

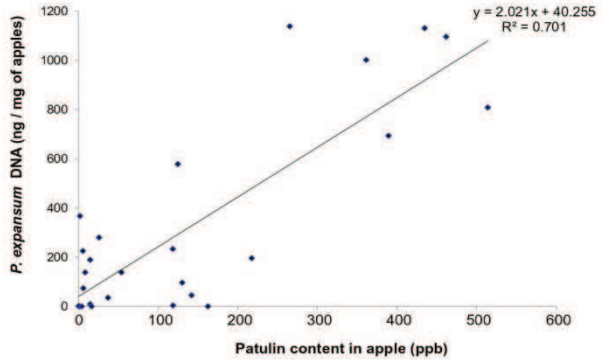


Fig. 7. Correlation of DNA amounts of *P. expansum* (ng/mg of apple) and patulin content (μg/kg) in 28 artificially contaminated apple samples. DNA was quantified using qPCR with primers patF-F/patF-R and SYBR Green as fluorescent dye. The patulin level was quantified by HPLC-DAD at 277 nm.

in *Aspergillus westerdijkiae* (Bacha et al., 2009). The Blastn of the genes *patH* and *patI* encoding two cytochroms P450 in *A. clavatus* (Artigot et al., 2009) and the gene *patG*, which encodes the 6-methylsalicylic decarboxylase in the same species (Snini et al., 2014), showed high identity percentages (82–87%) with several patulin non-producing species such as *Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti*, *P. digitatum* and *Penicillium chrysogenum*.

In the current study, we reported on a newly developed qPCR system allowing the specific identification and quantification of *P. expansum*, the species widely known for its ability to produce patulin when infecting apples. It was elaborated using the patF-F/patF-R primers designed from *patF*, a specific biosynthetic gene of patulin. The neopatulin synthase involved in the conversion of phyllostin into neopatulin was purified from *P. griseofulvum* as reported in an earlier study of Fedeshko (1992). The N-terminal portion of this protein displays 86.4% of similarity with that of the protein encoded by the *patF* gene from *P. expansum*, used in the present study (Fig. 8). Therefore, the latter is suggested to be responsible for the eighth step of the patulin biosynthetic pathway leading to the bicyclic structure of neopatulin. This chemical rearrangement is rarely observed in fungal metabolic pathways, thus justifying the selection of the gene *patF* to increase specificity and sensitivity of the *P. expansum* detection in apples. This choice is further supported by the fact that the Blastn of the *patF* gene sequence shows nucleotide identity with only two fungal species (85% identity with *P. digitatum* and 74% with *A. clavatus*). It is also worth noting that the non-patulin producer *P. roqueforti* lacks the gene *patF* as reported in a recent study of Cheeseman et al. (2014). However, the two species *P. paneum* and *P. carneum*, which are phylogenetically close to *P. roqueforti*, harbor the gene *patF* and have been identified as effective patulin producers (Frisvad et al., 2004). The designed qPCR includes an artificially created control DNA fragment, IAC, was designed to be amplified using the same set of primers used to amplify the target DNA. Nowadays, the use of an IAC in diagnostic PCR is becoming mandatory to exclude the possibility of false negative results caused by the presence of inhibitors substances, incorrect PCR mixture, poor DNA polymerase activity, or a malfunction of the thermal cycle (Hoorfar et al., 2004).

To our knowledge this is the first qPCR assay developed for selectively detect and quantify *P. expansum* in apples. The direct application of the qPCR detection system on food substrate after optimization of the parameters with pure genomic DNA is revealed widely important knowing that in some cases the developed PCR systems fails to prove efficiency on food due to the complex nature of the matrix and the irreversibly interaction of food compounds such as fat, polysaccharides, polyphenols with proteins and nucleic acids (Rossen et al., 1992; Dickinson et al., 1995).

Interestingly, the present study has also described a positive correlation ($R^2 = 0.701$) between the levels of *P. expansum* DNA and the amount of patulin in apple samples. This reported result slightly controvert a previous work published by Morales et al. (2007) in which no significant positive correlation was found between patulin levels and lesion diameters on apples infected with *P. expansum*. The latter can possibly be clarified by assuming that the rot diameter does not only reflect the fungal growth but can occur as a consequence of the enzymatic degradation of apple tissue. Moreover, it should be noted that most of the patulin concentrations detected in this study comply with the margins of patulin concentrations recovered from naturally infected apples (De Sylos, 1999), which favors the application of this correlation in natural contamination conditions. An overall review of the literature revealed that the level of contamination by some mycotoxins may be allied with the amount of pathogen biomass existent in the food material (Niessen, 2007). This association between fungal DNA and the assigned toxin level has been previously established for some of the major types of *Fusarium* and *Aspergillus* toxins. In this context, a high coefficient of correlation ($R^2 = 0.9557$) between *Fusarium*-DNA content and DON concentration was obtained on the basis of 300 wheat samples (Schnerr et al., 2002). Similarly, Fredlund et al. (2008) followed by Atoui et al. (2012) have reported the development of a positive correlation between the DNA levels of *Fusarium graminearum* and the zearalenone content in wheat ($R^2 = 0.6$) and maize samples ($R^2 = 0.76$), respectively. Comparable results have been reported regarding some *Aspergillus* toxins. In their study, Atoui et al. (2007) and Mulè et al. (2006) revealed respectively a positive correlation of $R^2 = 0.81$ and $R^2 = 0.917$ between *Aspergillus carbonarius* DNA content and Ochratoxin A concentration in grape samples. In the same context, Mideros et al. (2009) have shown that the levels of *Aspergillus flavus* biomass were strongly correlated with aflatoxin accumulation in maize. On the contrary, a lack of correlation was found in several analyses, indicating that the existence of a correlation cannot be predicted and generalized for all the fungal genera and their associated mycotoxins. No correlation was found either between the DNA amounts of *Fusarium poae* and the enniatins B and B1 levels in wheat grain samples (Kulik and Jestoi, 2009), or between *Fusarium culmorum* DNA and deoxynivalenol (DON) levels in oat samples (Yli-Mattila et al., 2011). Therefore, it was interesting to check the existence of this correlation for patulin estimation in apples.

As the aim of the present study was to develop an assay allowing the estimation of the patulin content through the quantification of *P. expansum* DNA in apples, we can consider that a *P. expansum* DNA content lower than 90.79 ng DNA/mg of apple might guarantee food safety. This value coincides, according to the correlation found in this study, with a level that is lower than the EU's tolerable limit

```
P.griseofulvum  ----------RDDFPGDYPSSSPPLGPSDDET----------
P.expansum      MKSSLWVSLAVSLIGLGPAAARNDYPGNYPSSSPPLGPTDWERTPVSVFAKVLN
```

Fig. 8. Alignment of the N-terminal part of the neopatulin synthase from *Penicillium griseofulvum* with the enzyme encoded by the gene *patF* in *Penicillium expansum*. Black shading represent conserved amino acids; non-shaded regions represent amino acid differences.

of 25 ppb for patulin in apples (European Commission Regulation No 1425/2003 and No 1881/2006).

To conclude, it is important to affirm that the qPCR system developed in this study could be realized in a relatively short time (5–6 h for DNA extraction and 2 h for qPCR). Therefore, it would help determining the contamination level by the mold of the most important patulin-producing potential in apples even before fungal development can be perceived. This would be very useful to prevent toxin production in fruits during storage period. This assay can be easily applied during the industrial production of different apple byproducts to monitor the raw material at critical control points, in order to avoid the occasional existence of the toxin in the final product. In the second part of this study, the finding described for *P. expansum* DNA and its association with patulin content in apples indicates that the *P. expansum* fungal biomass estimated by qPCR could be used to infer the concentration of patulin. In practice, the application of this correlation will abstain direct extraction of the toxin that requires relatively large amounts of solvents and chemicals of high disposal costs and will allow the approximate estimation of patulin contamination levels by a single and less expensive genomic DNA extraction. However, it is essential to declare that this developed correlation is based on a limited sample of apples and is not necessarily applicable to all the apple varieties under all environmental conditions.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to S. Peterson, former curator of the ARS Culture Collection, M. Olsen, from the Research and Development Department of the National and Food administration, Sweden and J. Bauer, from the Technical University Munich, for providing some of the fungal strains examined in this study. We are also greatly indebted to C. Afif from the Department of Chemistry at Saint Joseph's University for his kind cooperation in achieving the HPLC analyses. The research work was financially supported by the National Council for Scientific Research (CNRS), Lebanon grant number: 3443 and the Research Council of Saint-Joseph University (Lebanon) grant number: FS38.

References

Adams, M., Motarjemi, Y., 1999. Basic Food Safety for Health Workers. World Health Organization.
Al-Hazmi, N.A., 2010. Determination of patulin and ochratoxin A using HPLC in apple juice samples in Saudi Arabia. Saudi J. Biol. Sci. 17, 353–359.
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.
Atoui, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., 2007. Targeting a polyketide synthase gene for *Aspergillus carbonarius* quantification and ochratoxin A assessment in grapes using real-time PCR. Int. J. Food Microbiol. 115, 313–318.
Atoui, A., El Khoury, A., Kallassy, M., Lebrihi, A., 2012. Quantification of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* by real-time PCR system and zearalenone assessment in maize. Int. J. Food Microbiol. 154, 59–65.
Bacha, N., Dao, H.P., Atoui, A., Mathieu, F., O'Callaghan, J., Puel, O., Liboz, T., Dobson, A.D.W., Lebrihi, A., 2009. Cloning and characterization of novel methylsalicylic acid synthase gene involved in the biosynthesis of isoasperlactone and asperlactone in *Aspergillus westerdijkiae*. Fungal Genet. Biol. 46, 742–749.
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.
Barreira, M.J., Alvito, P.C., Almeida, C.M.M., 2010. Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal. Food Chem. 121, 653–658.
Beck, J., Ripka, S., Siegner, A., Schiltz, E., Schweizer, E., 1990. The multifunctional 6-methylsalicylic acid synthase gene of *Penicillium patulum*. Eur. J. Biochem. 192, 487–498.
Cano-Sancho, G., Marin, S., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2009. Survey of patulin occurrence in apple juice and apple products in Catalonia, Spain, and an estimate of dietary intake. Food Addit. Contam. Part B 2, 59–65.
Cheeseman, K., Ropars, J., Renault, P., Dupont, J., Gouzy, J., Branca, A., Abraham, A.-L., Ceppi, M., Conseiller, E., Debuchy, R., Malagnac, F., Goarin, A., Silar, P., Lacoste, S., Sallet, E., Bensimon, A., Giraud, T., Brygoo, Y., 2014. Multiple recent horizontal transfers of a large genomic region in cheese making fungi. Nat. Commun. 5.
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.
Dickinson, J.H., Kroll, R.G., Grant, K.A., 1995. The direct application of the polymerase chain reaction to DNA extracted from foods. Lett. Appl. Microbiol. 20, 212–216.
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.
Elhariry, H., Bahobial, A.A., Gherbawy, Y., 2011. Genotypic identification of *Penicillium expansum* and the role of processing on patulin presence in juice. Food Chem. Toxicol. 49, 941–946.
Fedeshko, R.W., 1992. Polyketide Enzymes and Genes (Ph.D dissertation). University of Calgary, Calgary.
Fredlund, E., Gidlund, A., Olsen, M., Börjesson, T., Spliid, N.H.H., Simonsson, M., 2008. Method evaluation of *Fusarium* DNA extraction from mycelia and wheat for down-stream real-time PCR quantification and correlation to mycotoxin levels. J. Microbiol. Methods 73, 33–40.
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, 201–241.
Funes, G.J., Resnik, S.L., 2009. Determination of patulin in solid and semisolid apple and pear products marketed in Argentina. Food Control. 20, 277–280.
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.
Geisen, R., 1996. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. Syst. Appl. Microbiol. 19, 388–392.
Gökmen, V., Acar, J., 1998. Incidence of patulin in apple juice concentrates produced in Turkey. J. Chromatogr. A 815, 99–102.
Guo, C.-J., Sun, W.-W., Bruno, K.S., Wang, C.C.C., 2014. Molecular genetic characterization of terreic acid pathway in *Aspergillus terreus*. Org. Lett. 16 (20), 5250–5253.
Hayat, A., Paniel, N., Rhouati, A., Marty, J.-L., Barthelmebs, L., 2012. Recent advances in ochratoxin A-producing fungi detection based on PCR methods and ochratoxin A analysis in food matrices. Food Control. 26, 401–415.
Hoorfar, J.B., Malorny, B., Abdulmawjood, A., Cook, N., Wagner, M., Fach, P., 2004. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. J. Clin. Microbiol. 42, 1863–1868.
Iha, M.H., Sabino, M., 2008. Incidence of patulin in Brazilian apple-based drinks. Food Control. 19, 417–422.
Kulik, T., Jestoi, M., 2009. Quantification of *Fusarium poae* DNA and associated mycotoxins in asymptomatically contaminated wheat. Int. J. Food Microbiol. 130, 233–237.
Konietzny, U., Greiner, R., 2003. The application of PCR in the detection of mycotoxigenic fungi in foods. Braz. J. Microbiol. 34, 283–300.
Leggott, N.L., Shephard, G.S., 2001. Patulin in South African commercial apple products. Food Control. 12, 73–76.
Luque, M.I., Rodríguez, A., Andrade, M.J., Gordillo, R., Rodríguez, M., Córdoba, J.J., 2011. Development of a PCR protocol to detect patulin producing moulds in food products. Food Control. 22, 1831–1838.
MacDonald, S., Long, M., Gilbert, J., Felgueiras, I., 2000. Liquid chromatographic method for determination of patulin in Clear and cloudy apple juices and apple puree: collaborative study. J. AOAC Int. 83, 1387–1394.
Majid Cheraghali, A., Reza Mohammadi, H., Amirahmadi, M., Yazdanpanah, H., Abouhossain, G., Zamanian, F., Ghazi Khansari, M., Afshar, M., 2005. Incidence of patulin contamination in apple juice produced in Iran. Food Control. 16, 165–167.
Manonmani, H.K., Anand, S., Chandrashekar, A., Rati, E.R., 2005. Detection of aflatoxigenic fungi in selected food commodities by PCR. Process Biochem. 40, 2859–2864.
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.
Mideros, S.X., Windham, G.L., Williams, W.P., Nelson, R.J., 2009. *Aspergillus flavus* biomass in maize estimated by quantitative real-time polymerase chain reaction is strongly correlated with aflatoxin concentration. Plant Dis. 93, 1163–1170.
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., Marín, S., Rovira, A., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2007. Patulin accumulation in apples by *Penicillium expansum* during postharvest stages. Lett. Appl. Microbiol. 44, 30–35.
Mulè, G., Susca, A., Logrieco, A., Stea, G., Visconti, A., 2006. Development of a quantitative real-time PCR assay for the detection of *Aspergillus carbonarius* in grapes. Int. J. Food Microbiol. 111, S28–S34.
Murillo-Arbizu, M., Amézqueta, S., González-Peñas, E., de Cerain, A.L., 2009. Occurrence of patulin and its dietary intake through apple juice consumption by the Spanish population. Food Chem. 113, 420–423.

Negedu, A., Atawodi, S.E., Ameh, J.B., Umoh, V.J., Tanko, H.Y., 2011. Economic and health perspectives of mycotoxins: a review. Cont. J. Biomed. Sci. 5, 5–26.
Niessen, L., 2007. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. Int. J. Food Microbiol. 119, 38–46.
Noorbakhsh, R., Bahrami, A.R., Mortazavi, S.A., Bahreini, M., 2009. PCR-based identification of aflatoxigenic fungi associated with Iranian saffron. J. Food Sci. Biotechnol. 18, 1038–1041.
Paterson, R.R.M., Archer, S., Kozakiewicz, Z., Lea, A., Locke, T., O'Grady, E., 2000. A gene probe for the patulin metabolic pathway with potential for use in patulin and novel disease control. Biocontrol Sci. Technol. 10, 509–512.
Paterson, R.R.M., 2004. The isoepoxydon dehydrogenase gene of patulin biosynthesis in cultures and secondary metabolites as candidate PCR inhibitors. Mycol. Res. 108, 1431–1437.
Paterson, R.R.M., 2006. Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. Process Biochem. 41, 1467–1474.
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., Galtier, P., Oswald, I.P., 2010. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. Toxins 2, 613–631.
Rodríguez, A., Luque, M.I., Andrade, M.J., Rodríguez, M., Asensio, M.A., Córdoba, J.J., 2011. Development of real-time PCR methods to quantify patulin-producing molds in food products. Food Microbiol. 28, 1190–1199.
Rodríguez, A., Rodríguez, M., Luque, M.I., Martín, A., Córdoba, J.J., 2012. Real-time PCR assays for detection and quantification of aflatoxin-producing molds in foods. Food Microbiol. 31, 89–99.
Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K., Rasmussen, O.F., 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. Int. J. Food Microbiol. 17, 37–45.
Salomão, B., Aragão, G.U.M.F., Churey, J.J., Padilla-Zakour, O.I., Worobo, R.W., 2009. Influence of storage temperature and apple variety on patulin production by *Penicillium expansum*. J. Food Prot. 72, 1030–1036.
Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
Sardiñas, N., Vázquez, C., Gil-Serna, J., González-Jaén, M.T., Patiño, B., 2011. Specific detection and quantification of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in wheat flour by SYBR® Green quantitative PCR. Int. J. Food Microbiol. 145, 121–125.
Saxena, N., Dwivedi, P.D., Ansari, K.M., Das, M., 2008. Patulin in apple juices: incidence and likely intake in an Indian population. Food Addit. Contam. 1, 140–146.
Schnerr, H., Vogel, R.F., Niessen, L., 2002. Correlation between DNA of trichothecene-producing *Fusarium* species and deoxynivalenol concentrations in wheat-samples. Lett. Appl. Microbiol. 35, 121–125.
Selma, M.V., Martínez-Culebras, P.V., Aznar, R., 2008. Real-time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in wine grapes. Int. J. Food Microbiol. 122, 126–134.
Shapira, R., Paster, N., Eyal, O., Menasherov, M., Mett, A., Salomon, R., 1996. Detection of aflatoxigenic molds in grains by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 62, 3270–3273.
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.
Spadaro, D., Ciavorella, A., Frati, S., Garibaldi, A., Gullino, M.L., 2007. Incidence and level of patulin contamination in pure and mixed apple juices marketed in Italy. Food Control. 18, 1098–1102.
Spadaro, D., Patharajan, S., Kartikeyan, M., Lorè, A., Garibaldi, A., Gullino, M.L., 2011. Specific PCR primers for the detection of isolates of *Aspergillus carbonarius* producing ochratoxin A on grapevine. Ann. Microbiol. 61, 267–272.
De Sylos, C.M., 1999. Incidence of patulin in fruits and fruit juices marketed in Campinas, Brazil. Food Addit. Contam. 16, 71–74.
Tangni, E.K., Theys, R., Mignolet, E., Maudoux, M., Michelet, J.Y., Larondelle, Y., 2003. Patulin in domestic and imported apple-based drinks in Belgium: occurrence and exposure assessment. Food Addit. Contam. 20, 482–489.
Tannous, J., El Khoury, R., Snini, S.P., Lippi, Y., El Khoury, A., Atoui, A., Lteif, R., Oswald, I.P., Puel, O., 2014. Sequencing, physical organization and kinetic expression of the patulin biosynthetic gene cluster from *Penicillium expansum*. Int. J. Food Microbiol. 189, 51–60.
Upadhaya, S.D., Park, M.A., Ha, J.K., 2010. Mycotoxins and their biotransformation in the rumen: a review. Asian Australas. J. Anim. Sci. 23, 1250–1260.
Vegi, A., Wolf-Hall, C.E., 2013. Multiplex real-time PCR method for detection and quantification of mycotoxigenic fungi belonging to three different genera. J. Food Sci. 78, M70–M76.
Wang, I.-K., Reeves, C., Gaucher, G.M., 1991. Isolation and sequencing of a genomic DNA clone containing the 3′ terminus of the 6-methylsalicylic acid polyketide synthetase gene of *Penicillium urticae*. Can. J. Microbiol. 37, 86–95.
Yli-Mattila, T., Rämö, S., Tanner, R., Loiveke, H., Hietaniemi, V., 2011. *Fusarium* DNA levels as compared to mycotoxin levels in Finnish and Estonian grain samples. Plant Breed. Seed Sci. 64, 131–140.
Yuan, Y., Zhuang, H., Zhang, T., Liu, J., 2010. Patulin content in apple products marketed in Northeast China. Food Control. 21, 1488–1491.
Zaied, C., Abid, S., Hlel, W., Bacha, H., 2013. Occurrence of patulin in apple-based-foods largely consumed in Tunisia. Food Control. 31, 263–267.



DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans cette dernière partie du manuscrit, nous dressons tout d'abord une synthèse générale des résultats présentés précédemment et des améliorations apportées durant cette thèse. Afin d'être discutés de manière critique, les résultats de ce travail sont comparés dans un deuxième temps aux publications récentes de la littérature scientifique. Ceci permettra d'ouvrir la discussion sur les avancées réalisées et la manière avec laquelle il faudrait poursuivre ces travaux de recherche.

Résultats pertinents de la thèse et améliorations apportées

La patuline, un métabolite toxique élaboré par plusieurs espèces fongiques dont principalement *Penicillium expansum*, constitue aujourd'hui un des grands sujets d'inquiétude pour les producteurs et les transformateurs de pommes. La première étape de la production de patuline, comme pour de très nombreuses mycotoxines est celle de la colonisation de l'hôte par le champignon producteur, qui survient principalement lors du stockage, en réponse à plusieurs facteurs extrinsèques favorables. En effet, l'apparition de toxine n'est que la conséquence du développement du champignon à l'intérieur de la pomme. Autrement dit, il n'y a pas de contamination des pommes par la patuline sans apparition de lésions brunes. Cette production est également articulée à l'échelle moléculaire par un ensemble de gènes regroupés sous forme de cluster. Suite à l'analyse bibliographique réalisée dans le cadre de cette thèse, il en ressort plusieurs points qui nécessitent des études plus approfondies :

(1) Les connaissances sur les conditions optimales et marginales de croissance et de production de patuline par l'espèce *P. expansum* sont loin d'être complètes.

(2) Les mécanismes moléculaires responsables de la production de patuline par *P. expansum* n'ont jamais été abordés.

(3) Bien que les structures des précurseurs et des produits intermédiaires de la voie de biosynthèse de la patuline soient connues, le rôle de la majorité des gènes identifiés reste à éclaircir.

(4) Aucun outil pour la détection et la quantification précoce et spécifique de l'espèce *P. expansum* dans les pommes et les autres denrées alimentaires n'a jusqu'à présent été élaboré.

C'est à l'ensemble de ces points que le présent travail tente d'apporter des solutions appropriées. L'objectif général de cette thèse de doctorat était de mieux appréhender les mécanismes de production de la patuline par *P. expansum* en vue de développer des stratégies de lutte pertinentes contre la contamination par cette mycotoxine, des pommes et par extension de tout produit à base de pomme. Ces recherches fondamentales ont débouché d'une part sur l'étude des conditions écologiques associées à la synthèse de la patuline par *P. expansum* et d'autre part sur la caractérisation moléculaire et chimique de la voie de biosynthèse de cette mycotoxine chez l'espèce problématique.

En raison du rôle que joue le champignon *P. expansum* au sein de la filière fruit en général et pomme en particulier, la compréhension des facteurs physico-chimiques qui conditionnent sa croissance et sa production de patuline est l'enjeu actuel des cultiveurs de pommes mais également des industries de transformation de ce fruit. Nous avons à cet égard, développé un modèle mathématique permettant de prédire l'effet combiné de plusieurs paramètres abiotiques comme la température, l'activité de l'eau et le pH sur la croissance de ce champignon. Les conditions requises pour la production de patuline par cette espèce ont également été caractérisées.

Abordés dans le deuxième et troisième chapitre de cette thèse, ces travaux ont permis dans un premier temps d'élucider le cluster de gènes impliqués dans la biosynthèse de la patuline chez *P. expansum*. Un cluster englobant 15 gènes (*patA-patO*) a été entièrement séquencé, annoté et déposé auprès de la base de données Genbank sous le numéro d'accès KF899892. Dans un deuxième temps, les connaissances sur la voie de biosynthèse de la patuline ont été complétées par une caractérisation fonctionnelle de deux gènes impliqués dans cette voie. L'identité du gène régulateur spécifique de cette voie a été dévoilée, ainsi que celle du gène impliqué dans la dernière étape de la cascade enzymatique aboutissant à la patuline.

Dans le dernier chapitre du travail expérimental relevant plus de la recherche appliquée, l'effort a été porté sur le développement d'un système de PCR en temps réel visant la détection et la quantification moléculaire de *P. expansum* dans les pommes. Compte tenu du fait que *P. expansum* est le principal responsable de la contamination par la patuline au sein de la filière pomme, nous avons essayé de corréler la présence de ce champignon avec les teneurs en patuline dans les mêmes échantillons. Nous avons obtenu une corrélation moyenne positive entre la quantité d'ADN de *P. expansum* (ng ADN/mg de pomme) et la teneur en patuline (en µg/Kg). Le système développé nous a donc permis d'une part d'avoir une identification et une quantification rapides et spécifiques de *P. expansum* en comparaison aux méthodes classiques de taxonomie qui exigent de solides

connaissances en mycologie et d'autre part d'avoir une estimation du niveau de la contamination en patuline dans les pommes sans recourir aux méthodes classiques d'analyse qui sont généralement laborieuses et coûteuses.

Analyse critique et discussion des résultats

La discussion générale de cette thèse s'articule essentiellement autour de deux grands axes; **le premier** concerne l'analyse du cluster de la patuline caractérisé chez *P. expansum*, où il sera discuté des perspectives qu'apporte ce travail surtout en termes d'étude de l'évolution et la dynamique des génomes fongiques, ainsi qu'en termes de compréhension des mécanismes de régulation éventuels de la voie de biosynthèse de la patuline. Une discussion sur les fonctions hypothétiques des gènes du cluster, non-caractérisés jusqu'à présent, sera également menée. Le **second** axe traite des stratégies de lutte actuellement développées pour limiter la contamination par la patuline le long de la chaine alimentaire. Une attention particulière sera portée sur les deux approches préventives développées au cours de notre étude. Le bénéfice qu'apportent ces deux stratégies sera étayé par des exemples d'études réalisées sur d'autres espèces fongiques et d'autres classes de mycotoxines. Cette partie sera complétée par un aperçu sur les méthodologies mises en œuvre et décrites dans la littérature pour réduire la présence de la patuline. Parmi celles-ci, certaines visent à lutter contre le pathogène soit en empêchant sa croissance soit en inhibant sa production de toxine, tandis que d'autres sont appliquées en phase post-production pour détoxifier, inactiver ou dégrader la patuline produite.

Il est important de signaler que cette partie ne reprend pas la discussion incorporée dans les articles mais traite d'autres points qui méritent d'être abordés suite au travail présenté dans ce manuscrit.

L'ANALYSE DES CLUSTERS DE GÈNES : UN OUTIL PERFORMANT POUR L'ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION ET LA DYNAMIQUE DES GÉNOMES FONGIQUES

Une des caractéristiques remarquables des champignons filamenteux est leur capacité à synthétiser une ample variété de métabolites secondaires complexes, un trait qu'ils partagent avec quelques autres groupes d'organismes, particulièrement les plantes supérieures et certains procaryotes. Les gènes impliqués dans le métabolisme secondaire fongique se caractérisent par leur tendance à être regroupés en cluster (Keller and Hohn 1997). Cette organisation est très appréciée par ceux qui étudient l'évolution des espèces fongiques sachant que le cluster entier peut être théoriquement obtenu par une seule étape de clonage (Walton 2000). Il a été prouvé que ces gènes sont maintenus en cluster tout au long de l'évolution des génomes fongiques grâce à une sélection naturelle (Khaldi et al. 2008). Ceci est illustré chez les *Aspergillus* par le cluster codant pour la synthèse des aflatoxines et de la stérigmatocystine qui a été maintenu en dépit de nombreux réarrangements internes, depuis au moins 100 millions d'années (Cary and Ehrlich 2006). Le transfert génétique horizontal entre les espèces de champignons, aussi connu sous le nom de transfert latéral, reste l'explication la plus plausible à ce phénomène. Il s'agit d'un type de réarrangement par lequel le matériel génétique d'un organisme est incorporé dans le génome d'un autre; les deux n'ayant pas une relation d'ancêtre-descendant par opposition au flux vertical d'héritage génétique de parents vers la descendance (Walton 2000).

L'analyse comparative d'autres clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse de métabolites secondaires fongiques a témoigné également de ce transfert horizontal de gènes. A titre d'exemple, Khaldi et al. (2008) ont démontré qu'au moins cinq des six gènes du cluster englobant le gène codant pour la polycétide synthase (ACE1), impliquée dans la biosynthèse des cytochalasines chez *A. clavatus,* sont issus par transfert horizontal à partir de *Magnaporthe grisea*. Dans la même optique, Slot et Rokas (2011) ont récemment découvert qu'une région d'environ 57 kb contenant le cluster de gènes impliqués dans la biosynthèse de la stérigamotocystine est censée être transférée horizontalement à *Podospora anserina* à partir d'*Aspergillus nidulans.* L'étude de l'évolution du cluster de gènes impliqués dans la biosynthèse de la fumonisine par Khaldi et Wolfe (2011) suggère que ce cluster chez *Aspergillus niger* est acquis par transfert horizontal à partir d'une espèce de la classe des *Sordariomycetes* qui regroupe entre autres certaines espèces de *Fusarium* productrices de fumonisines.

Toutes ces données et d'autres mettant en évidence des évènements de flux horizontaux de gènes entre différentes espèces de champignons ont permis une avancée considérable dans la classification phylogénétique de ces derniers.

En ce qui concerne la patuline, aucune analyse comparative inter-espèces de son cluster de gènes, n'a été dressée avant le présent travail. Le cluster entier de la patuline a été décrit pour la première fois chez l'espèce productrice *A. clavatus*, utilisée autrefois par notre équipe comme organisme modèle afin d'étudier la voie de biosynthèse de la patuline (Artigot et al. 2009). A l'issue de notre travail, la séquence entière du cluster de gènes codant pour la patuline a été déterminée chez *P. expansum,* une autre espèce productrice de patuline, mais qui constitue une réelle menace pour l'agriculture et la santé humaine (Tannous et al. 2014).

L'acquisition de ce cluster chez *P. expansum* a ouvert la voie à l'analyse plus fine permettant l'étude de l'évolution du cluster de la patuline et l'identification des segments de gènes conservés entre les espèces productrices et non-productrices de cette mycotoxine Pour appréhender l'évolution du cluster de la patuline, l'organisation des gènes chez *P. expansum* a été comparée dans un premier temps à celle de trois autres espèces fongiques (Tannous et al. 2014). Les deux espèces *A. clavatus* et *P. expansum* partagent le même nombre de gènes, néanmoins elles se distinguent par la distribution de ces gènes au sein du cluster. Ce réarrangement n'est pas aléatoirement établi, mais s'articule principalement autour de trois îlots de gènes hautement conservés en ordre et en orientation (Figure 1). Ces îlots de gènes sont également désignés par le terme « blocs de synthénie». L'identification de régions synthéniques est un outil très performant qui permet tout d'abord d'apprécier le degré de conservation entre les génomes et d'évaluer ainsi la dynamique qui s'exerce à travers les multiples réarrangements tels que les duplications, inversions, transpositions, délétions, insertions, implications dans des transferts horizontaux. Le cluster de gènes chez les deux espèces productrices *A. clavatus* et *P. expansum* témoigne du fait que l'organisation des gènes n'a pas d'impact sur la capacité du champignon à synthétiser la patuline. La présence de tous les gènes biosynthétiques et la fonctionnalité de ces derniers, reste les critères indispensables à cette synthèse. Ceci a également été observé pour le cluster des gènes impliqués dans la synthèse de la stérigmatocystine. Bien que l'organisation spatiale des gènes au sein de ce cluster soit différente chez *A. ochraceoroseus* et *A. nidulans*, les deux espèces sont identifiées comme productrices avérées de stérigmatocystine (Cary et al. 2009). En contrepartie, l'organisation générale du cluster des gènes de l'aflatoxine chez les deux espèces productrices *A. flavus* et *A. parasiticus* est similaire, mais l'espacement entre les gènes n'est pas parfaitement conservé (Yu et al. 1995; Yu et al. 2004a).

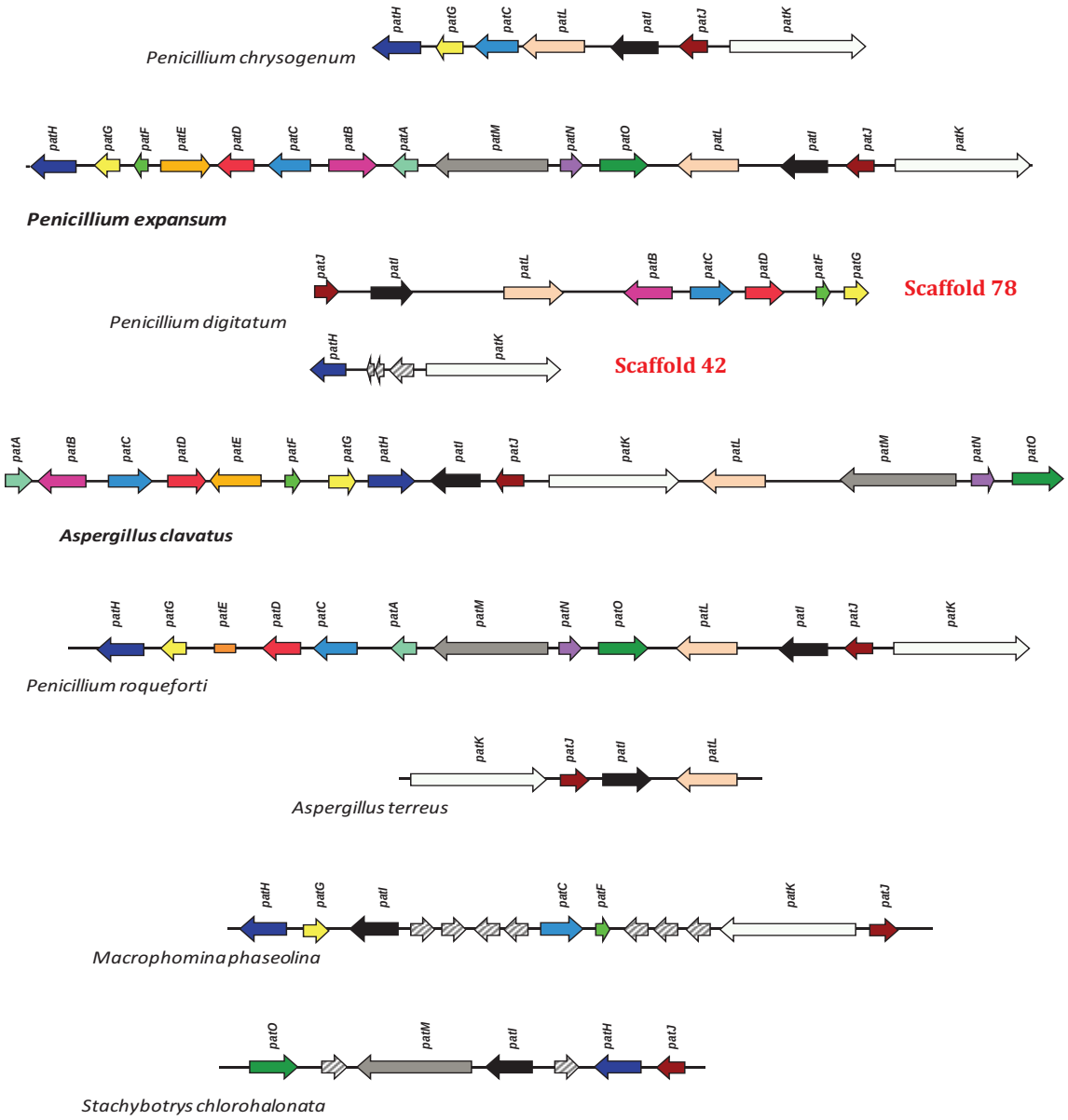


Figure 1 : Stucture du cluster des gènes impliqués dans la voie de biosynthèe de la patuline chez *P. expansum* et analyse comparée de l'organisation des gènes orthologues présents dans d'autres génomes fongiques.

Les flèches indiquent le sens de transcription du gène. Les gènes orthologues entre les clusters sont représentés par la même couleur. Les gènes n'appartenant pas au cluster de la patuline sont représentés par des flèches hachurées.

Des clusters ''fossiles'' non fonctionnels dans la synthèse de la patuline ont également été repérés dans les génomes des deux espèces *P. chrysogenum* (van den Berg et al. 2008) et *P. digitatum* (Marcet-Houben et al. 2012). Ces deux espèces ont perdu certains gènes clés au cours de l'évolution des génomes et par conséquent leur capacité à produire la patuline. L'analyse comparative du cluster entier chez *P. expansum* et les clusters partiels chez ces deux espèces a révélé l'existence de quelques groupes de gènes quasiment inchangés. Les sept gènes conservés chez *P. chrysogenum* sont organisés et orientés de la même façon que chez *P. expansum*. Cependant, les dix gènes conservés chez *P. digitatum* sont répartis sur deux scaffolds différents, témoignant d'un processus de translocation. Sur le premier scaffold (78), sont rassemblés huit gènes orthologues orientés différemment par rapport au cluster de *P. expansum*, tandis que l'autre scaffold (42) porte les deux gènes *patH* et *patK* qui délimitent les extrémités du cluster chez *P. expansum*, séparés par trois gènes n'appartenant pas au cluster de la patuline.

Dans cette discussion générale, une comparaison plus exhaustive est menée incluant d'autres espèces non-productrices de patuline (Figure 1). Très récemment, le génome entier de l'espèce *Penicillium roqueforti*, utilisée souvent comme ferment dans l'industrie fromagère, a été séquencé (Cheeseman et al. 2014). Une vue d'ensemble montre que la structure du cluster de la patuline chez cette espèce est largement similaire à celle de *P. expansum*. Cependant, cette espèce a subi deux évènements de délétion. Le premier a provoqué la perte d'une partie du gène *patE*, aboutissant à une perte de fonction de ce gène. Cette délétion a entrainé également la perte du gène *patF* situé en amont du gène *patE* chez *P. expansum*. La deuxième délétion a lieu entre les gènes *patA* et *patC* ayant pour conséquence la disparition complète du gène *patB* chez *P. roqueforti*. Ces mutations génétiques observées chez *P. roqueforti* expliquent l'incapacité de cette espèce à produire la patuline. Il est important de souligner que les trois espèces phylogénétiquement les plus proches de *P. roqueforti* que sont *P. carneum*, *P. psychrosexualis* et *P. paneum* produisent toutes de la patuline, ce qui suggère que ces délétions sont des évènements relativement récents peut-être survenus durant la domestication de *P. roqueforti* (Houbraken et al. 2010).

Quatre gènes orthologues à ceux du cluster de la patuline chez *P. expansum* ont été repérés sur le génome d'*A. terreus*. Parmi ces gènes, on retrouve le gène *patK* codant pour l'acide 6-méthylsalicylique synthase. Chez cette espèce, une autre voie de biosynthèse a besoin de cette activité enzymatique, il s'agit de la voie de l'acide térréique. Comme il n'y a qu'un seul gène 6-*msas*

dans le génome d'*A. terreus*, il avait été suggéré que ce gène était très probablement impliqué dans la voie de biosynthèse de l'acide térréique chez cette espèce (Puel et al. 2010). Très récemment cette hypothèse a été confirmée (Guo et al. 2014). Au cours de l'évolution, le segment contenant les gènes *patI* et *patJ chez A. terreus* a pivoté en changeant d'orientation par rapport à sa disposition chez *P. expansum*. Il semblerait aussi qu'une transposition des deux gènes situés de part et d'autre de ce segment ait eu lieu. Il s'agit d'un processus de type « couper-coller » dans le chromosome tout en conservant le même sens de transcription de ces gènes entre les deux espèces.

Deux espèces phylogénétiquement éloignées de *P. expansum* et n'appartenant pas à la famille des *trichochomacea* ont été également incluses dans la présente analyse. Il s'agit des espèces *Macrophomina phaseolina* et *Stachybotrys chlorohalonata* appartenant respectivement aux classes des *Dothideomycetes* et des *Sordariomycetes*, chez lesquelles certains gènes orthologues à ceux du cluster de la patuline ont été repérés. Ces comparaisons révèlent une perte de synthénie qui est justifiée par l'éloignement de ces deux espèces vis-à-vis de *P. expansum*.

Pour établir une relation de parenté entre les différentes espèces présentant des orthologues aux gènes du cluster de la patuline chez *P. expansum*, des analyses phylogénétiques ont été menées sur la base de trois gènes de ce cluster. Il s'agit des gènes *patK*, codant pour la 6-msas et les deux gènes *patH* et *patI* codant des cytochromes P450. Il est à rappeler que les gènes *patH* et *patK* délimitent les extrémités du cluster de la patuline chez *P. expansum.*

Les séquences codantes orthologues ont été alignées en utilisant clustalW (Thompson et al. 1994) et l'alignement a été vérifié à l'œil. Les régions nucléotidiques alignées sans ambigüité ont été conservées, les gaps dans l'alignement de séquence ont été supprimés. Les analyses ont été effectuées par la méthode du maximum de vraisemblance (Maximum likelihood) en utilisant l'application Mega6 (Tamura et al. 2013), aboutissant à deux arbres phylogénétiques qui expriment les relations évolutives entre les séquences étudiées. Les arbres ont été construits avec 1000 réplications de bootstrap pour chacun.

Les arbres construits sur la base des régions variables de ces trois gènes illustrent l'étroite association des différentes espèces de *Penicillium* (*P. expansum, P. chrysogenum, P. griseofulvum* et *P. roqueforti*) avec les espèces productrices de patuline *A. clavatus et Byssochlamys nivea*, qui constituent ensemble un groupe distinct avec *Zopfia rhisophila* (Figure 2). Cette dernière espèce dont le génome a été très récemment séquencé, présente 9 des 15 gènes du cluster de la patuline. Possédant un gène codant pour l'isoepoxydon deshydrogénase, nous pouvons raisonnablement penser que cette espèce peut produire de la phyllostine. La topologie des arbres montre que les

séquences d'*A. terreus* et *A. niger*, les deux autres espèces d'A*spergillus* incluses dans cette analyse qui possèdent une 6-methylsalicylique synthase sont phylogénétiquement plus éloignées de celle de *P. expansum* en comparaison avec *A. clavatus*. Ceci est marqué par un positionnement sur des branches très divergentes. Cette divergence est particulièrement prononcée pour l'espèce *A. niger;* reflétant ainsi une ancestralité commune avec le cluster de la yanuthone D beaucoup plus éloignée qu'avec le cluster de l'acide térréique.

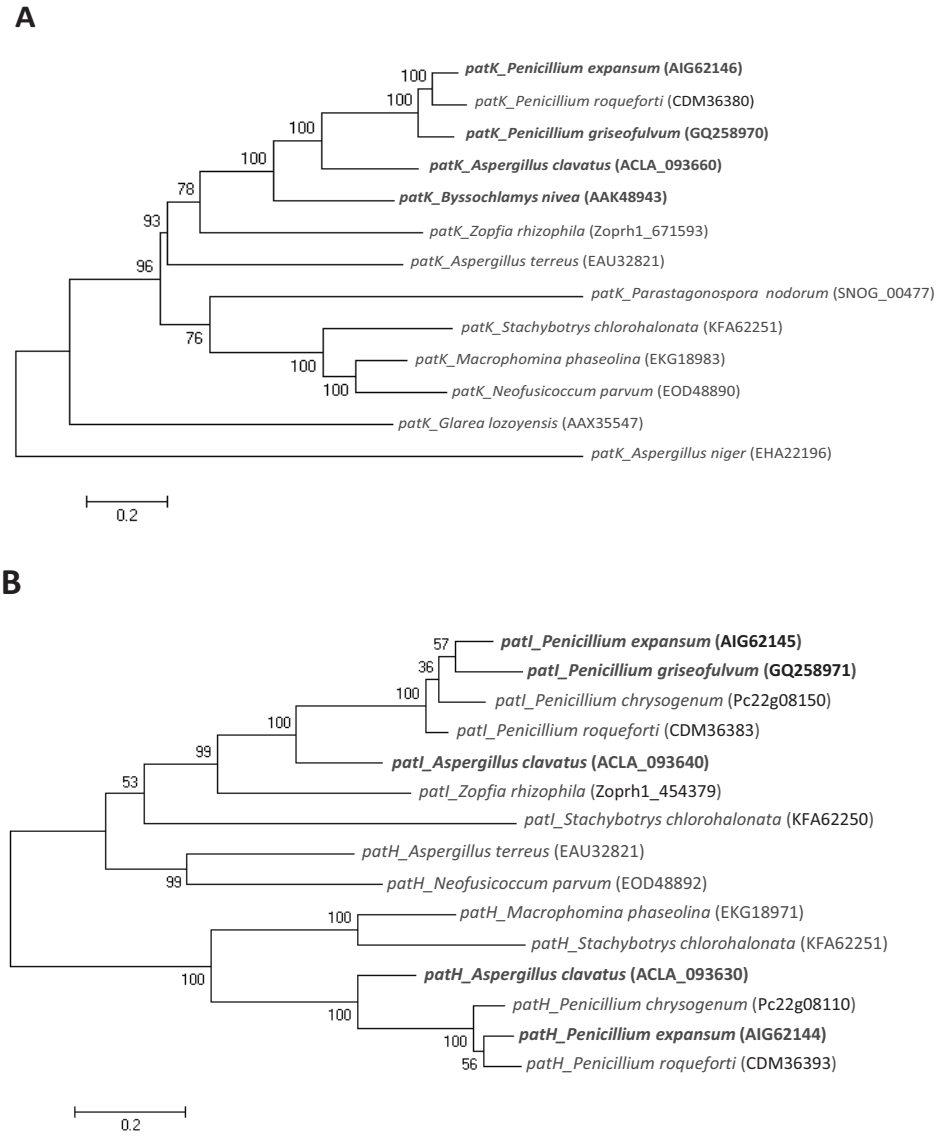


Figure 2 : Arbres phylogénétiques déduits des séquences partielles des gènes *patK* (A), *patH et patI* (B) du cluster de la patuline chez *P. expansum* ainsi que leurs gènes orthologues chez d'autres espèces fongiques, sélectionnées dans la banque de référence GenBank.
L'alignement a été généré par ClustalW, qui a ensuite été utilisé pour construire un arbre phylogénétique à l'aide de l'application MEGA, version 6.0. Les producteurs de patuline sont présentés en caractère gras, et les non-producteurs en police normale.

ANALYSE *IN SILICO* DES SÉQUENCES PROMOTRICES DES GÈNES DU CLUSTER DE LA PATULINE CHEZ *PENICILLIUM EXPANSUM*

Afin de mieux comprendre la spécificité et l'induction de la transcription des gènes du cluster de la patuline chez *P. expansum* ainsi que leurs éventuelles dérégulations, nous nous sommes penchés sur l'analyse *in silico* de leurs régions promotrices. Cette analyse a permis de mettre en évidence des sites de fixation potentiels pour des facteurs de transcription connus, en amont des séquences codantes de plusieurs gènes (Tableau 1).

A l'issue de notre analyse, deux sites de fixation pour le facteur de régulation global par le pH, PacC (5'-GCCARG-3') (Suárez and Penalva 1996), ont été repérés dans les régions promotrices des gènes *patA, patJ* et *patL*, de même que dans les régions codantes de plusieurs gènes. Les composants du système de régulation par le pH ont été dévoilés pour la première fois chez *A. nidulans*. Ce système implique les six gènes *pal* agissant en cascade pour activer le facteur de régulation à doigt de zinc PacC sous un pH alcalin (Peñalva and Arst 2004). La forme active de PacC entre dans le noyau et régule un grand nombre de gènes en se liant à la séquence consensus "GCCARG" située au niveau de leurs promoteurs. La forme active PacC est ainsi capable de réprimer l'expression de certains gènes dits « acides » et activer les gènes dits «alcalins », y compris le gène *pacC* lui-même (Tilburn et al. 1995).

L'influence du pH sur la régulation des voies du métabolisme secondaire fongique et l'intervention du facteur de régulation PacC ont largement été décrits dans la littérature. Une induction de la production d'aflatoxine a été observée chez *A. parasiticus* sous un pH acide. Cependant, cette production a été réprimée par un pH alcalin (Keller et al. 1997). Il a été observé, chez *A. nidulans*, qu'un pH alcalin engendre une augmentation de la production de stérigmatocystine associée à une augmentation des niveaux de transcription d'*aflR*, le facteur de transcription specifique de cette voie. Ce même résultat a été reproduit chez le mutant d'*A. nidulans* exprimant de manière constitutive la forme active de PacC et ''imitant'' les conditions alcalines de culture (Delgado-Virgen and Guzman-de-Peña 2009). Conséquemment, PacC serait un régulateur positif de la production de stérigmatocystine chez *A. nidulans*. Chez *F. verticillioides,* la production de fumonisines et l'expression du gène *fum1* sont fortement induites par un pH acide; cependant, cette toxine n'est pas produite à pH alcalin. La délétion du gène *pac1*, l'homologue de *pacC* chez

cette espèce, a conduit à une production de fumonisines et une induction de l'expression du gène *fum1* sous un pH alcalin. Ce résultat reflète ainsi l'idée que le gène *pac1* joue un rôle de répresseur de la voie de biosynthèse des fumonisines en conditions alcalines (Flaherty et al. 2003). La présence d'un site de fixation au facteur de régulation PacC sur le promoteur du gène *patL* n'est pas surprenant, sachant que les travaux menés au cours de cette thèse ont permis de caractériser ce gène en tant que facteur de régulation spécifique de la voie de biosynthèse de la patuline tout comme l'*aflR* dans les voies de biosynthèses des aflatoxines et de la stérigmatocystine. Le plus surprenant reste la présence de deux autres sites de fixation de PacC sur les promoteurs du gène *patA*, qui code pour un transporteur putatif d'acétate et du gène *patJ* de fonction inconnue.

Les données actuellement disponibles quant à l'effet du pH sur la production de patuline par *P. expansum* ne sont pas concluantes. Dans une étude récente, il a été montré que le mutant de *P. expansum* pour le gène *pacC,* généré par la méthode de l'interférence de l'ARN (RNAi) accumule moins de patuline par rapport à la souche sauvage, suggérant ainsi l'implication de PacC comme un régulateur positif de la voie de biosynthèse de la patuline (Barad et al. 2014). En contrepartie, il est bien connu que l'accumulation de patuline est favorisée à un pH acide et réprimé par un pH alcalin (Morales et al. 2008a). Au cours des premiers travaux de cette thèse, une sévère diminution de la production de patuline a également été observée en passant d'un pH acide à un pH neutre. Ceci réflète une régulation négative par la forme active de pacC qui vient se fixer au niveau des régions promotrices et codantes des gènes du cluster de la patuline, réprimant ainsi leur transcription. La fonction de régulation assurée par PacC dans la voie de biosynthèse de la patuline a besoin d'être clarifiée davantage afin d'obtenir une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui gouvernent la synthèse de la patuline sous différentes conditions de pH.

Outre son rôle dans la régulation des voies de biosynthèses des métabolites secondaires, l'implication potentielle de PacC dans le processus de virulence de plusieurs champignons a été également décrite. A ce jour, nous disposons de plusieurs exemples qui confortent cette hypothèse. Chez *Fusarium oxysporum*, le PacC agit probablement comme un régulateur négatif de la virulence du champignon vis-à-vis des plantes en réprimant, sous conditions acides, la transcription des gènes importants pour l'infection comme le *pg1* et *pg5* codant des endopolygalacturonases (Caracuel et al. 2003). Une autre étude de Bignell et al. (2005) suggère l'implication de PacC dans la pathogénicité d'*A. nidulans*. Dans cette étude, les infections causées par des souches mutantes pour

le PacC sont caractérisées par une croissance limitée *in vivo* accompagnée d'une réduction de l'infiltration cellulaire inflammatoire, par contre, l'activation constitutive de PacC s'est traduite par une croissance fongique massive et une augmentation de la mortalité. Similairement, les mutants au gène *pacC* d'*A. fumigatus* ont montré une pathogénicité nettement atténuée chez les souris leucopéniques, mettant en valeur le rôle de ce gène comme cible pour une éventuelle thérapie antifongique (Bertuzzi et al. 2014).

Récemment, il a été prouvé que le facteur de régulation PdPacC, l'orthologue de PacC chez *P. digitatum* joue un rôle important dans la pathogénicité de cette espèce via la régulation de l'expression des gènes codant les enzymes de dégradation de la paroi cellulaire tels que le *Pdpg2* et le *Pdpnl* (Zhang et al. 2013).

Tableau 1 : Sites de liaisons potentiels pour des facteurs de régulation identifiés en amont des gènes de la voie de biosynthèse de la patuline chez *P. expansum*.
NRFA (5'-GATA-3'), AbaA (5'-CATTCY-3'), StrE (5'-CCCT-3 '), SltA (5'-AGGCA-3'), pacC (5'-GCCARG-3') et BrlA (5'-MRAGGGR-3'). Les gènes sens sont en caractères gras, tandis que les gènes anti-sens apparaissent en police régulière.

	Sites de liaison potentiels					
	NRFA	**AbaA**	**StrE**	**SltA**	**PacC**	**BrlA**
patH	2039-2054 2733-2738	2499-2504				
patG			3962-3966 4272-4276 4304-4308			
patE	**5167-5172**	**5316-5321**	**5222-5226**	**5167-5171** **5324-5328**		
patD	9258-9263 9433-9438					
patC	11437-11442 11497-11502		11912-11917	11550-11554		
patB	**11443-11447** **11483-11487** **12025-12030**			**11443-11447** **11483-11487**		
patA	16226-16231 16255-16260 16325-16330		15970-15974 15994-15998	15801-15805	15952-15957	
patM	20920-20925 21046-21051	21138-21143	20928-20933			
patN	**20900-20905** **21042-21047**	**21295-21300** **21307-21312**	**21231-21235**	**20904-20908**		
patO	**22498-22503** **22709-22714**					
patL	28909-28914 29396-29401 29450-29455 29506-25511		28787-28791	28713-28717 29694-29698	28921-28926	28608-28614
patI	32238-32243					
patJ	33913-33918 34249-34254			33956-33960	34241-34246	
patK	33907-33912 34353-34358 34447-34452		34469-34473 34476-34480			

La contribution du pH au pouvoir pathogène a également été examinée chez *P. expansum* par Barad et al. (2012). Cette étude suggère que la pathogénicité de *P. expansum* est modulée par les modifications du pH, principalement induites par l'accumulation d'acide gluconique. Cette dernière est fortement influencée par le gène *gox2*, qui est significativement plus exprimé en conditions neutres et alcalines (pH 7 à 9) qu'en conditions acides (pH 4). Etant un facteur d'activation des enzymes pectolytiques comme la polygalacturonase, l'accumulation de cet acide gluconique est indispensable à la dégradation des parois cellulaires des fruits (Yao et al. 1996). Dans une étude ultérieure, Barad et al. (2014) témoignent du rôle du gène *pacC* dans le processus de pathogénicité de *P. expansum*. La mutation de ce gène a été accompagnée d'une réduction de l'accumulation de l'acide gluconique et de la patuline suivie d'une réduction significative de la pathogénicité du champignon. Cependant, l'accumulation conjointe au niveau du tissu colonisé des deux métabolites fongiques l'acide gluconique et la patuline, soulève la question de savoir si ces deux métabolites contribuent séparément ou en synergie à la pathogénicité de *P. expansum*. L'étude de Barad et al. (2014) n'apporte pas de réponse concluante à cette question, sachant que le mutant au gène *idh*, qu'ils ont généré a continué à produire de la patuline. Au cours de notre étude, une souche de *P. expansum* déficiente au facteur de régulation spécifique de la voie de biosynthèse de la patuline (*patL*) a été générée. Cette souche a entièrement perdu sa capacité à synthétiser de la patuline. Son pouvoir pathogène a ensuite été comparé *in vivo* avec celui de la souche parentale. Malgré l'absence de patuline, la souche mutante PeΔ*patL*1 était toujours capable de se développer sur les pommes. Cependant, un ralentissement significatif de sa croissance a été observé sur certaines variétés de pommes. Notre étude conclut que la patuline agit plutôt comme un facteur de virulence favorisant la propagation de la pourriture bleue sur les pommes et témoigne également de la différence de sensibilité à l'infection fongique entre les variétés de fruits.

A l'exception du gène *patG*, les régions promotrices de tous les gènes du cluster de la patuline chez *P. expansum* contiennent des sites de fixation (5'-GATA-3') pour le facteur de régulation global par l'azote (NRFA) (Haas and Marzluf 1995). La présence des éléments de type GATA n'est pas surprenant sachant que le niveau d'azote nutritif dans le milieu de culture a déjà été identifié comme un facteur déterminant pour l'activation de la voie de biosynthèse de la patuline (Rollins and Gaucher 1994). L'effet de l'ammonium sur les enzymes de cette voie est déjà bien documenté. Chez *Penicillium griseofulvum*, il a été montré qu'une réduction de la concentration en ions ammonium extracellulaires de 30 mM à 4 mM était suffisante pour induire la synthèse de la

patuline. En revanche, l'ajout de 30 mM de chlorure d'ammonium a engendré une diminution spectaculaire et spontanée de l'expression des gènes 6*msas* (*patK*) et *idh* (*patN*) de la voie de biosynthèse de la patuline, chez la même espèce (Fedeshko 1992). En accord avec nos résultats, plusieurs sites putatifs de type GATA qui interagissent avec le gène *nrfA*, ont été repérés dans les régions situées en amont de ces deux gènes chez *P. griseofulvum* (Ellis 1996).

La nature et les concentrations des sources d'azote dans le milieu de culture étaient susceptibles d'affecter et contrôler non seulement la croissance et la différenciation des champignons, mais aussi la biosynthèse de nombreux métabolites secondaires fongiques (Tudzynski 2014). Un aperçu sur d'autres métabolites secondaires dont la biosynthèse est affectée par la disponibilité en azote est donné dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Exemples de métabolites secondaires régulés par l'azote, d'après Tudzynski (2014).

Métabolite secondaire	**Champignon**	**Régulation par l'azote**	**Facteurs de régulation impliqués**	**Références**
Penicilline	*P. chrysogenum*	Répression par l'azote	NRE se fixe sur la région intergénique se trouvant entre le gène *pcbAB* et le gène *pcbC*	(Haas and Marzluf 1995)
Aflatoxine	*A. parasiticus* *A. flavus*	Réduction par NO_3 Induction par NH_4	AreA se fixe sur la région promotrice d'*aflR*	(Chang et al. 2000), (Ehrlich and Cotty 2002)
Fumonisine	*F. verticillioides*	Répression par l'azote	AreA-dépendant	(Kim and Woloshuk 2008)
Trichothécène (DON)	*F. graminearum*	Répression par l'azote	AreA-dépendant	(Min et al. 2012)

Cette analyse *in silico* a révélé également la présence des sites potentiels de fixation pour les facteurs de régulation liés à la conidiogénèse, AbaA (5'-CATTCY-3') et BrlA (5'-MRAGGGR-3'). Ce dernier agit comme un interrupteur en contrôlant le passage de la croissance apicale des hyphes vers le développement de mycélium aérien qui se différencie en conidiophores (Adams et al. 1988). BrlA régit l'expression du gène *abaA*, qui lui-même contrôle la différenciation des phialides (Sewall et al. 1990). La présence de ces sites de liaison putatifs étaye les résultats obtenus dans une

ancienne étude de Sekiguchi et Gaucher (1977). Dans cette étude, les mutants défectueux pour la production de conidiophores ont synthétisé nettement moins de patuline en comparaison avec la souche parentale. A ce jour, l'action directe de BrlA sur les voies de biosynthèse n'est pas mise en évidence, néanmoins sa suppression chez *Aspergillus fumigatus* a affecté la production de fumigaclavine C (Coyle et al. 2007), de trypacidine (Gauthier et al. 2012) et de fumiquinazoline C (Lim et al. 2014). Une étude récente a révélé que le niveau d'expression de 7 clusters de gènes liés au métabolisme secondaire dont celui impliqué dans la synthèse de la roquefortine C, a été drastiquement régulé par BrlA chez *Penicillium oxalicum* (Qin et al. 2013). Il a été également démontré que BrlA est impliqué dans l'activation du promoteur du gène *pksA* chez les espèces aflatoxinogènes d'*Aspergillus* (Ehrlich et al. 2002). En revanche, la production de stérigmatocystine s'est trouvée inaffectée chez le mutant ΔBrlA d'*A. nidulans*, indiquant que la sporulation et la synthèse de stérigmatocystine sont co-régulées en amont de BrlA (Guzmán-de-Peña et al. 1998).

Nombreux sites de fixation putatifs au facteur de transcription à doigt de zinc de type C_2H_2, SltA (5'-AGGCA-3'), impliqué dans l'homéostasie des cations ont été repérés sur les séquences promotrices de sept gènes du cluster de la patuline chez *P. expansum*. Récemment, Shantappa et al. (2013) ont apporté la preuve que SltA régule positivement la biosynthèse de la stérigmatocystine chez *A. nidulans* en agissant sur l'AFLR, régulateur spécifique de cette voie. En ce qui concerne la patuline, rien n'a été publié à ce sujet.

Pour en finir, plusieurs motifs StrE (éléments de réponse associés au stress) ont été retrouvés au niveau des séquences intergéniques du cluster de la patuline chez *P. expansum*, bien qu'il n'y ait pas de preuve claire de l'implication du stress oxydatif dans la production de cette dernière. Néanmoins, l'association entre le stress oxydatif et la production d'autres classes de mycotoxines a été bien établie. Jayashree et Subramanyam (2000) ont été les premiers à signaler que le stress oxydatif induit la biosynthèse de l'aflatoxine chez *A. parasiticus*. Des années plus tard, Kim et al. (2006) ont montré que le traitement d'*A. flavus* avec l'hydroperoxyde de tert-butyle, engendre des augmentations significatives de la production des aflatoxines par cette espèce. Un traitement similaire s'est traduit par le même résultat chez *A. parasiticus* (Reverberi et al. 2006). Lorsque le peroxyde d'hydrogène a été quotidiennement ajouté à une culture liquide de *Fusarium graminearum*, l'accumulation de trichothécènes (DON) par cette espèce a été rapidement et significativement augmentée (Ponts et al. 2006). Très récemment, une extinction de la voie de

biosynthèse de l'ochratoxine A, associée à une induction de celle de la citrine a été observée chez *P. verrucosum* en la présence de concentrations élevées en cations Cu^{2+} , qui imposent au champignon un stress oxydatif (Schmidt-Heydt et al. 2015). En contrepartie, le traitement avec des agents antioxydants a eu comme conséquence une inhibition de la biosynthèse de certaines mycotoxines. Les tanins hydrolysables extraits des noix, dont principalement l'acide gallique, ont considérablement inhibé la biosynthèse de l'aflatoxine chez *A. flavus* (Mahoney and Molyneux 2004). Le traitement du même champignon par l'acide caféique s'est traduit par une réduction significative de l'expression de nombreux gènes du cluster de l'aflatoxine (Campbell et al. 2008). L'effet protecteur des antioxydants a été également décrit contre la production d'autres mycotoxines comme l'ochratoxine A (Palumbo et al. 2007) et les trichothécènes (Boutigny et al. 2009; Bollina and Kushalappa 2011).

L'inhibition de la production de patuline par un traitement à base d'antioxydants a déjà été mise en évidence. L'ajout au milieu de culture de molécules ayant une activité antioxydante telles que la quercétine et l'umbelliferone, a réduit de manière significative l'accumulation de patuline avec un effet mineur sur la croissance radiale de *P. expansum* (Sanzani et al. 2009b). Ces résultats sont en accord avec ceux de Mossini et al. (2004) ayant rapporté une forte inhibition de la production de patuline par traitement aux feuilles de neem riches en antioxydants, notamment en quercétine. Les mécanismes moléculaires responsables de cette inhibition ont été clarifiés au cours de l'étude de Sanzani et al. (2009b). En fait, la transcription de cinq gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse de la patuline a été réprimée sous l'action des agents antioxydants. Parmi ceux dont l'expression a été affectée, on distingue les gènes *patK*, *patN* et *patM.* La répression de ces trois gènes peut être expliquée par la présence de sites de fixation au facteur de régulation par le stress oxydatif au niveau de leurs régions promotrices (Tableau 1). Les deux autres gènes (*p450-1* et *p450-2*) codant pour des monooxygénases initialement suspectées d'intervenir dans la synthèse de la patuline (White et al. 2006) sont également affectés au niveau transcriptionnel par le traitement antioxydant. Or ces deux gènes ne présentent qu'une très faible homologie avec *patH* et *patI* présents sur le cluster de la patuline. Il est maintenant admis que les gènes *p450-1* et *p450-2* ne sont pas impliqués dans la synthèse de la patuline mais dans la synthèse de la geosmine (Siddique 2012). Par contre, il est intéressant de noter que les régions promotrices de *patH* et *patI* sont dépourvues de motifs STRE. Ce résultat n'est pas surprenant sachant que les antioxydants naturels sont déjà connus pour inhiber l'activité de diverses enzymes à activité pro-oxydante

comme les cyclooxygénases, les lipoxygénases (Hodnick et al. 1988) et certaines P450 monooxygénases (Kim et al. 2008).

LES FONCTIONS HYPOTHÉTIQUES DES GÈNES IMPLIQUÉS DANS LA VOIE DE BIOSYNTHÈSE DE LA PATULINE

La découverte du cluster des gènes responsables de la synthèse de la patuline chez *P. expansum* constitue la première étape d'une démarche globale d'élucidation des mécanismes de biosynthèse de cette mycotoxine et leurs régulations. Ce travail a par la suite été complété par une caractérisation et analyse fonctionnelle de deux gènes de ce cluster.

La caractérisation du gène *patL*, codant pour le facteur de régulation spécifique de la voie de biosynthèse de la patuline apporte une preuve supplémentaire que le cluster séquencé est celui impliqué réellement dans la biosynthèse de la patuline chez *P. expansum*. En effet, le fait que l'inactivation de ce gène ait été accompagnée d'une absence de production de patuline par la souche mutante et d'une extinction totale de l'expression des gènes appartenant au même cluster le confirme.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons également élucidé la dernière étape de la voie de biosynthèse de la patuline. Cette étape est assurée par une Glucose Méthanol Choline (GMC) oxydoréductase qui catalyse l'oxydation de l'ascladiol en patuline. Cette enzyme est codée par *patE,* le quatrième gène du cluster de la patuline chez *P. expansum*. Ces travaux complètent des études bien antérieures menées durant les années 1980 qui avaient identifié l'ascladiol comme précurseur direct de la patuline chez *P. griseofulvum* (Sekiguchi et al. 1983). Les hypothèses sur les rôles potentiels de ces deux gènes ont été construites autour d'une recherche de similarités et de domaines protéiques conservés dans les bases de données GenBank. La validation de ces hypothèses s'est faite par inactivation complète de la fonction des gènes grâce à la mutagenèse ciblée.

Des recherches identiques ont été conduites pour les autres gènes du cluster n'ayant pas été caractérisés jusqu'à présent. L'analyse bioinformatique de la séquence protéique codée par le gène *patA* révèle la présence d'un domaine conservé appartenant à la famille des protéines membranaires appelée GPR1/FUN34/YaaH (pfam01184). Les membres de cette famille contiennent généralement cinq à six domaines transmembranaires potentiels, d'où leur localisation habituelle au niveau d'une membrane. Ces domaines conservés ont été retrouvés sur la séquence

protéique codée par le gène *ady2* chez *Saccharomyces cerevisiae.* Ce gène a été identifié comme un composant essentiel dans le transport de l'acétate, sachant que sa perturbation aboli le transport actif de l'acétate chez cette espèce (Paiva et al. 2004). Le premier transporteur d'acétate identifié chez les champignons filamenteux était la protéine ApaC (Acétate Perméase A) chez *A. nidulans* (Robellet et al. 2008). Dans cette étude, la croissance d'un mutant déficient au gène *apaC* s'est trouvée largement affectée lorsque l'acétate est utilisé à faible concentration comme seule source de carbone. L'utilisation des transporteurs d'acétate dans les voies de biosynthèses des métabolites secondaires fongiques n'a jamais été décrite. Cependant, compte tenu que la voie métabolique de la patuline débute par l'incorporation d'une molécule d'acétyl-CoA, nous pouvons imaginer que le gène *patA* du cluster de la patuline code pour un transporteur potentiel d'acétate qui assurera éventuellement l'entrée de l'acétate dans la cellule ou dans une organelle de celle-ci, pour déclencher la voie de biosynthèse.

Des domaines conservés caractérisant les transporteurs de la famille MFS (Major Facilitator Superfamily) (pfam07690) et les transporteurs à ATP binding cassette (ABC) (pfam06422, pfam01061, cd03232 et cd03233) ont été respectivement retrouvés dans les séquences protéiques codées par les gènes *patC* et *patM* du cluster de la patuline chez *P. expansum.* Ces deux superfamilles de transporteurs présentent une spécificité remarquablement large vis-à-vis de leurs substrats et sont aptes à transporter une grande variété de produits toxiques endogènes (Stergiopoulos et al. 2002). Outre leur rôle de transport et de sécrétion des métabolites fongiques, De Waard (1997) avait postulé que ces transporteurs jouent un rôle important dans la protection contre les composés exogènes sécrétés par les végétaux. De ce fait, il pourrait être affirmé que ces deux types de transporteurs contribuent au processus de virulence chez le champignon. Pour les transporteurs MFS, plusieurs exemples sont présents dans la littérature. Le premier transporteur MFS impliqué dans la sécrétion des toxines fongiques a été rapporté par Pitkin et al. (1996). Il s'agit du gène *toxA* codant un MFS transporteur responsable de la sécrétion du tétrapeptide cyclique HC-toxine chez *Cochliobolus carbonum*. Dans le cluster des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des trichothécènes chez *Fusarium sporotrichioides*, le gène *tri12* code pour un transporteur de type MFS. Des mutants de *S. cerevisiae* transformés avec le gène *tri12* ont montré une diminution de sensibilité aux trichothécènes. Dans cette même étude, la perturbation de ce gène chez *Fusarium sporotrichioides* était responsable de la réduction de la sécrétion de trichothécènes chez la souche mutante Δ*tri12*. Sur la base de ces résultats, il en a été déduit que le gène *tri12* est potentiellement

impliqué dans le transport des trichothècenes ainsi que dans l'autoprotection de *F. sporotrichioides* contre sa propre production de ces mycotoxines (Alexander et al. 1999).

Les données disponibles quant au rôle des transporteurs fongiques de type ABC dans la sécrétion des métabolites secondaires fongiques sont beaucoup plus limitées. Le papier d'Andrade et al. (2000) décrit la caractérisation des deux gènes *atrC* et *atrD*, codant deux transporteurs de type ABC chez *A. nidulans*. Dans cette étude, une diminution de production de penicilline chez les mutant Δ*atrD* a été observée, suggérant ainsi l'implication de ce transporteur ABC dans la sécrétion de la penicilline hors des cellules fongiques. Un autre exemple de transporteurs de type ABC est celui codé par le gène *sirA*, localisé dans le cluster des gènes de la voie de biosynthèse de la sirodesmine chez le phytopathogène *Leptosphaeria maculans* (Gardiner et al. 2005). La disruption de ce gène a entrainé une augmentation de la sécrétion de sirodesmine dans le milieu, ainsi qu'un accroissement de la sensibilité du mutant vis-à-vis de cette phytotoxine. Sur la base de ces résultats, il en a été déduit que le gène *sirA* contribue à l'auto-protection de *L. maculans* contre la sirodesmine et qu'un transporteur autre que SirA est principalement responsable de l'efflux de sirodesmine. Une étude très récente de Kosawang et al. (2014) rapporte l'implication de transporteurs de type ABC chez le champignon *Clonostachys rosea* dans le transport de la zéaralénone et ses produits de dégradation hors des cellules fongiques, afin d'empêcher leurs endommagements par la mycotoxine.

Actuellement, aucune étude ne décrit les rôles qu'assurent les transporteurs de type MFS et ABC dans la voie de biosynthèse de la patuline. En se basant sur les informations évoquées précédemment, les deux transporteurs codés par les gènes *patC* et *patM* sont soupçonnés être responsables de l'excrétion de la patuline hors des cellules fongiques afin d'empêcher le dommage que pourra causer ce facteur de virulence chez son propre champignon producteur.

Quant aux cinq gènes restants de ce cluster, des analyses BLASTp ont permis de mettre en évidence des similarités et des homologies avec des protéines assurant des fonctions bien déterminées. L'observation des structures chimiques des différents précurseurs de la patuline nous a permis de suggérer l'implication potentielle de ces gènes dans l'une ou l'autre des étapes de la voie de biosynthèse. Dans une étude bien antérieure de Fedeshko (1992), la néopatuline synthase responsable de la conversion de la phyllostine en néopatuline a été purifiée et un séquençage protéique a été effectué sur la partie N-terminale de la protéine. L'alignement de la séquence partielle de cette enzyme avec les séquences protéiques codées par les gènes du cluster de la

patuline révèle une forte homologie avec la partie N-terminale de la protéine codée par le gène *patF.* Par conséquent, ce gène est suspecté d'être responsable de la huitième étape de la voie de biosynthèse de la patuline au cours de laquelle la néopatuline dotée d'une fonction lactone et hémiacétal est produite. L'étape qui suit celle de la synthèse de la néopatuline n'est pas non plus caractérisée. Au cours de cette étape, la fonction hémiactétal de la néopatuline est réduite en alcool primaire en générant du NAD^+. Cette réaction est éventuellement soumise à l'action d'une alcool-déshydrogénase (Ying and Ma 2011). Parmi les autres gènes non-caractérisés du cluster de la patuline, l'analyse de la séquence protéique du gène *patD*, met en évidence la présence de domaines conservés de la famille des alcools déshydrogénases (COG1064). Par analogie, l'implication du gène *patD* dans la transformation de la néopatuline en ascladiol parait la plus logique.

En se basant sur l'analyse Blast et la recherche de domaines protéiques conservés, le gène *patO* code potentiellement pour une isoamylalcool oxydase. Ce gène a été identifié dans une étude antérieure de Dombrink-Kurtzman (2008) chez *P. griseofulvum*, cependant sa fonction précise dans la voie de biosynthèse de la patuline est demeurée obscure. Cette famille d'enzymes (pfam01565) utilise souvent la flavine adénine dinucléotide (FAD) comme cofacteur et catalyse l'oxydation d'un alcool primaire en son aldéhyde correspondant (Chung et al. 2009). Une vue d'ensemble de la voie de biosynthèse de la patuline reflète l'action d'une alcool-oxydase sur le gentisylalcool pour le transformer en gentisaldéhyde. L'implication du gène *patO* à ce niveau reste l'hypothèse la plus plausible.

Des recherches identiques menées auprès du gène *patJ*, affirment que ce dernier code pour une dioxygénase (Artigot et al. 2009). Dans la voie de biosynthèse de la patuline, le passage du gentisaldéhyde à l'isoépoxydon met en évidence l'intervention d'une oxygénase qui réagit directement sur la fonction alcène présente dans le gentisaldéhyde pour former le groupement époxyde de l'isoépoxydon. Par conséquent la fonction assurée par le gène *patJ* dans la voie de biosynthèse de la patuline serait éventuellement l'époxydation du gentisaldéhyde. Une réaction identique pourrait également avoir lieu entre le gentisyl alcool et l'isoépoxydon. Cette dernière serait également catalysée par l'enzyme codée par le gène *patJ.* Une grande controverse subsiste encore quant à l'implication directe du gentisyl alcool ou du gentylsaldéhyde dans la voie de biosynthèse de la patuline. Bien que dans l'étude de Forrester et Gaucher (1972a), le gentisyl alcool ne figurait pas parmi les co-métabolites aptes à se transformer en patuline, un extrait brut qui

catalyse l'époxydation du gentisyl alcool en phyllostine a été isolé par Priest et Light (1989). L'élucidation du rôle de PATJ permettrait de mettre fin à cette controverse en confirmant l'implication éventuelle du gentisaldéhyde.

Finalement, la recherche de domaines protéiques conservés sur la séquence du gène *patB*, affirme que ce dernier code pour une enzyme de la superfamille des Estérases-lipases (carboxyl-estérases). Aucune hypothèse n'a pu être retenue quant à l'intervention de cette enzyme dans la voie de biosynthèse de la patuline. Par conséquent la fonction métabolique de la protéine PATB ne pourra être élucidée que par une disruption du gène codant et l'analyse de l'impact de la mutation sur la voie de biosynthèse.

Toutes ces fonctions énoncées précédemment restent des fonctions hypothétiques. Aujourd'hui, sans étude aussi développée que celle menée pour les gènes *patE* et *patL*, la fonction de ces gènes et leur contribution dans l'une ou l'autre des étapes de la voie de biosynthèse de la patuline ne peut être élucidées.

LES STRATÉGIES DE CONTRÔLE DE LA CONTAMINATION PAR LA PATULINE DANS L'ALIMENTATION

La patuline est un contaminant chimique présentant un large spectre d'activité. Les preuves sur sa génotoxicité (Schumacher et al. 2005; Glaser and Stopper 2012), sa cytotoxicité (Burghardt et al. 1992; Mahfoud et al. 2002; Donmez-Altuntas et al. 2013) ainsi que sur ses autres effets toxiques découlent des résultats de nombreuses études *in vivo* et *in vitro.* Compte tenu des données sur sa toxicité dont on dispose et la probabilité d'une exposition humaine significative, plusieurs stratégies de lutte contre l'occurrence de la patuline dans les aliments ont été développées. Parmi les stratégies conçues dans cette objectif, certaines sont appliquées en amont de la production de patuline comme moyens de lutte contre le développement du pathogène lors de la récolte et pendant le stockage des fruits, tandis que d'autres permettront d'apporter des actions correctives en post-production.

Les ruptures de l'épicarpe et les autres dommages physiques que subissent les fruits constituent la principale porte d'entrée à *P. expansum* et aux autres espèces productrices de patuline. Par conséquent, la qualité des fruits qui dépend essentiellement de la méthode de récolte est la première requête pour contrôler les niveaux de patuline. Dans une étude de Jackson et al. (2003), la patuline était indétectable dans le cidre issu de sept variétés de pommes cidricoles

récoltées de l'arbre, tandis que cette mycotoxine a été détectée à des concentrations s'échelonnant entre 40,2 et 374 µg/L dans le cidre issu de quatre variétés de pommes ramassées au sol.

D'autres traitements post-récolte dont le lavage et le tri des fruits se sont avérés efficaces pour lutter contre la contamination fongique et la production de patuline. Le lavage des fruits au jet d'eau sous haute pression, éliminant les parties pourries de ces fruits, a significativement réduit les teneurs en patuline retrouvées dans les jus de pomme (Acar et al. 1998).

La lutte chimique contre les champignons producteurs de patuline susceptibles de contaminer les fruits existe depuis des millénaires. De nos jours, l'usage de fongicides comme le benzimidazole a contribué à des résultats satisfaisants en termes de réduction de la pourriture des pommes pendant l'entreposage et par conséquence en termes de réduction de la production de patuline. Cependant, leur utilisation massive non- recommandée, a conduit à l'apparition de souches de *P. expansum* résistantes (Rosenberger et al. 1991). L'usage d'agents antifongiques d'origine entièrement naturelle a apporté des résultats satisfaisants en termes de lutte contre les producteurs de patuline. Il a été démontré très récemment que la propolis, une résine végétale fabriquée par les abeilles, peut être appliquée comme un agent antifongique pour inhiber la croissance de *P. expansum* et prévenir la production de patuline (Silici and Karaman 2014).
Ces méthodes décrites précédemment pour prévenir la pourriture des pommes entreposées exigent un travail intensif et sont souvent sujettes à l'échec. En effet, il suffit d'avoir une seule pomme contaminée par *P. expansum* dans un lot de 1000 pommes pour retrouver des teneurs en patuline qui dépassent le seuil autorisé pour ce lot (Salomão et al. 2008). Par conséquence, la recherche a été dirigée vers le développement de procédés pour détoxifier ou réduire les teneurs en patuline après sa production. Ces derniers sont répartis en trois catégories principales ; on distingue les procédés physiques, chimiques et biologiques.

L'adsorption sur du charbon actif suivi d'une filtration est le traitement physique le plus anciennement connu et appliqué pour la détoxification de la patuline. L'ajout de 5 mg/mL de charbon actif a pu réduire la patuline en dessous des niveaux détectables dans le cidre naturellement contaminé (Sands et al. 1976). Bien qu'il soit très efficace comme traitement, son utilisation est limitée par ses effets négatifs sur les propriétés organoleptiques et physico-chimiques du jus (la couleur, la teneur en acide fumarique, le pH et le brix) (Kadakal and Nas 2002). En outre, il reste un procédé onéreux qui peut avoir un fort impact sur l'environnement.

Depuis peu, des études sur l'utilisation des rayonnements UV germicides ont été conduites (Dong et al. 2010; Assatarakul et al. 2012; Tikekar et al. 2013). Dans ces études, le traitement UV a montré une certaine efficacité dans la réduction des niveaux de patuline dans le jus de pomme clarifié, cependant il est impraticable dans le cas du cidre non filtré en raison des niveaux élevés de particules en suspension qui absorbent ou bloquent le rayonnement avant d'atteindre les molécules de patuline. Contrairement au premier traitement au charbon actif, ce moyen de décontamination est efficace sans changement notable des propriétés chimiques et organoleptiques du produit.

Les méthodes chimiques de décontamination se sont également avérées efficaces et plus adaptées pour la détoxication de la patuline au niveau industriel. Deux des moyens les plus vigoureux à cet égard sont l'ammoniation et l'oxydation par le permanganate de potassium. Ces deux traitements se sont montrés très bénéfiques en réduisant des niveaux de patuline jusqu'à 99,99 % (Frémy et al. 1995). Néanmoins, l'application du permenganate de potassium en milieu acide a généré des résidus mutagènes et par conséquent l'oxydation en milieu alcalin a été recommandée comme voie de détoxication.

Le traitement avec divers composés sulfurés a été un autre axe de recherches intensives. Bien qu'affichant des résultats différents concernant le degré d'efficacité de ce traitement, la plupart de ces études concluent que la patuline est instable en présence du dioxyde de soufre. En effet, une première étude de Ough et Corison (1980) a signalé une réduction des teneurs en patuline de moitié, immédiatement après l'application de 100 ppm de dioxyde de soufre. Cependant, dans une autre étude, 200 ppm de dioxyde de soufre, le maximum autorisé dans l'industrie alimentaire, n'a engendré qu'une légère diminution de 12 % du niveau de patuline en 24 heures (Burroughs 1977).

Yazici et Velioglu (2002) ont montré que des réductions importantes des teneurs en patuline dans le jus de pomme pouvaient être achevées par traitement avec la vitamine B, le chlorhydrate de pyridoxine et le Calcium D-Pantothenate.

Enfin, un autre procédé de détoxification chimique faisant appel à l'utilisation de l'ozone a été examiné. Dans l'étude de McKenzie et al. (1997), le traitement d'une solution de patuline à 32 µM avec 10 % d'ozone pendant 15 secondes a entrainé une réduction des teneurs en patuline à un niveau indétectable.

Malgré les résultats satisfaisants apportés par ces traitements, la tendance mondiale est actuellement de réduire le recours aux produits chimiques, en développant des méthodes

alternatives. Le bio-contrôle, faisant appel à des microorganismes comme la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Moss and Long 2002) et la bactérie à gram négatif *Gluconobacter oxydans* (Ricelli et al. 2007) est une de ces méthodes alternatives. Ces méthodes génèrent des produits de dégradation qui sont supposés être moins toxiques que la mycotoxine elle-même. Quoique les méthodes biologiques soient efficaces pour détoxifier la patuline, leur utilisation est limitée aux produits qui peuvent être fermentés. Outre les microorganismes connus pour dégrader la patuline, d'autres ont été décrits pour leur capacité à adsorber cette mycotoxine grâce à leur paroi cellulaire sans pouvoir la dégrader (Hatab et al. 2012). Une étude très récente de Zhu et al. (2015) rapporte que l'utilisation de la levure *Rhodosporidium paludigenum* inhibe et réduit la contamination des pommes et des poires par la patuline. Il a été démontré que cette espèce exerce deux mécanismes d'action, à savoir, l'adsorption physique et la dégradation biologique.

Bien que l'identité des produits de biodégradation de la patuline soit connue depuis des années, les données relatives à leur toxicité sont très limitées voire absentes (Suzuki et al. 1971), en comparaison avec celles disponibles sur la toxicité de la molécule parentale. Dans notre étude, le potentiel cytotoxique de l'ascladiol, qui est le principal produit de dégradation de la patuline sous conditions anaérobiques, a été évalué *in vitro* sur une lignée cellulaire intestinale. Ces analyses prouvent clairement que l'ascladiol ne présente pas de risque réel, sachant qu'aucun signe de cytotoxicité n'a été observé à des concentrations allant jusqu'à 100 µM. La patuline, testée à la même gamme de concentrations, a engendré une baisse significative, dose dépendante de la prolifération cellulaire. De telles données sur l'innocuité de l'ascladiol sur des cultures cellulaires ont été rapportées pour la première fois. Il sera intéressant de compléter ces analyses en procédant à l'évaluation complète de l'innocuité de ce métabolite par des expérimentations *ex-vivo* sur des tissus isolés d'organe entier.

Dans cette thèse, l'accent est particulièrement mis sur deux approches préventives mises en place pour réduire les risques de contamination des pommes par *P. expansum* et contrôler par conséquent l'occurrence de la patuline dans la chaine alimentaire. Ces méthodes prédictives ont fait la preuve de leur efficacité en tant qu'outils de lutte contre diverses contaminations d'origine fongique. La première approche consiste en l'élaboration d'un modèle mathématique prédictif, simulant la croissance de l'espèce *P. expansum* dans un contexte environnemental donné. Ce modèle tient compte de trois facteurs abiotiques qui affectent principalement le taux de croissance et le pouvoir toxinogène de cette espèce. Cet outil permet dès à présent une estimation rapide de la

vitesse de croissance de ce champignon en réponse à une combinaison définie de température, d'a_W et de pH. Ce modèle a été soumis à deux procédures de validation, une première validation mathématique, vérifiant que les écarts entre les valeurs théoriques prévues par le modèle et les données obtenues dans les conditions qui ont servi à le construire ne sont pas excessifs. Une deuxième validation expérimentale vérifiant que le modèle est applicable en conditions naturelles a été effectuée sur des pommes de différentes variétés. A l'issue de cette analyse, les écarts entre les valeurs théoriques prévues par le modèle construit et les valeurs de vitesses réellement obtenues sur les pommes contaminées artificiellement n'étaient pas excessifs.

Bien que ce modèle s'intéresse uniquement au développement de *P. expansum*, ce travail a été complémenté par une caractérisation des conditions qui gouvernent la production de patuline par ce champignon. Aux termes de ce travail, il a été prouvé que la gamme de conditions nécessaires à la production de cette mycotoxine est plus étroite que celle permettant la prolifération du champignon.

Actuellement, la mycologie prévisionnelle qui ouvre de nombreuses perspectives d'utilisation a tendance à s'étendre dans le domaine de la maitrise des dangers microbiens dans la chaine alimentaire. Il est à noter que cet outil a aujourd'hui été utilisé et évalué dans un contexte industriel. La multinationale ''Unilever'' est un des exemples d'industries ayant relever le défi de combler le gap entre le développement scientifique et la mise en pratique dans l'industrie en mettant au point des modèles de microbiologie prévisionnelle adaptés à leurs besoins et aux produits qu'ils fabriquent et commercialisent (Membré and Lambert 2008).

De nombreux modèles mathématiques destinés à prédire la croissance fongique ont été publiés et ce nombre est en constante augmentation. Le Tableau 3 regroupe les principaux modèles mathématiques appliqués à ce jour et validés pour leur utilisation en conditions naturelles sur des denrées alimentaires.

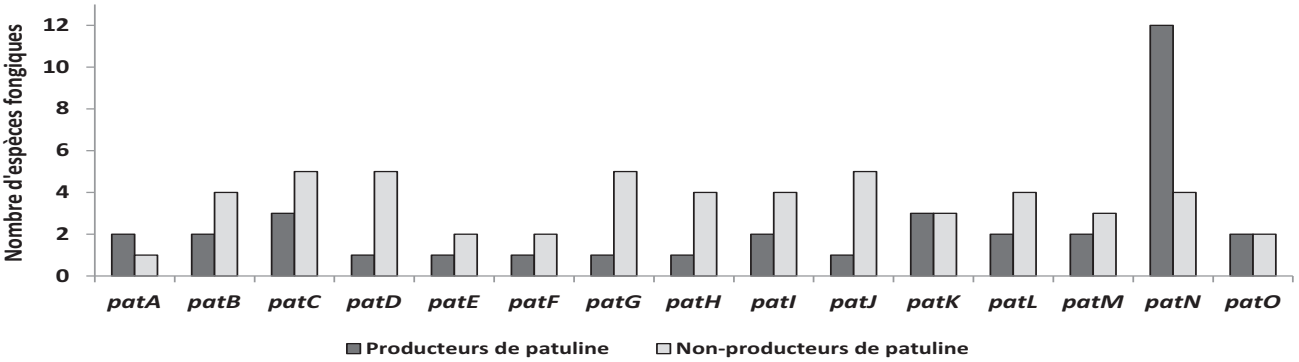
Tableau 3 : Exemples de modèles mathématiques développés pour prédire la croissance fongique

Espèce fongique	Facteurs environnementaux	Matrices alimentaires	références
A. ochraceus	Température, a_W	Grains d'orge	(Pardo et al. 2004)
Eurotium chevalieri, A. fumigatus, P. brevicompactum	a_W, pH	Confiture de lait	(Char et al. 2005)
P. verrucosum	Température, a_W, composition gazeuse	Grains de blé	(Cairns-Fuller et al. 2005)
A. flavus *A. parasiticus*	Température, a_W	Maïs	(Samapundo et al. 2007b)
P. expansum	Température	Pomme	(Baert et al. 2007b)

Le séquençage du cluster de la patuline chez *P. expansum* était un atout majeur pour le développement d'un outil de diagnostic moléculaire. Un système de PCR en temps réel a été mis au point en fin de cette thèse, pour la détection et la quantification directe de l'espèce *P. expansum* dans les pommes. Un protocole d'extraction directe de l'ADN fongique à partir du fruit a été développé. Ceci apporte des avantages, surtout en termes de gain de temps, par rapport aux travaux antérieurs, dans lesquels l'extraction d'ADN fongique à partir de pommes est précédée d'un isolement et d'une mise en culture sur milieu PDA (Alwakeel 2013). Dans notre travail, la détection de l'espèce *P. expansum* est assurée grâce à un couple d'amorces spécifiques dessinées à partir de la séquence d'un gène du cluster de la patuline chez cette espèce. Le choix du gène cible est toujours l'élément crucial assurant la garantie de la spécificité de la détection. La logique a été de choisir un gène codant pour une enzyme hautement spécifique à la voie de biosynthèse de la patuline et non-impliquée dans d'autres voies du métabolisme secondaire. L'analyse Blast des séquences nucléiques de tous les gènes du cluster de la patuline a orienté notre choix vers les gènes *patA*, *patE* et *patF* qui s'apparentent avec un nombre limité de séquences d'origine fongique, déposées dans la base de données GenBank (Figure 3). Pour le gène *patA* qui code pour un transporteur potentiel d'acétate, les résultats de nos travaux suggère qu'il serait impliqué dans d'autres voies du métabolisme secondaire, utilisant l'acétate comme unité de départ. En effet, une sur-expression de ce gène a été observée sous conditions restrictives à la production de patuline, associée à une répression des autres gènes du cluster, ce qui sous-entend qu'il serait impliqué dans d'autres voies de biosynthèse (Tannous et al. 2014). Par conséquent, le gène *patA* ne s'avère pas être le meilleur

candidat pour développer un outil moléculaire de détection spécifique d'un producteur de patuline. Concernant les gènes *patE* et *patF*, leur séquences nucléiques s'apparentent avec trois séquences uniquement appartenant à des champignons, alors que les autres apparentées sont d'origine bactériennes. A cet égard, aucune priorité n'est donnée à l'un ou l'autre de ces gènes. Le séquençage du génome de *P. roqueforti* par Cheeseman et al. (2014) a favorisé notre choix pour le gène *patF*. Ce dernier étant absent chez cette espèce non productrice de patuline, est retrouvé chez les deux espèces productrices, appartenant à la même série *Roqueforti* que sont *P. carneum* et *P. paneum* (Tannous et al. non publié). Le gène *patE* est par contre présent chez *P. roqueforti,* mais la protéine résultante est partiellement tronquée.

En contrepartie, le gène *patN* (*idh*) qui a fait l'objet de plusieurs études de diagnostic moléculaire depuis une dizaine d'années et jusqu'à présent (Paterson et al. 2000; Paterson et al. 2003; Dombrink-Kurtzman and McGovern 2007; Luque et al. 2011), est le gène qui s'apparente avec le plus grand nombre de séquences dans la base de données Genbank (Figure 3). Il est a noté que le système PCR mis en place par Paterson et al. (2000) pour détecter les producteurs de patuline appartenant aux genres *Penicillium* n'était pas spécifique aux espèces productrices. Dans leur étude, tous les isolats de *P. expansum* ont révélé une capacité de production de patuline en présence de ce gène. Cependant, certains isolats de *P. brevicompactum* possédant le gène *idh* ont montré une incapacité à produire patuline. Cette dernière espèce, qui a été retrouvée comme ''faux positif '' dans l'étude de Paterson et al. (2000) n'a pas donné d'amplification avec les amorces spécifiques choisies dans notre étude (Pexp_patF_F/Pexp_patF_R). L'analyse BLAST, ainsi que les résultats obtenus dans les études antérieures reflètent désormais que le gène *patN* n'est pas le choix idéal pour l'élaboration d'outils de diagnostic rapides et performants des espèces productrices de patuline.



Gène	Producteurs de patuline	Non-producteurs de patuline
patA	*P.griseofulvum* (81 %)* *A. clavatus* (67 %)	*P.roqueforti* (80 %)
patB	*P.griseofulvum* (82 %) *A. clavatus* (69 %)	*P.digitatum* (80 %) *P. chrysogenum* (60 %) *A. oryzae* (60 %) *A. flavus* (60 %)
patC	*P.griseofulvum* (86 %) *A. clavatus* (76 %) *T. stipitatus* (76 %)	*P. camemberti* (88 %) *P. roqueforti* (85 %) *P. digitatum* (84 %) *P. chrysogenum* (77 %) *B. spectabilis* (69 %)
patD	*A. clavatus* (70 %)	*P.camemberti* (8 4%) *P. roqueforti* (79 %) *P. digitatum* (78 %) *P. marneffei* (70 %) *A. paxilli* (69 %)
patE	*A. clavatus* (73 %)	*A. niger* (63 %) *P. marneffei* (57 %)
patF	*A. clavatus* (74 %)	*P. digitatum* (85 %) *P. chrysogenum* (72 %)
patG	*A. clavatus* (72 %)	*P. camemberti* (87 %) *P. roqueforti* (83 %) *P. chrysogenum* (83 %) *P. digitatum* (84 %) *A. oryzae* (61 %)
patH	*A. clavatus* (75 %)	*P. roqueforti* (87 %) *P. camemberti* (86 %) *P. chrysogenum* (86 %) *P. digitatum* (82 %)

Gène	Producteurs de patuline	Non-producteurs de patuline
patI	*A. clavatus* (77 %) *P. griseofulvum* (81 %)	*P. camemberti* (83 %) *P. roqueforti* (85 %) *P. digitatum* (83 %) *P. chrysogenum* (83 %)
patJ	*A. clavatus* (80 %)	*P. roqueforti* (86 %) *P. chrysogenum* (84 %) *P. digitatum* (83 %) *A. terreus* (65 %) *A. flavus* (64 %)
patK	*P. griseofulvum* (81 %) *A. clavatus* (77 %) *B. nivea* (69 %)	*P. roqueforti* (88 %) *P. chrysogenum* (87 %) *A. terreus* (70 %)
patL	*A. clavatus* (71 %) *P. griseofulvum* (84 %)	*P. camemberti* (90 %) *P. digitatum* (89 %) *P. roqueforti* (88 %) *P. chrysogenum* (84 %)
patM	*A. clavatus* (62 %) *P. griseofulvum* (85 %)	*P. camemberti* (87 %) *P. roqueforti* (84 %) *P. chrysogenum* (72 %)
patN	*P. gladioli* (88 %) *P. sclerotigenum* (88 %) *P. carneum* (87 %) *P.concentricum* (87 %) *P. clavigerum* (87 %) *P. dipodomyicola* (86 %) *P. paneum* (86 %) *P. coprobium* (86 %) *P. griseofulvum* (85 %) *P. glandicola* (85 %) *B. nivea* (78 %) *A. clavatus* (75 %)	*P. camemberti* (88 %) *P. roqueforti* (88 %) *P. marneffei* (76 %) *T. stipitatus* (73 %)
patO	*P. griseofulvum* (80 %) *A. clavatus* (67 %)	*P. roqueforti* (81 %) *P. digitatum* (80 %)

Figure 3 : Résultats de l'analyse BLAST des séquences des gènes du cluster de la patuline chez *P. expansum.*
* Entre parenthèses sont représentés les pourcentages d'identité entre les séquences nucléotidiques

Les méthodes conventionnellement utilisées pour la discrimination des champignons filamenteux qui contaminent les produits alimentaires reposent sur l'étude morphologique macroscopique et microscopique des colonies. La réussite de l'identification morphologique requiert une maturation suffisante de la culture pour que les colonies montrent un aspect typique et les fructifications apparaissent. Ce travail nécessite également une expertise en mycologie forgée par de longues années de pratique et pourra être en conséquence sujette à des jugements subjectifs (Wu et al. 2003). De ce fait, l'identification des champignons filamenteux fondée uniquement sur l'étude morphologique reste une étape délicate, longue et laborieuse. L'analyse du profil métabolique est une autre méthode utilisée auparavant dans l'identification des champignons toxinogènes. Cette approche a été utilisée avec succès pour la différenciation des espèces de *Penicillium* (Frisvad and Filtenborg 1983). Cependant, son application est également compliquée et coûteuse, sachant qu'elle nécessite une extraction, une purification et une concentration des métabolites secondaires avant leur détection. Une autre méthode de diagnostic basée sur la détection des métabolites volatiles dérivés des métabolismes primaire et secondaire des champignons a été rapportée dans la littérature. Larsen et Frisvad (1995) avaient analysé les composés volatils produits par 132 isolats appartenant à 25 espèces de *Penicillium*. Les résultats de cette analyse étaient en accord avec ceux de l'identification classique. Le 2-méthyl-1-propanol, le 3-méthyl-butanol, le 1-octène-3-ol, l'acétate d'éthyle, le 3-méthylfuranne, le 2-méthylisobornéol et la géosmine ont été répertoriés parmi les composés volatils les plus communs, qui présentent un indice de détérioration fongique dans les aliments (Schnürer et al. 1999). Cependant, il convient de dire que différentes espèces de champignons produisent des métabolites volatils similaires. Ceci rend l'analyse des composés volatils comme marqueur spécifique des champignons moins appropriée en termes de diagnostic.

Ces approches longues et fastidieuses, souvent imprécises, sont incompatibles avec les exigences actuelles des industries agro-alimentaires. Actuellement, les méthodes de biologie moléculaire ont de plus en plus d'applications dans le diagnostic des contaminations alimentaires d'origine fongique et le développement d'approches préventives. En s'affranchissant de la mise en culture, ces méthodes moléculaires réduisent énormément le temps des analyses et assurent une grande spécificité. Elles permettent de caractériser les micro-organismes d'un échantillon, qu'ils soient cultivables ou non, dans leur environnement naturel. Plusieurs protocoles de PCR conventionnels et en temps réel ont été mis au point pour l'identification des pathogènes fongiques dans diverses matrices alimentaires (Shapira et al. 1996; Konietzny and Greiner 2003;

Manonmani et al. 2005; Selma et al. 2008; Noorbakhsh et al. 2009; Luque et al. 2011; Spadaro et al. 2011).

Ces outils de diagnostic moléculaires sont aujourd'hui utilisés dans le secteur agroalimentaire ainsi que dans d'autres secteurs industriels. A titre d'exemple, la méthode de PCR décrite dans le papier de De Souza Liberal et al. (2005) trouvera son application dans les industries de fermentation du bioéthanol pour l'identification précoce des levures indésirables (non- *Saccharomyces cerevisiaie*) qui peuvent engendrer des pertes économiques dans le processus. Le développement de cet outil moléculaire a réduit le temps de détection de 5 jours à 8 heures avec une quantification possible des contaminants. Un autre protocole de PCR multiplexe a été développé pour la détection sélective de certaines espèces d'*Aspergillus* en milieu aérien, dans différentes zones d'une boulangerie roumaine (Cornea et al. 2011).

Conclusion générale et Perspectives

Les pommes figurent parmi les fruits le plus consommés et exportés à l'échelle mondiale. En outre, ce fruit entre dans la composition de plusieurs denrées destinées à l'alimentation des nourrissons et des enfants de bas âges. Depuis plusieurs années, les cultivateurs de pommes sont confrontés à un ravageur, *Penicillium expansum*, qui provoque de graves dommages aux pommes et engendre des pertes de récoltes drastiques. Outre les dégâts esthétiques caractérisés par des tâches de pourriture brunes qui se développent sur la surface du fruit envahi, les pommes contaminées par ce champignon deviennent une source de mycotoxines dont la patuline est l'exemple le plus sérieux. Cette molécule initialement découverte lors de campagnes de criblage de nouveaux métabolites fongiques actifs est aujourd'hui à l'origine d'une toxicité élevée largement documentée. C'est pour ces raisons que la maitrise du risque patuline est devenue une nécessité absolue.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons abordé 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 concrètes pour lutter contre ce contaminant. Les résultats obtenus à l'issue de ce travail de thèse soulèvent de nouvelles

questions et suggèrent ainsi certaines orientations futures de la recherche tant sur le plan fondamental que pratique :

Sur le plan fondamental :

(1) D'autres facteurs physico-chimiques notamment la composition atmosphérique et la nature du substrat (richesse en hydrates de carbone (sucre), en composés phénoliques…) pourront avoir une influence significative sur la croissance de *P. expansum* et sa capacité à produire la patuline. Ces facteurs méritent d'être modélisés à l'instar de ce qui a été réalisé pour la température, l'a_W et le pH.

(2) Dans l'intention de mieux appréhender l'évolution du cluster de la patuline au sein des espèces fongiques, il serait judicieux de dévoiler les séquences ainsi que les positions et les orientations des gènes du cluster chez d'autres espèces productrices tel que *Penicillium griseofulvum* et *Byssochlamys nivea.*

(3) Sur les quinze gènes du cluster de la patuline, le rôle de huit gènes demeure inconnu à ce jour. Il sera particulièrement intéressant de caractériser les fonctions de ces gènes en vue d'élucider l'ensemble de cette voie de biosynthèse.

(4) Afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation qui ajustent la synthèse de la patuline chez *P. expansum,* il serait intéressant de générer des mutants déficients pour les différents facteurs de transcription ayant des sites de fixation sur les régions promotrices et codantes des gènes du cluster.

Sur le plan pratique :

(1) L'outil de diagnostic rapide basé sur la PCR en temps réel qui a été développé au cours de cette étude est très pratique pour un usage en laboratoire. Il serait judicieux de concevoir un kit de diagnostic, basé sur le même principe mais qui sera plus facile et adapté à l'usage indutriel.

(2) Se servir de l'outil de diagnostic développé en vue de réaliser une enquête, la plus exhaustive possible, sur la fréquence et les niveaux de présence de la patuline dans les pommes libanaises et les produits à base de pommes commercialisés sur le marché libanais.

(3) Les pommes qui ont servi dans les différents travaux de cette thèse, sont des pommes en fin de période de conservation et ayant forcément subi différents traitements avant la cueillette. Il serait intéressant d'évaluer l'impact de la conservation en chambres froides et des traitements que subissent les pommes sur la résistance de ces fruits à l'invasion du champignon. Il sera question de comparer pour une même variété, la croissance de *P. expansum* et les teneurs de patuline produites sur des pommes conservées pendant des mois en chambres froides à d'autres fraîchement cueillies. De même, il serait judicieux d'évaluer ces différences entre des pommes issues de l'agriculture conventionnelle et d'autres issues de l'agriculture biologique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

Abrunhosa, L., R. R. M. Paterson and A. Venâncio (2010). "Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination." Toxins **2**(5): 1078-1099.

Acar, J., V. Gökmen and E. E. Taydas (1998). "The effects of processing technology on the patulin content of juice during commercial apple juice concentrate production." Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A **207**(4): 328-331.

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**: 151-159.

AFSSA (2009). Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale: rapport final, Agence française de sécurité sanitaire des aliments.

Al-Hazmi, N. A. (2010). "Determination of patulin and ochratoxin A using HPLC in apple juice samples in Saudi Arabia." Saudi Journal of Biological Sciences **17**(4): 353-359.

Alassane-Kpembi, I., M. Kolf-Clauw, T. Gauthier, R. Abrami, F. A. Abiola, I. P. Oswald and O. Puel (2013). "New insights into mycotoxin mixtures: The toxicity of low doses of Type B trichothecenes on intestinal epithelial cells is synergistic." Toxicology and Applied Pharmacology **272**(1): 191-198.

Alberts, J. F., Y. Engelbrecht, P. S. Steyn, W. H. Holzapfel and W. H. Van Zyl (2006). "Biological degradation of aflatoxin B_1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures." International Journal of Food Microbiology **109**(1): 121-126.

Alexander, N., S. McCormick and T. Hohn (1999). "TRI12, a trichothecene efflux pump from *Fusarium sporotrichioides*: gene isolation and expression in yeast." Molecular and General Genetics MGG **261**(6): 977-984.

Alwakeel, S. S. (2013). "Molecular identification of isolated fungi from stored apples in Riyadh, Saudi Arabia." Saudi Journal of Biological Sciences **20**(4): 311-317.

Andersen, B., J. Smedsgaard and J. C. Frisvad (2004). "*Penicillium expansum*: consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(8): 2421-2428.

Anderson, J. A. and C. H. Chung (1990). "Conversion of versiconal acetate to versiconal and versicolorin C in extracts from *Aspergillus parasiticus*." Mycopathologia **110**(1): 31-35.

Andrade, A., J. Van Nistelrooy, R. Peery, P. Skatrud and M. De Waard (2000). "The role of ABC transporters from *Aspergillus nidulans* in protection against cytotoxic agents and in antibiotic production." Molecular and General Genetics MGG **263**(6): 966-977.

Arranz, I., M. Derbyshire, K. Kroeger, C. Mischke, J. Stroka and E. Anklam (2005). "Liquid chromatographic method for quantitation of patulin at 10 ng/mL in apple-based products intended for infants: Interlaboratory study." Journal of AOAC International **88**(2): 518-525.

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**(5): 1738-1747.

Ashoor, S. H. and F. S. Chu (1973). "Inhibition of alcohol and lactic dehydrogenases by patulin and penicillic acid *in vitro*." Food and Cosmetics Toxicology **11**(4): 617-624.

Assatarakul, K., J. J. Churey, D. C. Manns and R. W. Worobo (2012). "Patulin reduction in apple juice from concentrate by UV radiation and comparison of kinetic degradation models between apple juice and apple cider." Journal of Food Protection **75**(4): 717-724.

Aydogdu, H. and Y. Gucer (2009). "Microfungi and mycotoxins of grapes and grape products." Trakia Journal of Sciences **7**(Supplement 2): 211-214.

Ayed-Boussema, I., H. Abassi, C. Bouaziz, W. B. Hlima, Y. Ayed and H. Bacha (2011). "Antioxidative and antigenotoxic effect of vitamin E against patulin cytotoxicity and genotoxicity in HepG2 cells." Environmental Toxicology **28**(6): 299-306.

-B-

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

Baert, K., A. Valero, B. De Meulenaer, S. Samapundo, M. M. Ahmed, L. Bo, J. Debevere and F. Devlieghere (2007b). "Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag phase of *Penicillium expansum* in apples." International Journal of Food Microbiology **118**(2): 139-150.

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.

Bandoh, S., M. Takeuchi, K. Ohsawa, K. Higashihara, Y. Kawamoto and T. Goto (2009). "Patulin distribution in decayed apple and its reduction." International Biodeterioration & Biodegradation **63**(4): 379-382.

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.

Barad, S., S. B. Horowitz, O. Moscovitz, A. Lichter, A. Sherman and D. Prusky (2012). "A *Penicillium expansum* glucose oxidase-encoding gene, GOX2, is essential for gluconic acid production and acidification during colonization of deciduous fruit." Molecular Plant-Microbe Interactions **25**(6): 779-788.

Baranyi, J. and T. A. Roberts (1994). "A dynamic approach to predicting bacterial growth in food." International Journal of Food Microbiology **23**(3): 277-294.

Barreira, M. J., P. C. Alvito and C. M. M. Almeida (2010). "Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal." Food Chemistry **121**(3): 653-658.

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.

Beck, J., S. Ripka, A. Siegner, E. Schiltz and E. Schweizer (1990). "The multifunctional 6-methylsalicylic acid synthase gene of *Penicillium patulum*." European Journal of Biochemistry **192**(2): 487-498.

Bencheqroun, S. K. (2009). Etude des mécanismes d'action impliqués dans le biocontrôle d'une souche d'*Aureobasidium pullulans* (De Bary) Arnaud vis-a-vis de *Penicillium expansum* link sur pommes en post-recolte. Gembloux Agro-Bio Tech Université de Liège.

Bennett, J. W. and M. Klich (2003). "Mycotoxins." Clinical Microbiology Reviews **16**(3): 497-516.

Bentley, R. and J. W. Bennett (1999). "Constructing polyketides: from Collie to combinatorial biosynthesis." Annual Reviews in Microbiology **53**(1): 411-446.

Berger, K. J. and D. A. Guss (2005). "Mycotoxins revisited: part I." The Journal of emergency medicine **28**(1): 53-62.

Bertuzzi, M., M. Schrettl, L. Alcazar-Fuoli, T. C. Cairns, A. Muñoz, L. A. Walker, S. Herbst, M. Safari, A. M. Cheverton, D. Chen, H. Liu, S. Saijo, N. D. Fedorova, D. Armstrong-James, C. A. Munro, N. D. Read, S. G. Filler, E. A. Espeso, W. C. Nierman, H. Haas and E. M. Bignell (2014). "The pH-Responsive PacC Transcription Factor of *Aspergillus fumigatus* Governs Epithelial Entry and Tissue Invasion during Pulmonary Aspergillosis." PLoS Pathogens **10**(10): e1004413.

Bhatnagar, D., K. C. Ehrlich and T. E. Cleveland (2003). "Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis." Applied Microbiology and Biotechnology **61**(2): 83-93.

Bignell, E., S. Negrete-Urtasun, A. M. Calcagno, K. Haynes, H. N. Arst and T. Rogers (2005). "The *Aspergillus* pH-responsive transcription factor PacC regulates virulence." Molecular Microbiology **55**(4): 1072-1084.

Binder, E. M., L. M. Tan, L. J. Chin, J. Handl and J. Richard (2007). "Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients." Animal Feed Science and Technology **137**(3): 265-282.

Biomin (2014). "Surveying the threat: Mycotoxin distribution - Where and which commidity?" Science & Solutions(05).

Boddu, J., S. Cho and G. J. Muehlbauer (2007). "Transcriptome analysis of trichothecene-induced gene expression in barley." Molecular Plant-Microbe Interactions **20**(11): 1364-1375.

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., D. Chung, S. A. Balajee, K. A. Marr, D. Andes, K. F. Nielsen, J. C. Frisvad, K. A. Kirby and N. P. Keller (2006). "GliZ, a transcriptional regulator of gliotoxin biosynthesis, contributes to *Aspergillus fumigatus* virulence." Infection and Immunity **74**(12): 6761-6768.

Bokhari, F., Y. Gherbawy and A. Najjar (2009). "Detection of the patulin-producing potential of some *Paecilomyces variotii* strains isolated from the air samples of Jeddah City, Saudi Arabia, using the RAPD-PCR technique." Aerobiologia **25**(1): 49-54.

Bokhari, F. M. and M. M. Aly (2009). "Evolution of traditional means of roasting and mycotoxins contaminated coffee beans in Saudi Arabia." Adv Biol Res **3**: 71-78.

Bollina, V. and A. C. Kushalappa (2011). "*In vitro* inhibition of trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum* by resistance-related endogenous metabolites identified in barley." Mycology **2**(4): 291-296.

Boonzaaijer, G., I. Bobeldijk and W. A. Van Osenbruggen (2005). "Analysis of patulin in Dutch food, an evaluation of a SPE based method." Food Control **16**(7): 587-591.

Bourdiol, D., L. Escoula and R. Salvayre (1990). "Effect of patulin on microbicidal activity of mouse peritoneal macrophages." Food and Chemical Toxicology **28**(1): 29-33.

Boutigny, A.-L., C. Barreau, V. Atanasova-Penichon, M.-N. Verdal-Bonnin, L. Pinson-Gadais and F. Richard-Forget (2009). "Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and *Tri* gene expression in *Fusarium* liquid cultures." Mycological Research **113**(6): 746-753.

Boysen, M., P. Skouboe, J. Frisvad and L. Rossen (1996). "Reclassification of the *Penicillium roqueforti* group into three species on the basis of molecular genetic and biochemical profiles." Microbiology **142**(3): 541-549.

Brackett, R. E. and E. H. Marth (1979). "Stability of patulin at pH 6.0-8.0 and 25 C." Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung **169**(2): 92-94.

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

Bridge, P. D. and L. Hudson (1989). "Use of continuous flow microfluorimetry for DNA determinations in *Penicillium*." Botanical Journal of the Linnean Society **99**(1): 11-18.

Brodhagen, M. and N. P. Keller (2006). "Signalling pathways connecting mycotoxin production and sporulation." Molecular Plant Pathology **7**(4): 285-301.

Brown, D. W., R. A. E. Butchko, M. Busman and R. H. Proctor (2007). "The *Fusarium verticillioides* FUM gene cluster encodes a Zn (II) 2Cys6 protein that affects FUM gene expression and fumonisin production." Eukaryotic Cell **6**(7): 1210-1218.

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*." Proceedings of the National Academy of Sciences **93**(4): 1418-1422.

Brown, S. and K. Maloney (2005). "Recent Advances in Apple Breeding, Genetics and New Cultivars." The Future of Applied Research and Extension at Geneva: 3.

Brown, S. H., O. Yarden, N. Gollop, S. Chen, A. Zveibil, E. Belausov and S. Freeman (2008). "Differential protein expression in *Colletotrichum acutatum*: changes associated with reactive oxygen species and nitrogen starvation implicated in pathogenicity on strawberry." Molecular Plant Pathology **9**(2): 171-190.

Bryden, W. L. (2007). "Mycotoxins in the food chain: human health implications." Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition **16**(1): 95-101.

Bu'Lock, J. D. (1980). Mycotoxins as secondary metabolites, Academic Press, Inc., New York.

Bullerman, L. B. and A. Bianchini (2007). "Stability of mycotoxins during food processing." International Journal of Food Microbiology **119**(1): 140-146.

Burghardt, R. C., R. Barhoumi, E. H. Lewis, R. Bailey, K. A. Pyle, B. A. Clement and T. D. Phillips (1992). "Patulin-induced cellular toxicity: a vital fluorescence study." Toxicology and Applied Pharmacology **112**(2): 235-244.

Burroughs, L. F. (1977). "Stability of patulin to sulfur dioxide and to yeast fermentation." Journal-Association of Official Analytical Chemists **60**(1): 100-103.

-C-

Cairns-Fuller, V., D. Aldred and N. Magan (2005). "Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain." Journal of Applied Microbiology **99**(5): 1215-1221.

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.

Campbell, B., J. H. Kim, J. Yu, R. Molyneux, N. Mahoney, J. Palumbo, K. Chan, D. Bhatnagar, T. Cleveland and W. Nierman (2008). Natural products as tools for chemogenomic analysis of mycotoxin biosynthesis and fungal stress-response systems. American Chemical Society Symposium Series, American Chemical Society Symposium Series. In: Siantar, DP Trucksess,

M., Scott, PM, Herman, EM editors, Food Contaminants: Mycotoxins and Food Allergens. Oxford University Press.

Cano, P. M., E. L. Jamin, S. Tadrist, P. Bourdaud'hui, M. Péan, L. Debrauwer, I. P. Oswald, M. Delaforge and O. Puel (2013). "New untargeted metabolic profiling combining mass spectrometry and isotopic labeling: Application on *Aspergillus fumigatus* grown on wheat." Analytical Chemistry **85**(17): 8412-8420.

Caracuel, Z., M. I. G. Roncero, E. A. Espeso, C. I. González-Verdejo, F. I. García-Maceira and A. Di Pietro (2003). "The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*." Molecular Microbiology **48**(3): 765-779.

Carbone, K., B. Giannini, V. Picchi, R. Lo Scalzo and F. Cecchini (2011). "Phenolic composition and free radical scavenging activity of different apple varieties in relation to the cultivar, tissue type and storage." Food Chemistry **127**(2): 493-500.

Cardoso, P. G., M. V. d. Queiroz, O. L. Pereira and E. F. d. Araújo (2007). "Morphological and molecular differentiation of the pectinase producing fungi *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum*." Brazilian Journal of Microbiology **38**(1): 71-77.

Cary, J. W. and K. C. Ehrlich (2006). "Aflatoxigenicity in Aspergillus: molecular genetics, phylogenetic relationships and evolutionary implications." Mycopathologia **162**(3): 167-177.

Cary, J. W., K. C. Ehrlich, S. B. Beltz, P. Harris-Coward and M. A. Klich (2009). "Characterization of the *Aspergillus ochraceoroseus* aflatoxin/sterigmatocystin biosynthetic gene cluster." Mycologia **101**(3): 352-62.

Cast, G. (2003). Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems, Council for Agricultural Science and Technoloy Task Force Report

Castoria, R., L. Mannina, R. Durán-Patrón, F. Maffei, A. P. Sobolev, D. V. De Felice, C. Pinedo-Rivilla, A. Ritieni, R. Ferracane and S. A. I. Wright (2011). "Conversion of the mycotoxin patulin to the less toxic desoxypatulinic acid by the biocontrol yeast *Rhodosporidium kratochvilovae* strain LS11." Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**(21): 11571-11578.

Cepeda-García, C., R. Domínguez-Santos, R. O. García-Rico, C. García-Estrada, A. Cajiao, F. Fierro and J. F. Martín (2014). "Direct involvement of the CreA transcription factor in penicillin biosynthesis and expression of the pcbAB gene in *Penicillium chrysogenum*." Applied Microbiology and Biotechnology: 1-12.

Chan, Y. A., A. M. Podevels, B. M. Kevany and M. G. Thomas (2009). "Biosynthesis of polyketide synthase extender units." Natural Product Reports **26**(1): 90-114.

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 **3**(1): 82-104.

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.

Char, C., S. Guerrero, L. González and S. Alzamora (2005). "Growth response of *Eurotium chevalieri, Aspergillus fumigatus* and *Penicillium brevicompactum* in Argentine milk jam." Food Science and Technology International **11**(4): 297-305.

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

Chen, L., B. H. Ingham and S. C. Ingham (2004). "Survival of *Penicillium expansum* and patulin production on stored apples after wash treatments." Journal of Food Science **69**(8): C669-C675.

Christensen, H. B., M. E. Poulsen, P. H. Rasmussen and D. Christen (2009). "Development of an LC-MS/MS method for the determination of pesticides and patulin in apples." Food Additives and Contaminants **26**(7): 1013-1023.

Chung, H.-J., H.-Y. Cho and K.-H. Kong (2009). "Immobilization of *Hansenula polymorpha* Alcohol Oxidase for Alcohol Biosensor Applications." Bulletin of the Korean Chemical Society **30**(1): 57.

Ciegler, A. (1977). "Patulin." Mycotoxins in human and animal health Pathotox Publishers, Inc.: 609-624.

Ciegler, A., A. C. Beckwith and L. K. Jackson (1976). "Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine." Applied and Environmental Microbiology **31**(5): 664-667.

Clarke, M. (2006). "The 1944 patulin trial of the British Medical Research Council." Journal of the Royal Society of Medicine **99**(9): 478-480.

Coelho, A. R., M. G. Celli, E. Y. Sataque Ono, F. L. Hoffmann, F. C. Pagnocca, S. Garcia, M. Sabino, K. I. Harada, G. Wosiacki and E. Y. Hirooka (2008). "Patulin biodegradation using *Pichia ohmeri* and *Saccharomyces cerevisiae*." World Mycotoxin Journal **1**(3): 325-331.

Çolakoğlu, G. (2002). "Extractions of *Rhizopus nigricans* Ehrenberg and *Penicillium expansum* (Link) Thom from allergenic microfungi and application of toxicity tests." Turk Electronic J Biotechnol. : 1-5.

Coleman, J. E. (1992). "Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins." Annual Review of Biochemistry **61**(1): 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." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(27): 10352-10357.

Coméra, C., K. André, 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 and Infection **9**(1): 47-54.

Cornea, C. P., M. Ciuca, C. Voaides, V. Gagiu and A. Pop (2011). "Incidence of fungal contamination in a Romanian bakery: a molecular approach." Romanian Biotechnological Letters **16**(1): 5863-5871.

Cornille, A., T. Giraud, M. J. Smulders, I. Roldán-Ruiz and P. Gladieux (2014). "The domestication and evolutionary ecology of apples." Trends in Genetics **30**(2): 57-65.

Cornille, A., P. Gladieux, M. J. Smulders, I. Roldán-Ruiz, F. Laurens, B. Le Cam, A. Nersesyan, J. Clavel, M. Olonova, L. Feugey, I. Gabrielyan, X.-G. Zhang, M. I. Tenaillon and T. Giraud (2012). "New insight into the history of domesticated apple: secondary contribution of the European wild apple to the genome of cultivated varieties." PLoS Genetics **8**(5): e1002703.

Cossentine, J. E., P. L. Sholberg, L. B. J. Jensen, K. E. Bedford and T. C. Shephard (2004). "Fumigation of empty fruit bins with carbon dioxide to control diapausing codling moth larvae and *Penicillium expansum* Link. ex Thom spores." HortScience **39**(2): 429-432.

Cox, R. J. (2007). "Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nano-machines begin to reveal their secrets." Organic & Biomolecular Chemistry **5**(13): 2010-2026.

Cox, R. J. and T. J. Simpson (2010). "1.09 Fungal Type I Polyketides." Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology **1**: 347-383.

Coyle, C. M., S. C. Kenaley, W. R. Rittenour and D. G. Panaccione (2007). "Association of ergot alkaloids with conidiation in *Aspergillus fumigatus*." Mycologia **99**(6): 804-811.

Crawford, J. M., P. M. Thomas, J. R. Scheerer, A. L. Vagstad, N. L. Kelleher and C. A. Townsend (2008). "Deconstruction of iterative multidomain polyketide synthase function." Science **320**(5873): 243-246.

Crawford, J. M. and C. A. Townsend (2010). "New insights into the formation of fungal aromatic polyketides." Nature Reviews Microbiology **8**(12): 879-889.

-D-

D'Mello, J. P. F. and A. M. C. Macdonald (1997). "Mycotoxins." Animal Feed Science and Technology **69**(1- 3): 155-166.

Dailey, R. E., A. M. Blaschka and E. A. Brouwer (1977). "Absorption, distribution, and excretion of [14C] patulin by rats." Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues **3**(3): 479-489.

Damoglou, A. P. and D. S. Campbell (1986). "The effect of pH on the production of patulin in apple juice." Letters in Applied Microbiology **2**(1): 9-11.

Dantigny, P., A. Guilmart and M. Bensoussan (2005). "Basis of predictive mycology." International Journal of Food Microbiology **100**(1): 187-196.

Dao, H. P. (2005). "Caractérisation de certains gènes polycétones synthases chez *Aspergillus Ochraceus* NRRL 3174 producteur d'ochratoxine A et d'acide pénicillique". Thèse de Doctorat, Institut National de Toulouse, France.

de las Mercedes Dana, M., J. A. Pintor-Toro and B. Cubero (2006). "Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents." Plant Physiology **142**(2): 722-730.

de Melo, F. T., I. M. de Oliveira, S. Greggio, J. C. Dacosta, T. N. Guecheva, J. Saffi, J. A. P. Henriques and R. M. Rosa (2012). "DNA damage in organs of mice treated acutely with patulin, a known mycotoxin." Food and Chemical Toxicology **50**(10): 3548-3555.

De Souza Liberal, A., E. Da Silva Filho, J. De Morais, D. Simoes and M. De Morais (2005). "Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR." Letters in Applied Microbiology **40**(1): 19-23.

De Waard, M. A. (1997). "Significance of ABC transporters in fungicide sensitivity and resistance." Pesticide Science **51**(3): 271-275.

Delgado-Virgen, F. and D. Guzman-de-Peña (2009). "Mechanism of Sterigmatocystin Biosynthesis Regulation by pH in *Aspergillus nidulans*." Brazilian Journal of Microbiology **40**(4): 933-942.

Demirel, R., N. Y. Sariozlu and S. İlhan (2013). "Polymerase chain reaction (PCR) identification of terverticillate *Penicillium* species isolated from agricultural soils in eskişehir province." Brazilian Archives of Biology and Technology **56**(6): 980-984.

Desjardins, A. E., G.-h. Bai, R. D. Plattner and R. H. Proctor (2000). "Analysis of aberrant virulence of *Gibberella zeae* following transformation-mediated complementation of a trichothecene-deficient (Tri5) mutant." Microbiology **146**(8): 2059-2068.

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., K. R. ShanmugaSundaram and E. R. B. Shanmugasundaram (1983). "Changes in carbohydrate metabolism during patulin toxicos is studied in chicks." Journal of the Indian Institute of Science **64**(6): 65.

Devi, P., C. G. Naik and C. Rodrigues (2006). "Biotransformation of citrinin to decarboxycitrinin using an organic solvent-tolerant marine bacterium, *Moraxella sp.* MB1." Marine Biotechnology **8**(2): 129-138.

Dewick, P. M. (2002). Medicinal natural products: A biosynthetic approach, John Wiley & Sons.

Dickens, F. and H. E. H. Jones (1962). "Carcinogenic Activity of a Series of Reactive Lactones and Related Substances." Journal of Occupational and Environmental Medicine **4**(1): 49.

Dijkman, W. P. and M. W. Fraaije (2014). "Discovery and characterization of a 5-hydroxymethylfurfural oxidase from *Methylovorus sp.* strain MP688." Applied and Environmental Microbiology **80**(3): 1082-1090.

Dimroth, P., H. Walter and F. Lynen (1970). "Biosynthese von 6-Methylsalicylsäure." European Journal of Biochemistry **13**(1): 98-110.

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): 179-189.

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): 224-228.

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**(9): 1111-1118.

Dombrink-Kurtzman, M. A. and A. E. McGovern (2007). "Species-specific identification of *Penicillium* linked to patulin contamination." Journal of Food Protection **70**(11): 2646-2650.

Dong, Q., D. C. Manns, G. Feng, T. Yue, J. J. Churey and R. W. Worobo (2010). "Reduction of patulin in apple cider by UV radiation." Journal of Food Protection **73**(1): 69-74.

Donmez-Altuntas, H., P. Gokalp-Yildiz, N. Bitgen and Z. Hamurcu (2013). "Evaluation of genotoxicity, cytotoxicity and cytostasis in human lymphocytes exposed to patulin by using the cytokinesis-block micronucleus cytome (CBMN cyt) assay." Mycotoxin Research **29**(2): 63-70.

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.

Drusch, S., S. Kopka and J. Kaeding (2007). "Stability of patulin in a juice-like aqueous model system in the presence of ascorbic acid." Food Chemistry **100**(1): 192-197.

-E-

Ehrlich, K. and P. Cotty (2002). "Variability in nitrogen regulation of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* strains." Applied Microbiology and Biotechnology **60**(1-2): 174-178.

Ehrlich, K. C. (2009). "Predicted roles of the uncharacterized clustered genes in aflatoxin biosynthesis." Toxins **1**(1): 37-58.

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." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression **1444**(3): 412-417.

Ehrlich, K. C., P. Li, L. Scharfenstein and P.-K. Chang (2010). "HypC, the anthrone oxidase involved in aflatoxin biosynthesis." Applied and Environmental microbiology **76**(10): 3374-3377.

Ehrlich, K. C., B. G. Montalbano, D. Bhatnagar and T. E. Cleveland (1998). "Alteration of Different Domains in AFLR Affects Aflatoxin Pathway Metabolism in *Aspergillus parasiticus* Transformants." Fungal Genetics and Biology **23**(3): 279-287.

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): 249-257.

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-Sharkaway, S. H., M. I. Selim, M. S. Afifi and F. T. Halaweish (1991). "Microbial transformation of zearalenone to a zearalenone sulfate." Applied and Environmental Microbiology **57**(2): 549-552.

El-Sharkawy, S. and Y. Abul-Hajj (1987). "Microbial transformation of zearalenone, I. Formation of zearalenone-4-O-β-glucoside." Journal of Natural Products **50**(3): 520-521.

Elhariry, H., A. A. Bahobial and Y. Gherbawy (2011). "Genotypic identification of *Penicillium expansum* and the role of processing on patulin presence in juice." Food and Chemical Toxicology **49**(4): 941-946.

Ellis, C. M. (1996). "Regulation of polyketide gene expression: the isolation and function of nitrogen regulatory factor NRFA from *Penicillium urticae*". PhD Dissertation, Biological Sciences, University of Calgary.

Escoula, L., M. Thomsen, D. Bourdiol, B. Pipy, S. Peuriere and F. Roubinet (1988). "Patulin immunotoxicology: effect on phagocyte activation and the cellular and humoral immune system of mice and rabbits." International Journal of Immunopharmacology **10**(8): 983-989.

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): 774-779.

Espeso, E. A. and M. A. Peñalva (1992). "Carbon catabolite repression can account for the temporal pattern of expression of a penicillin biosynthetic gene in *Aspergillus nidulans*." Molecular Microbiology **6**(11): 1457-1465.

Espeso, E. A., J. Tilburn, H. N. Arst Jr and M. A. Penalva (1993). "pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene." The EMBO journal **12**(10): 3947.

Etienne, M. and J.-Y. Dourmad (1994). "Effects of zearalenone or glucosinolates in the diet on reproduction in sows: a review." Livestock Production Science **40**(2): 99-113.

Etxebeste, O., E. Herrero-García, M. S. Cortese, A. Garzia, E. Oiartzabal-Arano, V. De los Ríos, U. Ugalde and E. A. Espeso (2012). "GmcA Is a Putative Glucose-Methanol-Choline Oxidoreductase Required for the Induction of Asexual Development in *Aspergillus nidulans*." PloS One **7**(7): e40292.

European, C. (2003). "Commission regulation (EC) No 1425/2003 of 11 August 2003 amending regulation (EC) No 466/2001 as regards patulin." Official Journal of the European Union L **203**: 1-3.

European, C. (2006). "Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs." Official Journal of the European Union L **364**: 5-24.

-F-

Fakruddin, M., R. M. Mazumdar and K. S. B. Mannan (2011). "Predictive microbiology: Modeling microbial responses in food." Ceylon Journal of Science (Biological Sciences) **40**(2): 121-131.

Farhadi, K. and R. Maleki (2011). "Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Followed by HPLC-DAD as an Efficient and Sensitive Technique for the Determination of Patulin from Apple Juice and Concentrate Samples." Journal of the Chinese Chemical Society **58**(3): 340-345.

Fedeshko, R. W. (1992). "Polyketide enzymes and genes in *Penicillium urticae"*. Ph.D Dissertation, University of Calgary, Canada.

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.

Filtenborg, O., J. C. Frisvad and U. Thrane (1996). "Moulds in food spoilage." International Journal of Food Microbiology **33**(1): 85-102.

Flaherty, J. E., A. M. Pirttilä, B. H. Bluhm and C. P. Woloshuk (2003). "PAC1, a pH-regulatory gene from *Fusarium verticillioides*." Applied and Environmental Microbiology **69**(9): 5222-5227.

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): 2653-2659.

Fliege, R. and M. Metzler (1999). "The mycotoxin patulin induces intra- and intermolecular protein crosslinks *in vitro* involving cysteine, lysine, and histidine side chains, and alpha-amino groups." Chemico-Biological Interactions **123**(2): 85-103.

Fliege, R. and M. Metzler (2000a). "Electrophilic properties of patulin. Adduct structures and reaction pathways with 4-bromothiophenol and other model nucleophiles." Chemical Research in Toxicology **13**(5): 363-372.

Fliege, R. and M. Metzler (2000b). "Electrophilic properties of patulin. N-acetylcysteine and glutathione adducts." Chemical Research in Toxicology **13**(5): 373-381.

Forrester, P. I. and G. M. Gaucher (1972a). "Conversion of 6-methylsalicylic acid into patulin by *Penicillium urticae*." Biochemistry **11**(6): 1102-1107.

Forrester, P. I. and G. M. Gaucher (1972b). "*m*-Hydroxybenzyl alcohol dehydrogenase from *Penicillium urticae*." Biochemistry **11**(6): 1108-1114..

Frémy, J. M., M. J. J. Castegnaro, E. Gleizes, M. De Meo and M. Laget (1995). "Procedures for destruction of patulin in laboratory wastes." Food Additives & Contaminants **12**(3): 331-336.

Frisvad, J. C. (1981). "Physiological criteria and mycotoxin production as aids in identification of common asymmetric Penicillia." Applied and Environmental Microbiology **41**(3): 568-579.

Frisvad, J. C. and O. Filtenborg (1983). "Classification of terverticillate penicillia based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites." Applied and Environmental Microbiology **46**(6): 1301-1310.

Frisvad, J. C. and R. A. Samson (2004). "Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate Penicillia and their mycotoxins." Studies in Mycology **49**(1): 1-174.

Frisvad, J. C., J. Smedsgaard, T. O. Larsen and R. A. Samson (2004). "Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*." Studies in Mycology **49**: 201-241.

Fujii, I., A. Watanabe, U. Sankawa and Y. Ebizuka (2001). "Identification of Claisen cyclase domain in fungal polyketide synthase WA, a naphthopyrone synthase of *Aspergillus nidulans*." Chemistry & Biology **8**(2): 189-197.

Fuks-Holmberg, D. (1980). "The influence of patulin on rat fetus and rat and human placenta enzymes." Toxicon **18**(4): 437-442.

Funes, G. J. and S. L. Resnik (2009). "Determination of patulin in solid and semisolid apple and pear products marketed in Argentina." Food Control **20**(3): 277-280.

-G-

Gaillard, S., I. Leguérinel and P. Mafart (1998). "Model for combined effects of temperature, pH and water activity on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores." Journal of Food Science **63**(5): 887-889.

Garcia, D., A. J. Ramos, V. Sanchis and S. Marín (2011). "Modelling the effect of temperature and water activity in the growth boundaries of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus*." Food Microbiology **28**(3): 406-417.

Gardiner, D. M. and B. J. Howlett (2005). "Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of *Aspergillus fumigatus*." FEMS Microbiology letters **248**(2): 241-248.

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): 257-263.

Garza, H. C., B. G. Swanson and A. L. Branen (1977). "Toxicological study of patulin in monkeys." Journal of Food Science **42**(5): 1229-1231.

Gauthier, T., X. Wang, J. S. 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.

Gibson, A. M., N. Bratchell and T. A. Roberts (1988). "Predicting microbial growth: growth responses of *Salmonellae* in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature." International Journal of Food Microbiology **6**(2): 155-178.

Glaser, N. and H. Stopper (2012). "Patulin: Mechanism of genotoxicity." Food and Chemical Toxicology **50**(5): 1796-1801.

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.

Gökmen, V. and J. Acar (1998). "Incidence of patulin in apple juice concentrates produced in Turkey." Journal of Chromatography A **815**(1): 99-102.

Gougouli, M. and K. P. Koutsoumanis (2010). "Modelling growth of *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* at constant and fluctuating temperature conditions." International Journal of Food Microbiology **140**(2): 254-262.

Gregori, R., M. Mari, P. Bertolini, J. Barajas, J. Tian and J. Labavitch (2008). "Reduction of *Colletotrichum acutatum* infection by a polygalacturonase inhibitor protein extracted from apple." Postharvest Biology and Technology **48**(2): 309-313.

Grenier, B., A.-P. F. Bracarense, H. E. Schwartz, C. Trumel, A.-M. Cossalter, G. Schatzmayr, M. Kolf-Clauw, W.-D. Moll and I. P. Oswald (2012). "The low intestinal and hepatic toxicity of hydrolyzed fumonisin B_1 correlates with its inability to alter the metabolism of sphingolipids." Biochemical Pharmacology **83**(10): 1465-1473.

Guo, C.-J., W.-W. Sun, K. S. Bruno and C. C. C. Wang (2014). "Molecular Genetic Characterization of Terreic Acid Pathway in *Aspergillus terreus*." Organic Letters.

Guo, C., T. Yue, S. Hatab and Y. Yuan (2012). "Ability of Inactivated Yeast Powder To Adsorb Patulin from Apple Juice." Journal of Food Protection **75**(3): 585-590.

Gutarowska, B., M. Kosmowska, M. Wiszniewska, C. Palczyński and J. Walusiak-Skorupa (2012). "An investigation of allergenic proteins produced by moulds on building materials." Indoor and Built Environment **21**(2): 253-263.

Guzmán-de-Peña, D., J. Aguirre and J. Ruiz-Herrera (1998). "Correlation between the regulation of sterigmatocystin biosynthesis and asexual and sexual sporulation in *Emericella nidulans*." Antonie Van Leeuwenhoek **73**(2): 199-205.

-H-

Haas, H. and G. A. Marzluf (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." Current Genetics **28**(2): 177-183.

Hacking, A. and W. R. Rosser (1981). "Patulin production by *Paecilomyces* species isolated from silage in the United Kingdom." Journal of the Science of Food and Agriculture **32**(6): 620-623.

Halász, A., R. Lásztity, T. Abonyi and Á. Bata (2009). "Decontamination of mycotoxin-containing food and feed by biodegradation." Food Reviews International **25**(4): 284-298.

Hana, M. G. (2009). "High performance liquid chromatographic determination of patulin in apple juice: Investigation of its contamination levels in Saudi Arabia." Scientific Research and Essays **4**(2): 069-072.

Harris, K. L., G. Bobe and L. D. Bourquin (2009). "Patulin surveillance in apple cider and juice marketed in Michigan." Journal of Food Protection **72**(6): 1255-1261.

Harris, L. J., A. E. Desjardins, R. D. Plattner, P. Nicholson, G. Butler, J. C. Young, G. Weston, R. H. Proctor and T. M. Hohn (1999). "Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on maize." Plant Disease **83**(10): 954-960.

Harwig, J., P. M. Scott, D. R. Stoltz and B. J. Blanchfield (1979). "Toxins of molds from decaying tomato fruit." Applied and Environmental Microbiology **38**(2): 267-274.

Hasan, H. A. H. (2000). "Patulin and aflatoxin in brown rot lesion of apple fruits and their regulation." World Journal of Microbiology and Biotechnology **16**(7): 607-612.

Hatab, S., T. Yue and O. Mohamad (2012). "Reduction of patulin in aqueous solution by lactic acid bacteria." Journal of Food Science **77**(4): M238-M241.

Hatey, F. and Y. Moulé (1979). "Protein synthesis inhibition in rat liver by the mycotoxin patulin." Toxicology **13**: 223-231.

Hawar, S., W. Vevers, S. Karieb, B. K. Ali, R. Billington and J. Beal (2013). "Biotransformation of patulin to hydroascladiol by *Lactobacillus plantarum*." Food Control **34**(2): 502-508.

Hayes, A. W., T. D. Phillips, W. L. Williams and A. Ciegler (1979). "Acute toxicity of patulin in mice and rats." Toxicology **13**: 91-100.

Hecke, K., K. Herbinger, R. Veberič, M. Trobec, H. Toplak, F. Štampar, H. Keppel and D. Grill (2006). "Sugar-, acid-and phenol contents in apple cultivars from organic and integrated fruit cultivation." European Journal of Clinical Nutrition **60**(9): 1136-1140.

Hertweck, C. (2009). "The biosynthetic logic of polyketide diversity." Angewandte Chemie International Edition **48**(26): 4688-4716.

Heussner, A. H., D. R. Dietrich and E. O'Brien (2006). "*In vitro* investigation of individual and combined cytotoxic effects of ochratoxin A and other selected mycotoxins on renal cells." Toxicology in Vitro **20**(3): 332-341.

Hocking, A. D. and J. I. Pitt (1979). "Water relations of some *Penicillium* species at 25°C." Transactions of the British Mycological Society **73**(1): 141-145.

Hodnick, W. F., E. B. MllosavljeviĆ, J. H. Nelson and R. S. Pardini (1988). "Electrochemistry of flavonoids: relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids." Biochemical Pharmacology **37**(13): 2607-2611.

Holmquist, G. U., H. W. Walker and H. M. Stahr (1983). "Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*." Journal of Food Science **48**(3): 778-782.

Houbraken, J., J. C. Frisvad and R. A. Samson (2010). "sex in *Penicillium* series *Roqueforti*." IMA Fungus: The Global Mycological Journal **1**(2): 171.

Houbraken, J., R. A. Samson and J. C. Frisvad (2006). *Byssochlamys*: significance of heat resistance and mycotoxin production. Advances in Food Mycology, Springer**:** 211-224.

Hsieh, D. P. H., C. C. Wan and J. A. Billington (1989). "A versiconal hemiacetal acetate converting enzyme in aflatoxin biosynthesis." Mycopathologia **107**(2-3): 121-126.

-I-

Ian Scott, A. and L. Beadling (1974). "Biosynthesis of patulin. Dehydrogenase and dioxygenase enzymes of *Penicillium patulum*." Bioorganic Chemistry **3**(3): 281-301.

Ianiri, G., A. Idnurm, S. A. Wright, R. Durán-Patrón, L. Mannina, R. Ferracane, A. Ritieni and R. Castoria (2013). "Searching for Genes Responsible for Patulin Degradation in a Biocontrol Yeast Provides Insight into the Basis for Resistance to This Mycotoxin." Applied and Environmental Microbiology **79**(9): 3101-3115.

Iha, M. H. and M. Sabino (2008). "Incidence of patulin in Brazilian apple-based drinks." Food Control **19**(4): 417-422.

Imeh, U. and S. Khokhar (2002). "Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(22): 6301-6306.

International Agency for Research on Cancer (1985). "Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation." Apresentado em: IARC Working Group on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: some Naturally Occurring and Synthetic Food Components, 1985.

Ionescu, V., M. Catana, L. Catana, M. Negoita, E. Iorga, A. Balea and G. Campeanu (2010). "Evaluation of patulin contamination of apple juice, using high performance liquid chromatography." Chemical Bulletin of ''POLITEHNICA''University of Timisoara **55**: 186-8.

Islam, R., T. Zhou, J. Christopher Young, P. Goodwin and K. Peter Pauls (2012). "Aerobic and anaerobic de-epoxydation of mycotoxin deoxynivalenol by bacteria originating from agricultural soil." World Journal of Microbiology and Biotechnology **28**(1): 7-13.

-J-

Jackson, L. K. and A. Ciegler (1978). "Production and analysis of citrinin in corn." Applied and Environmental Microbiology **36**(3): 408-411.

Jackson, L. S., T. Beacham-Bowden, S. E. Keller, C. Adhikari, K. T. Taylor, S. J. Chirtel and R. I. Merker (2003). "Apple quality, storage, and washing treatments affect patulin levels in apple cider." Journal of Food Protection **66**(4): 618-624.

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.

Jouany, J. P., A. Yiannikouris, G. Bertin, T. G. Papachristou, Z. M. Parissi, H. Ben Salem and P. Morand-Fehr (2009). Risk assessment of mycotoxins in ruminants and ruminant products. Nutritional and foraging ecology of sheep and goats. Proceedings of the 12th Seminar of the Sub-Network on Nutrition of the FAO-CIHEAM Cooperative Research and Development Network on Sheep and Goats, Thessaloniki, Greece, 11-13 October 2007., Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes.

Judet-Correia, D., S. Bollaert, A. Duquenne, C. Charpentier, M. Bensoussan and P. Dantigny (2010). "Validation of a predictive model for the growth of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* on grape berries." International Journal of Food Microbiology **142**(1-2): 106-113.

Juneja, V. K., M. Valenzuela Melendres, L. Huang, V. Gumudavelli, J. Subbiah and H. Thippareddi (2007). "Modeling the effect of temperature on growth of *Salmonella* in chicken." Food Microbiology **24**(4): 328-335.

-K-

Kadakal, C. and S. Nas (2002). "Effect of activated charcoal on patulin, fumaric acid and some other properties of apple juice." Food/Nahrung **46**(1): 31-33.

Kanora, A. and D. Maes (2009). "The role of mycotoxins in pig reproduction: a review." Veterinarni Medicina **54**(12): 565-576.

Karaca, H. and S. Nas (2006). "Aflatoxins, patulin and ergosterol contents of dried figs in Turkey." Food Additives and Contaminants **23**(05): 502-508.

Karolewiez, A. and R. Geisen (2005). "Cloning a part of the ochratoxin A biosynthetic gene cluster of *Penicillium nordicum* and characterization of the ochratoxin polyketide synthase gene." Systematic and Applied Microbiology **28**(7): 588-595.

Katerere, D. R., S. Stockenström and G. S. Shephard (2008). "HPLC-DAD method for the determination of patulin in dried apple rings." Food Control **19**(4): 389-392.

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.

Kawauchiya, T., R. Takumi, Y. Kudo, A. Takamori, T. Sasagawa, K. Takahashi and H. Kikuchi (2011). "Correlation between the destruction of tight junction by patulin treatment and increase of phosphorylation of ZO-1 in Caco-2 human colon cancer cells." Toxicology Letters **205**(2): 196-202.

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

Keller, N. P., C. Nesbitt, B. Sarr, T. D. Phillips and G. B. Burow (1997). "pH regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus spp.*" Phytopathology **87**(6): 643-648.

Keller, N. P., G. Turner and J. W. Bennett (2005). "Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics." Nature Reviews Microbiology **3**(12): 937-947.

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 Biology **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 and Biology **47**(9): 736-741.

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**.

Khan, A. A., N. Bacha, B. Ahmad, G. Lutfullah, U. Farooq and R. J. Cox (2014). "Fungi as chemical industries and genetic engineering for the production of biologically active secondary metabolites." Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine **4**(11): 859-870.

Khorrami, A. R. and M. Taherkhani (2011). "Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer for pre-concentration of patulin from apple juice." Chromatographia **73**(1): 151-156.

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.

Kim, J., B. Campbell, N. Mahoney, K. Chan and G. May (2006). "Targeting antioxidative signal transduction and stress response system: control of pathogenic *Aspergillus* with phenolics that inhibit mitochondrial function." Journal of Applied Microbiology **101**(1): 181-189.

Kim, J. H., J. Yu, N. Mahoney, K. L. Chan, R. J. Molyneux, J. Varga, D. Bhatnagar, T. E. Cleveland, W. C. Nierman and B. C. Campbell (2008). "Elucidation of the functional genomics of antioxidant-based inhibition of aflatoxin biosynthesis." International Journal of Food Microbiology **122**(1): 49-60.

Kimura, M., T. Tokai, K. O'Donnell, T. J. Ward, M. Fujimura, H. Hamamoto, T. Shibata and I. Yamaguchi (2003). "The trichothecene biosynthesis gene cluster of *Fusarium graminearum* F15 contains a limited number of essential pathway genes and expressed non-essential genes." FEBS letters **539**(1): 105-110.

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." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **71**(9): 2105-2123.

Konietzny, U. and R. Greiner (2003). "The application of PCR in the detection of mycotoxigenic fungi in foods." Brazilian Journal of Microbiology **34**(4): 283-300.

Kosawang, C., M. Karlsson, D. F. Jensen, A. Dilokpimol and D. B. Collinge (2014). "Transcriptomic profiling to identify genes involved in Fusarium mycotoxin Deoxynivalenol and Zearalenone tolerance in the mycoparasitic fungus *Clonostachys rosea*." BMC genomics **15**(1): 55.

Kramer-Haimovich, H., E. Servi, T. Katan, J. Rollins, Y. Okon and D. Prusky (2006). "Effect of ammonia production by *Colletotrichum gloeosporioides* on pelB activation, pectate lyase secretion, and fruit pathogenicity." Applied and Environmental Microbiology **72**(2): 1034-1039.

-L-

Lahlali, R., M. N. Serrhini and M. H. Jijakli (2005). "Studying and modelling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *P. expansum*." International Journal of Food Microbiology **103**(3): 315-322.

Lalic, G., A. D. Aloise and M. D. Shair (2003). "An exceptionally mild catalytic thioester aldol reaction inspired by polyketide biosynthesis." Journal of the American Chemical Society **125**(10): 2852-2853.

Land, C. J. and K. Hult (1987). "Mycotoxin production by some wood-associated *Penicillium spp*." Letters in Applied Microbiology **4**(3): 41-44.

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. and J. C. Frisvad (1995). "Chemosystematics of *Penicillium* based on profiles of volatile metabolites." Mycological Research **99**(10): 1167-1174.

Larsen, T. O., J. C. Frisvad, G. Ravn and T. Skaaning (1998). "Mycotoxin production by *Penicillium expansum* on blackcurrant and cherry juice." Food Additives & Contaminants **15**(6): 671-675.

Lee, S., H. Son, J. Lee, Y.-R. Lee and Y.-W. Lee (2011). "A putative ABC transporter gene, ZRA1, is required for zearalenone production in *Gibberella zeae*." Current Genetics **57**(5): 343-351.

Lejla, D., M. Blažinkov, S. Sikora, F. Delaš, A. Skelin, A. Tudić, M. Mrkonjić-Fuka and M. Bošnjak (2010). "A Study of Antifungal and Antiafl atoxigenic Action of Newly Synthesized Analogues of Dehydroacetic Acid." Hrvatski Ä asopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam **5**(3-4): 127-135.

Leyral, G. and E. Vierling (2007). "Chapitre XVII: Les mycotoxines". Microbiologie et toxicologie des aliments: hygiène et sécurité alimentaires, Wolters Kluwer France**:** 279-282.

Li, B., T. Lai, G. Qin and S. Tian (2009). "Ambient pH stress inhibits spore germination of *Penicillium expansum* by impairing protein synthesis and folding: a proteomic-based study." Journal of Proteome Research **9**(1): 298-307.

Light, R. J. (1969). "6-Methylsalicylic acid decarboxylase from *Penicillium patulum*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology **191**(2): 430-438.

Light, R. J. and G. Vogel (1975). "[39] 6-Methylsalicylic acid (2, 6-cresotic acid) decarboxylase." Methods in Enzymology **43**: 530-540.

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*." Cellular Microbiology.

Lin, B.-K. and J. A. Anderson (1992). "Purification and properties of versiconal cyclase from *Aspergillus parasiticus*." Archives of Biochemistry and Biophysics **293**(1): 67-70.

Lindroth, S., A. Niskanen and O. Pensala (1978). "Patulin production during storage of blackcurrant, blueberry and strawberry jams inoculated with *Penicillium expansum* mould." Journal of Food Science **43**(5): 1427-1429.

Llewellyn, G. C., J. A. McCay, R. D. Brown, D. L. Musgrove, L. F. Butterworth, A. E. Munson and K. L. White Jr (1998). "Immunological evaluation of the mycotoxin patulin in female b6C3F$_1$ mice." Food and Chemical Toxicology **36**(12): 1107-1115.

López-Berges, M. S., C. Hera, M. Sulyok, K. Schäfer, J. Capilla, J. Guarro and A. Di Pietro (2013). "The velvet complex governs mycotoxin production and virulence of *Fusarium oxysporum* on plant and mammalian hosts." Molecular Microbiology **87**(1): 49-65.

Lopez-Diaz, T. M., C. Román-Blanco, M. T. Garcia-Arias, M. C. García-Fernández and M. L. García-López (1996). "Mycotoxins in two Spanish cheese varieties." International Journal of Food Microbiology **30**(3): 391-395.

Lugauskas, A. (2005). "Potential toxin producing micromycetes on food raw material and products of plant origin." Botanica Lithuanica **7**: 3-16.

Luque, M. I., A. Rodríguez, M. J. Andrade, R. Gordillo, M. Rodríguez and J. J. Córdoba (2011). "Development of a PCR protocol to detect patulin producing moulds in food products." Food Control **22**(12): 1831-1838.

Lykakis, I. N., I.-P. Zaravinos, C. Raptis and M. Stratakis (2009). "Divergent Synthesis of the Co-isolated Mycotoxins Longianone, Isopatulin, and (Z)-Ascladiol via Furan Oxidation." The Journal of Organic Chemistry **74**(16): 6339-6342.

Lynen, F. and M. Tada (1961). "Die biochemischen Grundlagen der Polyacetat-Regel ." Angewandte Chemie **73**(15): 513-519.

-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.

Mahfoud, R., M. Maresca, N. Garmy and J. Fantini (2002). "The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinal epithelium: mechanism of action of the toxin and protective effects of glutathione." Toxicology and Applied Pharmacology **181**(3): 209-218.

Mahoney, N. and R. J. Molyneux (2004). "Phytochemical inhibition of aflatoxigenicity in *Aspergillus flavus* by constituents of walnut (*Juglans regia*)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(7): 1882-1889.

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.

Majid Cheraghali, A., H. Reza Mohammadi, M. Amirahmadi, H. Yazdanpanah, G. Abouhossain, F. Zamanian, M. Ghazi Khansari and M. Afshar (2005). "Incidence of patulin contamination in apple juice produced in Iran." Food Control **16**(2): 165-167.

Manonmani, H., S. Anand, A. Chandrashekar and E. Rati (2005). "Detection of aflatoxigenic fungi in selected food commodities by PCR." Process Biochemistry **40**(8): 2859-2864.

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 Microbiology Ecology **43**(3): 359-366.

Marcet-Houben, M., A.-R. Ballester, B. de la Fuente, E. Harries, J. F. Marcos, L. Gonzáez-Candelas and T. Gabaldón (2012). "Genome sequence of the necrotrophic fungus *Penicillium digitatum*, the main postharvest pathogen of citrus." BMC Genomics **13**(1): 646.

Marin, S., N. Magan, J. Serra, A. J. Ramos, R. Canela and V. Sanchis (1999). "Fumonisin B1 production and growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* on maize, wheat, and barley grain." Journal of Food Science **64**(5): 921-924.

Marin, S., H. Morales, H. A. H. 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): 1316-1322.

Marín, S., H. Morales, A. J. Ramos and V. Sanchis (2006). "Evaluation of growth quantification methods for modelling the growth of *Penicillium expansum* in an apple-based medium." Journal of the Science of Food and Agriculture **86**(10): 1468-1474.

Marks, S. C., W. Mullen and A. Crozier (2007). "Flavonoid and chlorogenic acid profiles of English cider apples." Journal of the Science of Food and Agriculture **87**(4): 719-728.

Martins, M. L., A. Gimeno, H. M. Martins and F. Bernardo (2002). "Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots." Food Additives & Contaminants **19**(6): 568-574.

Mattheis, J. P. and R. G. Roberts (1992). "Identification of geosmin as a volatile metabolite of *Penicillium expansum*." Applied and Environmental Microbiology **58**(9): 3170-3172.

McCallum, J. L., R. Tsao and T. Zhou (2002). "Factors affecting patulin production by *Penicillium expansum*." Journal of Food Protection **65**(12): 1937-1942.

McKenzie, K., A. Sarr, K. Mayura, R. Bailey, D. Miller, T. Rogers, W. Norred, K. Voss, R. Plattner and L. Kubena (1997). "Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone." Food and Chemical Toxicology **35**(8): 807-820.

McKinley, E. R. and W. W. Carlton (1980). "Patulin mycotoxicosis in Swiss ICR mice." Food and Cosmetics Toxicology **18**(2): 181-187.

McKinley, E. R., W. W. Carlton and G. D. Boon (1982). "Patulin mycotoxicosis in the rat: toxicology, pathology and clinical pathology." Food and Chemical Toxicology **20**(3): 289-300.

McLaughlin, J., D. Lambert, P. J. Padfield, J. P. H. Burt and C. A. O'Neill (2009). "The mycotoxin patulin, modulates tight junctions in caco-2 cells." Toxicology in vitro **23**(1): 83-89.

Medeiros, F. H. V. d., S. J. Martins, T. D. Zucchi, I. S. d. Melo, L. R. Batista and J. d. C. Machado (2012). "Biological control of mycotoxin-producing molds." Ciência e Agrotecnologia **36**(5): 483-497.

Méheust, D. (2012). "Exposition aux moisissures en environnement intérieur : méthodes de mesure et impacts sur la santé". Thèse de Doctorat, Université Rennes 1, France.

Mellersh, D. G., I. V. Foulds, V. J. Higgins and M. C. Heath (2002). "H_2O_2 plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant–fungal interactions." The Plant Journal **29**(3): 257-268.

Membré, J.-M. and R. J. Lambert (2008). "Application of predictive modelling techniques in industry: from food design up to risk assessment." International Journal of Food Microbiology **128**(1): 10-15.

Menniti, A. M., F. Neri, R. Gregori and M. Maccaferri (2010). "Some factors influencing patulin production by *Penicillium expansum* in pome fruits." Journal of the Science of Food and Agriculture **90**(13): 2183-2187.

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.

Milićević, D. R., M. Škrinjar and T. Baltić (2010). "Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: Challenges for food safety control." Toxins **2**(4): 572-592.

Min, K., Y. Shin, H. Son, J. Lee, J. C. Kim, G. J. Choi and Y. W. Lee (2012). "Functional analyses of the nitrogen regulatory gene areA in *Gibberella zeae*." FEMS Microbiology Letters **334**(1): 66-73.

Minervini, F. and M. E. Dell'Aquila (2008). "Zearalenone and reproductive function in farm animals." International Journal of Molecular Sciences **9**(12): 2570-2584.

Mislivec, P. B. and J. Tuite (1970). "Temperature and relative humidity requirements of species of *Penicillium* isolated from yellow dent corn kernels." Mycologia: 75-88.

Moake, M. M., O. I. Padilla-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.

Mollea, C. and F. Bosco (2012). Mycotoxins in food. Food Industrial Processes - Methods and Equipment**:** 170-200.

Molnar, O., G. Schatzmayr, E. Fuchs and H. Prillinger (2004). "*Trichosporon mycotoxinivorans sp.* nov., A New Yeast Species Useful in Biological Detoxification of Various Mycotoxins." Systematic and Applied Microbiology **27**(6): 661-671.

Morales, H., G. Barros, S. Marín, 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. Marín, A. J. Ramos and V. Sanchis (2008b). "Influence of post-harvest technologies applied during cold storage of apples in *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation: A review." Food Control **21**(7): 953-962.

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

Morales, H., V. Sanchis, J. Coromines, A. J. Ramos and S. Marín (2008c). "Inoculum size and intraspecific interactions affects *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in apples." Food Microbiology **25**(2): 378-385.

Morales, H., V. Sanchis, A. Rovira, A. J. Ramos and S. Marín (2007b). "Patulin accumulation in apples during postharvest: Effect of controlled atmosphere storage and fungicide treatments." Food Control **18**(11): 1443-1448.

Moretti, A., A. Susca, G. Mule, A. Logrieco and R. Proctor (2013). "Molecular biodiversity of mycotoxigenic fungi that threaten food safety." International Journal of Food Microbiology **167**(1): 57-66.

Moss, M. O. and M. T. Long (2002). "Fate of patulin in the presence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Food Additives & Contaminants **19**(4): 387-399.

Mossini, S. A. G., K. P. De Oliveira and C. Kemmelmeier (2004). "Inhibition of patulin production by *Penicillium expansum* cultured with neem (*Azadirachta indica*) leaf extracts." Journal of Basic Microbiology **44**(2): 106-113.

Moukas, A., V. Panagiotopoulou and P. Markaki (2008). "Determination of patulin in fruit juices using HPLC-DAD and GC-MSD techniques." Food Chemistry **109**(4): 860-867.

Murillo-Arbizu, M., S. Amézqueta, E. González-Peñas and A. L. de Cerain (2009). "Occurrence of patulin and its dietary intake through apple juice consumption by the Spanish population." Food Chemistry **113**(2): 420-423.

Muro-Cacho, C., T. Stedeford, M. Banasik and T. T. Suchecki (2003). "Mycotoxins: Mechanisms of toxicity and methods of detection for identifying exposed individuals." Journal of Land Use & Environmental Law **19**(2): 537-545.

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): 467-475.

Murphy, G., G. Vogel, G. Krippahl and F. Lynen (1974). "Patulin Biosynthesis: The Role of Mixed-Function Oxidases in the Hydroxylation of *m*-Cresol." European Journal of Biochemistry **49**(2): 443-455.

Murphy, P. A., S. Hendrich, C. Landgren and C. M. Bryant (2006). "Food mycotoxins: an update." Journal of Food Science **71**(5): R51-R65.

-N-

Nabeta, K., A. Ichihara and S. Sakamura (1975). "Biosynthesis of epoxydon and related compounds by *Phyllosticta sp.*" Agricultural and Biological Chemistry **39**(2): 409-413.

Nair, D. R., S. Anand, P. Verma, D. Mohanty and R. S. Gokhale (2012). "Genetic, biosynthetic and functional versatility of polyketide synthases." Current Science India **102**: 277-287.

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.

Nazari, L., E. Pattori, V. Terzi, C. Morcia and V. Rossi (2014). "Influence of temperature on infection, growth, and mycotoxin production by *Fusarium langsethiae* and *F. sporotrichioides* in durum wheat." Food Microbiology **39**: 19-26.

Negedu, A., S. E. Atawodi, J. B. Ameh, V. J. Umoh and H. Y. Tanko (2011). "Economic and health perspectives of mycotoxins: a review." Continental Journal of Biomedical Sciences **5**(1): 5 - 26.

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): 109-117.

Nguyen, M. T. (2007). "Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam: étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines". Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, France.

Nicholson, R. L. and R. Hammerschmidt (1992). "Phenolic compounds and their role in disease resistance." Annual review of phytopathology **30**(1): 369-389.

Nicholson, T. P., B. A. M. Rudd, M. Dawson, C. M. Lazarus, T. J. Simpson and R. J. Cox (2001). "Design and utility of oligonucleotide gene probes for fungal polyketide synthases." Chemistry & Biology **8**(2): 157-178..

Noorbakhsh, R., A. R. Bahrami, S. A. Mortazavi and M. Bahreini (2009). "PCR-based identification of aflatoxigenic fungi associated with Iranian saffron." Journal of Food Science and Biotechnology **18**.

NormanáCollie, J. (1907). "CLXXI-Derivatives of the multiple keten group." Journal of the Chemical Society, Transactions **91**: 1806-1813.

Northolt, M. D., H. P. Van Egmond and W. E. Paulsch (1979). "Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature." Journal of Food Protection **42**(6): 485-490.

-O-

O'Callaghan, J., M. X. Caddick and A. D. W. Dobson (2003). "A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*." Microbiology **149**(12): 3485-3491.

O'Gorman, C. M., H. T. Fuller and P. S. Dyer (2008). "Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*." Nature **457**(7228): 471-474.

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.

Ortiz, S. C., M. Trienens and M. Rohlfs (2013). "Induced fungal resistance to insect grazing: reciprocal fitness consequences and fungal gene expression in the Drosophila-Aspergillus model system." PloS One **8**(8): e74951.

Ortuño, A., A. Báidez, P. Gómez, M. C. Arcas, I. Porras, A. García-Lidón and J. A. Del Río (2006). "*Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*." Food Chemistry **98**(2): 351-358.

Osbourn, A. (2010). "Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation." Trends in genetics **26**(10): 449-457.

Osswald, H., H. K. Frank, D. Komitowski and H. Winter (1976). "Long-term testing of patulin administered orally to Sprague-Dawley rats and Swiss mice." Food and Cosmetics Toxicology **16**(3): 243-247.

Ough, C. S. and C. A. Corison (1980). "Measurement of patulin in grapes and wines." Journal of Food Science **45**(3): 476-478.

Özdemir, Y., S. Erdoğan, E. O. Sayin and Ş. Kurultay (2009). "Changes of Patulin Concentration in Apple Products During Processing Stages: A Review." Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi **2**(2): 47-52.

Özsoy, N., G. Selmanoğlu, E. A. Koçkaya, N. Gül and S. Cebesoy (2008). "Effect of patulin on the interdigitating dendritic cells (IDCs) of rat thymus." Cell Biochemistry and Function **26**(2): 192-196.

-P-

Paiva, S., F. Devaux, S. Barbosa, C. Jacq and M. Casal (2004). "Ady2p is essential for the acetate permease activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Yeast **21**(3): 201-210.

Palmer, J. M. and N. P. Keller (2000). "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.

Panagou, E. Z., P. N. Skandamis and G.-J. Nychas (2003). "Modelling the combined effect of temperature, pH and a_w on the growth rate of Monascus ruber, a heat-resistant fungus isolated from green table olives." Journal of Applied Microbiology **94**(1): 146-156.

Panasenko, V. T. (1967). "Ecology of microfungi." The Botanical Review **33**(3): 189-215.

Pardo, E., S. Marın, V. Sanchis and A. Ramos (2004). "Prediction of fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* on irradiated barley grain as influenced by temperature and water activity." International Journal of Food Microbiology **95**(1): 79-88.

Parker, G. F. and P. C. Jenner (1968). "Distribution of trypacidin in cultures of *Aspergillus fumigatus*." Applied microbiology **16**(8): 1251.

Parra, R. and N. Magan (2004). "Modelling the effect of temperature and water activity on growth of *Aspergillus niger* strains and applications for food spoilage moulds." Journal of Applied Microbiology **97**(2): 429-438.

Paster, N., D. Huppert and R. Barkai-Golan (1995). "Production of patulin by different strains of *Penicillium expansum* in pear and apple cultivars stored at different temperatures and modified atmospheres." Food Additives & Contaminants **12**(1): 51-58.

Paterson, R., S. Archer, Z. Kozakiewicz, A. Lea, T. Locke and E. O'Grady (2000). "A gene probe for the patulin metabolic pathway with potential for use in patulin and novel disease control." Biocontrol Science and Technology **10**(4): 509-512.

Paterson, R. R. M. (2004). "The isoepoxydon dehydrogenase gene of patulin biosynthesis in cultures and secondary metabolites as candidate PCR inhibitors." Mycological Research **108**(12): 1431-1437.

Paterson, R. R. M. (2006). "Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR." Process Biochemistry **41**(7): 1467-1474.

Paterson, R. R. M., Z. Kozakiewicz, T. Locke, D. Brayford and S. C. B. Jones (2003). "Novel use of the isoepoxydon dehydrogenase gene probe of the patulin metabolic pathway and chromatography to test penicillia isolated from apple production systems for the potential to contaminate apple juice with patulin." Food Microbiology **20**(3): 359-364.

Patterson, M. and A. P. Damoglou (1986). "The effect of water activity and pH on the production of mycotoxins by fungi growing on a bread analogue." Letters in Applied Microbiology **3**(6): 123-125.

Pattono, D., M. Pazzi, G. Zeppa and T. Civera (2012). Quantification of Patulin in Piedmont Cheese by HPLC: Preliminary Note. Veterinary Science, Springer**:** 173-177.

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): 156-162.

Peñalva, M. A. and J. Arst, Herbert N (2004). "Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts." Annual Review of Microbiology **58**: 425-451.

Pérez-Ilzarbe, J., T. Hernández and I. Estrella (1991). "Phenolic compounds in apples: varietal differences." Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung **192**(6): 551-554.

Petkovšek, M. M., V. Usenik and F. Štampar (2003). "The role of chlorogenic acid in the resistance of apples to apple scab (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wind. Aderh.)." Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljublj. Kmet **81**: 233-42.

Pfeiffer, E., T. T. Diwald and M. Metzler (2005). "Patulin reduces glutathione level and enzyme activities in rat liver slices." Molecular Nutrition & Food Research **49**(4): 329-336.

Phillips, T. D. and A. W. Hayes (1978). "Effects of patulin on the kinetics of substrate and cationic ligand activation of adenosine triphosphatase in mouse brain." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **205**(3): 606-616.

Pianzzola, M. J., M. Moscatelli and S. Vero (2004). "Characterization of *Penicillium* isolates associated with blue mold on apple in Uruguay." Plant Disease **88**(1): 23-28.

Pinton, P., D. Tsybulskyy, J. Lucioli, J. Laffitte, P. Callu, F. Lyazhri, F. Grosjean, A.-P. BRACARENSE, K.-C. Martine and I. P. Oswald (2012). "Toxicity of deoxynivalenol and its acetylated derivatives on the intestine: differential effects on morphology, barrier function, tight junctions proteins and MAPKinases." Toxicological Sciences: kfs239.

Pitkin, J. W., D. G. Panaccione and J. D. Walton (1996). "A putative cyclic peptide efflux pump encoded by the TOXA gene of the plant-pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*." Microbiology **142**(6): 1557-1565.

Pitt, J. I. (1979). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*, Academic Press, London.

Pitt, J. I. (2000). "Toxigenic fungi and mycotoxins." British Medical Bulletin **56**(1): 184-192.

Pitt, J. I. and A. A. D. Hocking (2009). Fungi and food spoilage, 3rd edition. Springer.

Pitt, J. I., R. A. Spotts, R. J. Holmes and R. H. Cruickshank (1991). "*Penicillium solitum* revived, and its role as a pathogen of pomaceous fruit." Phytopathology **81**(10): 1108-1112.

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 Microbiology Letters **255**(2): 275-279.

Priest, J. W. and R. J. Light (1989). "Patulin biosynthesis: epoxidation of toluquinol and gentisyl alcohol by particulate preparations from *Penicillium patulum*." Biochemistry **28**(23): 9192-9200.

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): 237-249.

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): 1923-1930.

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

Puel, O. (2007). "Bases moléculaires de la voie de biosynthèse de la patuline, mycotoxine produite par *Byssochlamys nivea* et *Penicillium griseofulvum".* Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, France.

Puel, O., P. Galtier and I. P. Oswald (2010). "Biosynthesis and toxicological effects of patulin." Toxins **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): 131-139.

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): 550-553.

-Q-

Qin, Y., L. Bao, M. Gao, M. Chen, Y. Lei, G. Liu and Y. Qu (2013). "*Penicillium decumbens* BrlA extensively regulates secondary metabolism and functionally associates with the expression of cellulase genes." Applied Microbiology and Biotechnology **97**(24): 10453-10467.

-R-

Rai, M. K., S. R. Bonde, A. P. Ingle and A. K. Gade (2012). "Mycotoxin: rapid detection, differentiation and safety." Journal of Pharmaceutical Education & Research **3**(1): 22-34.

Raistrick, H. (1943). "Patulin in the common cold collaborative research on a derivative of *Penicillium patulum* bainier: I. Introduction." The Lancet **242**(6273): 625.

Reboux, G. (2006). "Mycotoxines: effets sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques." Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique **46**(3): 208-212.

Reddy, C. S., P. K. Chan, A. W. Hayes, W. L. Williams and A. Ciegler (1979). "Acute toxicity of patulin and its interaction with penicillic acid in dogs." Food and Cosmetics Toxicology **17**(6): 605-609.

Reddy, K., H. K. Abbas, C. A. Abel, W. T. Shier and B. Salleh (2010). "Mycotoxin contamination of beverages: Occurrence of patulin in apple juice and ochratoxin A in coffee, beer and wine and their control methods." Toxins **2**(2): 229-261.

Reverberi, M., S. Zjalic, A. Ricelli, A. A. Fabbri and C. Fanelli (2006). "Oxidant/antioxidant balance in *Aspergillus parasiticus* affects aflatoxin biosynthesis." Mycotoxin Research **22**(1): 39-47.

Rice, S. L., L. R. Beuchat and R. E. Worthington (1977). "Patulin production by *Byssochlamys spp.* in fruit juices." Applied and Environmental Microbiology **34**(6): 791-796.

Ricelli, A., F. Baruzzi, M. Solfrizzo, M. Morea and F. P. Fanizzi (2007). "Biotransformation of patulin by *Gluconobacter oxydans*." Applied and Environmental Microbiology **73**(3): 785-792.

Ridley, C. R. and C. Khosla (2009). "Polyketides." Applied Microbiology: Industrial: 472-481.

Rinderknecht, H., J. L. Ward, F. Bergel and A. L. Morrison (1947). "Studies on antibiotics: 2. Bacteriological activity and possible mode of action of certain non-nitrogenous natural and synthetic antibiotics." Biochemical Journal **41**(3): 463.

Ritieni, A. (2003). "Patulin in Italian commercial apple products." Journal of agricultural and food chemistry **51**(20): 6086-6090.

Roach, J. A. G., K. D. White, M. W. Trucksess and F. S. Thomas (2000). "Capillary gas chromatography/mass spectrometry with chemical ionization and negative ion detection for confirmation of identity of patulin in apple juice." Journal of AOAC International **83**(1): 104-112.

Robellet, X., M. Flipphi, S. Pégot, A. MacCabe and C. Vélot (2008). "AcpA, a member of the GPR1/FUN34/YaaH membrane protein family, is essential for acetate permease activity in the hyphal fungus *Aspergillus nidulans*." Biochemical Journal **412**: 485-493.

Rodríguez, A., M. Isabel Luque, M. J. Andrade, M. Rodríguez, M. A. Asensio and J. J. Córdoba (2011). "Development of real-time PCR methods to quantify patulin-producing molds in food products." Food Microbiology **28**(6): 1190-1199.

Rollins, M. J. and G. M. Gaucher (1994). "Ammonium repression of antibiotic and intracellular proteinase production in *Penicillium urticae*." Applied Microbiology and Biotechnology **41**(4): 447-455.

Rosenberger, D. A., D. T. Wicklow, V. A. Korjagin and S. M. Rondinaro (1991). "Pathogenicity and benzimidazole resistace in *Penicillium* species recovered from flotation tanks in apple packinghouses." Plant Disease **75**(7): 712-715.

Ross, T. and T. A. McMeekin (1994). "Predictive microbiology." International Journal of Food Microbiology **23**(3): 241-264.

Rousk, J., P. C. Brookes and E. Bååth (2009). "Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization." Applied and Environmental Microbiology **75**(6): 1589-1596.

Rychlik, M. (2003). "Rapid degradation of the mycotoxin patulin in man quantified by stable isotope dilution assays." Food Additives & Contaminants **20**(9): 829-837.

Rychlik, M. (2005). "Studies on the Degradation of the mycotoxin Patulin in Blood." Nutrition **29**(2).

Rychlik, M., F. Kircher, V. Schusdziarra and F. Lippl (2004). "Absorption of the mycotoxin patulin from the rat stomach." Food and Chemical Toxicology **42**(5): 729-735.

Rychlik, M. and P. Schieberle (1999). "Quantification of the mycotoxin patulin by a stable isotope dilution assay." Journal of Agricultural and Food Chemistry **47**(9): 3749-3755.

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-

Sabater-Vilar, M., R. F. M. Maas, H. De Bosschere, R. Ducatelle and J. Fink-Gremmels (2004). "Patulin produced by an *Aspergillus clavatus* isolated from feed containing malting residues associated with a lethal neurotoxicosis in cattle." Mycopathologia **158**(4): 419-426.

Salas, M. P., C. M. Reynoso, G. Céliz, M. Daz and S. L. Resnik (2012). "Efficacy of flavanones obtained from citrus residues to prevent patulin contamination." Food Research International **48**(2): 930-934.

Salomão, B., G. M. Aragao, J. J. Churey and R. W. Worobo (2008). "Efficacy of sanitizing treatments against *Penicillium expansum* inoculated on six varieties of apples." Journal of Food Protection **71**(3): 643-647.

Salomao, B., G. M. F. Aragão, J. J. Churey, O. I. Padilla-Zakour and R. W. Worobo (2009). "Influence of storage temperature and apple variety on patulin production by *Penicillium expansum*." Journal of Food Protection **72**(5): 1030-1036.

Samapundo, S., B. De Meulenaer, D. Osei-Nimoh, Y. Lamboni, J. Debevere and F. Devlieghere (2007a). "Can phenolic compounds be used for the protection of corn from fungal invasion and mycotoxin contamination during storage?" Food Microbiology **24**(5): 465-473.

Samapundo, S., F. Devlieghere, A. Geeraerd, B. De Meulenaer, J. Van Impe and J. Debevere (2007b). "Modelling of the individual and combined effects of water activity and temperature on the radial growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on corn." Food Microbiology **24**(5): 517-529.

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.

Sanderson, P. G. and R. A. Spotts (1995). "Postharvest decay of winter pear and apple fruit caused by species of *Penicillium*." Phytopathology **85**(1): 103-110.

Sands, D. C., J. L. McIntyre and G. S. Walton (1976). "Use of activated charcoal for the removal of patulin from cider." Applied and Environmental Microbiology **32**(3): 388-391.

Sanoner, P., S. Guyot, N. Marnet, D. Molle and J.-F. Drilleau (1999). "Polyphenol profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica sp*.)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **47**(12): 4847-4853.

Sanzani, S. M., A. De Girolamo, L. Schena, M. Solfrizzo, A. Ippolito and A. Visconti (2009a). "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.

Sanzani, S. M., L. Schena, F. Nigro, A. De Girolamo and A. Ippolito (2009b). "Effect of quercetin and umbelliferone on the transcript level of Penicillium expansum genes involved in patulin biosynthesis." European journal of plant pathology **125**(2): 223-233.

Sarni-Manchado, P. and V. Cheynier (2006). Polyphenols in food products, Editions Tec & Doc.

Scalbert, A. and G. Williamson (2000). "Dietary intake and bioavailability of polyphenols." The Journal of Nutrition **130**(8): 2073S-2085S.

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

Schatzmayr, G., D. Heidler, E. Fuchs, S. Nitsch, M. Mohnl, M. Täubel, A. P. Loibner, R. Braun and E. M. Binder (2003). "Investigation of different yeast strains for the detoxification of ochratoxin A." Mycotoxin Research **19**(2): 124-128.

Schebb, N. H., H. Faber, R. Maul, F. Heus, J. Kool, H. Irth and U. Karst (2009). "Analysis of glutathione adducts of patulin by means of liquid chromatography (HPLC) with biochemical detection (BCD) and electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS)." Analytical and Bioanalytical Chemistry **394**(5): 1361-1373.

Schmidt-Heydt, M., D. Stoll, P. Schütz and R. Geisen (2015). "Oxidative stress induces the biosynthesis of citrinin by *Penicillium verrucosum* at the expense of ochratoxin." International Journal of Food Microbiology **192**: 1-6.

Schneidgenová, M., A. Kalafová, J. Emrichová, K. Zbynovská, P. Petruska, L. Ondruska, R. Jurcík, L. Chrastinová and M. Capcarová (2014). "The effect of patulin on rabbit sperm motility and progressive motility." Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences **3**(special issue 2): 155-156.

Schnürer, J., J. Olsson and T. Börjesson (1999). "Fungal volatiles as indicators of food and feeds spoilage." Fungal Genetics and Biology **27**(2): 209-217.

Schumacher, D. M., M. Metzler and L. Lehmann (2005). "Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster V79 cells, and its modulation by intracellular glutathione." Archives of Toxicology **79**(2): 110-121.

Scott, A. I. and M. Yalpani (1967). "A mass-spectrometric study of biosynthesis: conversion of deutero-m-cresol into patulin." Chemical Communications (London)(18): 945-946.

Scott, A. I., L. Zamir, G. T. Phillips and M. Yalpani (1973). "The biosynthesis of patulin." Bioorganic Chemistry **2**(2): 124-139.

Scott, P. M. (1974). "Collaborative study of a chromatographic method for determination of patulin in apple juice." Journal of AOAC International **57**(3).

Scott, P. M., B. Kennedy and W. Van Walbeek (1972). "Desoxypatulinic acid from a patulin-producing strain of *Penicillium patulum*." Cellular and Molecular Life Sciences **28**(10): 1252-1252.

Scott, R. E., A. Jones, K. S. Lam and G. M. Gaucher (1986). "Manganese and antibiotic biosynthesis. I. A specific manganese requirement for patulin production in *Penicillium urticae*." Canadian journal of microbiology **32**(3): 259-267.

Sekiguchi, J. and G. M. Gaucher (1977). "Conidiogenesis and secondary metabolism in *Penicillium urticae*." Applied and Environmental Microbiology **33**(1): 147-158.

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 (1979). "Isoepoxydon, a new metabolite of the patulin pathway in *Penicillium urticae*." Biochemical Journal **182**: 445-453.

Sekiguchi, J., G. M. Gaucher and Y. Yamada (1979). "Biosynthesis of patulin in *Penicillium urticae* : Identification of isopatulin as a new intermediate." Tetrahedron Letters **1**: 41-42.

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): 1939-1942.

Selma, M. V., P. V. Martínez-Culebras and R. Aznar (2008). "Real-time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in wine grapes." International Journal of Food Microbiology **122**(1): 126-134.

Selmanoğlu, G. (2006). "Evaluation of the reproductive toxicity of patulin in growing male rats." Food and Chemical Toxicology **44**(12): 2019-2024.

Selmanoğlu, 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): 155-165.

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.

Sewall, T. C., C. W. Mims and W. E. Timberlake (1990). "*abaA* controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans*." The Plant Cell Online **2**(8): 731-739.

Shantappa, S., S. Dhingra, P. Hernández-Ortiz, E. A. Espeso and A. M. Calvo (2013). "Role of the Zinc Finger Transcription Factor SltA in Morphogenesis and Sterigmatocystin Biosynthesis in the Fungus *Aspergillus nidulans*." PloS One **8**(7): e68492.

Shao, S., T. Zhou and B. D. McGarvey (2012). "Comparative metabolomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* during the degradation of patulin using gas chromatography-mass spectrometry." Applied Microbiology and Biotechnology **94**(3): 789-797.

Shapira, R., N. Paster, O. Eyal, M. Menasherov, A. Mett and R. Salomon (1996). "Detection of aflatoxigenic molds in grains by PCR." Applied and Environmental Microbiology **62**(9): 3270-3273.

Shen, B. (2000). Biosynthesis of aromatic polyketides. Biosynthesis, Springer**:** 1-51.

Shimizu, T., H. Kinoshita and T. Nihira (2007). "Identification and in vivo functional analysis by gene disruption of *ctnA*, an activator gene involved in citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus*." Applied and Environmental Microbiology **73**(16): 5097-5103.

Siddique, M. H. (2012). Study of the biosynthesis pathway of the geosmin in *Penicillium expansum*, Institut National Polytechnique de Toulouse.

Silici, S. and K. Karaman (2014). "Inhibitory Effect of Propolis on Patulin Production of *Penicillium expansum* in Apple Juice." Journal of Food Processing and Preservation **38**(3): 1129-1134.

Silva, J. C., R. E. Minto, C. E. Barry, K. A. Holland and C. A. Townsend (1996). "Isolation and Characterization of the Versicolorin B Synthase Gene from *Aspergillus parasiticus* : Expansion of the aflatoxin B1 biosynthetic gene cluster." Journal of Biological Chemistry **271**(23): 13600-13608.

Singh, J. (1967). Patulin. Mechanism of Action, Springer**:** 621-630.

Sitton, J. W. and M. E. Patterson (1992). "Effect of high-carbon dioxide and low-oxygen controlled atmospheres on postharvest decays of apples." Plant Disease **76**(10): 992-995.

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.

Smith, E. E., E. A. Duffus and M. H. Small (1993). "Effects of patulin on postimplantation rat embryos." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **25**(2): 267-270.

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.

Sorenson, W. G., J. Simpson and V. Castranova (1985). "Toxicity of the mycotoxin patulin for rat alveolar macrophages." Environmental Research **38**(2): 407-416.

Spadaro, D., A. Ciavorella, S. Frati, A. Garibaldi and M. L. Gullino (2007). "Incidence and level of patulin contamination in pure and mixed apple juices marketed in Italy." Food Control **18**(9): 1098-1102.

Spadaro, D., A. Garibaldi and M. L. Gullino (2008). "Occurrence of patulin and its dietary intake through pear, peach, and apricot juices in Italy." Food Additives and Contaminants **1**(2): 134-139.

Spadaro, D., S. Patharajan, M. Kartikeyan, A. Lorè, A. Garibaldi and M. L. Gullino (2011). "Specific PCR primers for the detection of isolates of *Aspergillus carbonarius* producing ochratoxin A on grapevine." Annals of Microbiology **61**(2): 267-272.

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

Speijers, G. J. A. and M. H. M. Speijers (2004). "Combined toxic effects of mycotoxins." Toxicology Letters **153**(1): 91-98.

Staunton, J. and K. J. Weissman (2001). "Polyketide biosynthesis: a millennium review." Natural Product Reports **18**(4): 380-416.

Steiman, R., F. Seigle-Murandi, L. Sage and S. Krivobok (1989). "Production of patulin by micromycetes." Mycopathologia **105**(3): 129-133.

Stergiopoulos, I., L.-H. Zwiers and M. A. De Waard (2002). "Secretion of natural and synthetic toxic compounds from filamentous fungi by membrane transporters of the ATP-binding cassette and major facilitator superfamily." European Journal of Plant Pathology **108**(7): 719-734.

Steyn, P. S. (1991). "The biosynthesis of polyketide-derived mycotoxins." Journal of environmental pathology, toxicology and oncology: official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer **11**(1): 47-59.

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.

Suárez, T. and M. A. Penalva (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." Molecular Microbiology **20**(3): 529-540.

Sundstøl Eriksen, G., H. Pettersson and T. Lundh (2004). "Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites." Food and Chemical Toxicology **42**(4): 619-624.

Suzuki, T., H. Tanabe and M. Takeda (1971). "A new mycotoxin produced by *Aspergillus clavatus*." Chemical & pharmaceutical bulletin **19**(9): 1786-1788.

Sweeney, M. J. and A. D. W. Dobson (1999). "Molecular biology of mycotoxin biosynthesis." FEMS Microbiology Letters **175**(2): 149-163.

-T-

Tabatabaie, F., S. A. Mortazavi, F. Tabatabaee and A. G. Ebadi (2010). "Reduction of Patulin in Apple Juice after Treatment with SO_2 and Heat." Indian Journal of Science and Technology **3**(5): 596-597.

Tabuc, C. (2007). "Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines". Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse et Université de Bucarest.

Tae, H., J. K. Sohng and K. Park (2009). "MapsiDB: an integrated web database for type I polyketide synthases." Bioprocess and Biosystems Engineering **32**(6): 723-727.

Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar (2013). "MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0." Molecular Biology and Evolution **30**(12): 2725-2729.

Tančinová, D., Z. Barboráková, Z. Mašková, M. Císarová and T. Bojňanská (2012). "The occurrence of micromycetes in the bread samples and their potential ability produce mycotoxins." Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences **1**: 813-818.

Tanenbaum, S. W. and E. W. Bassett (1958). "The biosynthesis of patulin: I. Related aromatic substances from *Penicillium patulum*, strain 2159A." Biochimica et biophysica acta **28**: 21-31.

Tanenbaum, S. W. and E. W. Bassett (1959). "The biosynthesis of patulin iii. Evidence for a molecular rearrangement of the aromatic ring." Journal of Biological Chemistry **234**(7): 1861-1866.

Tangni, E. K., R. Theys, E. Mignolet, M. Maudoux, J. Y. Michelet and Y. Larondelle (2003). "Patulin in domestic and imported apple-based drinks in Belgium: occurrence and exposure assessment." Food Additives & Contaminants **20**(5): 482-489.

Taniwaki, M. H., A. D. Hocking, J. I. Pitt and G. H. Fleet (2001). "Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres." International Journal of Food Microbiology **68**(1): 125-133.

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.

Tapia, M. O., A. F. Giordano, A. L. Soraci, C. A. Gonzalez, L. A. Denzoin, I. O. Ortega, W. Olson and M. J. Murphy (2006). "Toxic effects of patulin on sheep." Journal of Animal and Veterinary Advances **5**(4): 271-276.

Tassou, C. C., E. Z. Panagou, P. Natskoulis and N. Magan (2007). "Modelling the effect of temperature and water activity on the growth of two ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* from Greek wine grapes." Journal of Applied Microbiology **103**(6): 2267-2276.

Taylor, J. W., D. J. Jacobson and M. C. Fisher (1999). "The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification." Annual review of phytopathology **37**(1): 197-246.

Thompson-Witrick, K. A., K. M. Goodrich, A. P. Neilson, E. K. Hurley, G. M. Peck and A. C. Stewart (2014). "Characterization of the Polyphenol Composition of 20 Cultivars of Cider, Processing, and Dessert Apples (Malus× domestica Borkh.) Grown in Virginia." Journal of Agricultural and Food Chemistry **62**(41): 10181-10191.

Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Research **22**(22): 4673-4680.

Tikekar, R. V., R. C. Anantheswaran and L. F. LaBorde (2013). "Patulin degradation in a model apple juice system and in apple juice during ultraviolet processing." Journal of Food Processing and Preservation.

Tilburn, J., S. Sarkar, D. Widdick, E. Espeso, M. Orejas, J. Mungroo, M. Penalva and H. 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.

Torres, A. M., M. L. Ramirez, M. Arroyo, S. N. Chulze and N. Magan (2003). "Potential use of antioxidants for control of growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on whole maize grain." International Journal of Food Microbiology **83**(3): 319-324.

Trienens, M. and M. Rohlfs (2013). "Insect-fungus interference competition-The potential role of global secondary metabolite regulation, pathway-specific mycotoxin expression and formation of oxylipins." Fungal Ecology **5**(2): 191-199.

Trucksess, M. W. and Y. Tang (1999). "Solid-phase extraction method for patulin in apple juice and unfiltered apple juice." JOURNAL-AOAC INTERNATIONAL **82**: 1109-1114.

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.

Tudzynski, B. (2014). "Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi." Frontiers in Microbiology **5**.

-U-

U. S. Food Drug Administration [USFDA] (2004). Compliance policy guide. Compliance policy guidance for FDA staff. Sec. 510.150. Apple juice, apple juice concentrates, and apple juice products-Adulteration with patulin.

Utermark, J. and P. Karlovsky (2007). "Role of zearalenone lactonase in protection of *Gliocladium roseum* from fungitoxic effects of the mycotoxin zearalenone." Applied and Environmental Microbiology **73**(2): 637-642.

-V-

Valık, L., J. Baranyi and F. Görner (1999). "Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Penicillium roqueforti*." International Journal of Food Microbiology **47**(1): 141-146.

Van de Perre, E., L. Jacxsens, W. Van Der Hauwaert, I. Haesaert and B. De Meulenaer (2013). "Screening for the Presence of Patulin in Molded Fresh Produce and Evaluation of Its Stability in the Production of Tomato Products." Journal of Agricultural and Food Chemistry **62**(1): 304-309.

van den Berg, M. A., R. Albang, K. Albermann, J. H. Badger, J.-M. Daran, A. J. M. Driessen, C. Garcia-Estrada, N. D. Fedorova, D. M. Harris, W. H. M. Heijne, V. Joardar, J. A. K. W. Kiel, A. Kovalchuk, J. F. Martin, W. C. Nierman, J. G. Nijland, J. T. Pronk, J. A. Roubos, I. J. Van der Klei, N. N. M. E. Van Peij, M. Veenhuis, H. v. Döhren, C. Wagner, J. Wortman and R. A. L. Bovenberg (2008). "Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*." Nature Biotechnology **26**(10): 1161-1168.

van der Sluis, A. A., M. Dekker, A. de Jager and W. M. F. Jongen (2001). "Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**(8): 3606-3613.

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): 954-961.

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., K. Rigó, B. Tóth, J. Téren and Z. Kozakiewicz (2003). "Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins." Food Technology and Biotechnology **41**(1): 29-36.

Vilanova, L., N. Teixidó, R. Torres, J. Usall and I. Viñas (2014). "The infection capacity of *P. expansum* and *P. digitatum* on apples and histochemical analysis of host response." International Journal of Food Microbiology **157**(3): 360-367.

-W-

Waksman, S. A., E. S. Horning and E. L. Spencer (1942). "The production of two antibacterial substances, fumigacin and clavacin." Science **96**: 202-203.

Walton, J. D. (2000). "Horizontal gene transfer and the evolution of secondary metabolite gene clusters in fungi: an hypothesis." Fungal Genetics and Biology **30**(3): 167-171.

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.

Welke, J. E., M. Hoeltz, H. A. Dottori and I. B. Noll (2009). "Effect of processing stages of apple juice concentrate on patulin levels." Food Control **20**(1): 48-52.

Welke, J. E., M. Hoeltz, H. A. Dottori and I. B. Noll (2011). "Patulin accumulation in apples during storage by *Penicillium expansum* and *Penicillium griseofulvum* strains." Brazilian Journal of Microbiology **42**(1): 172-180.

White, S., J. O'Callaghan and A. D. W. Dobson (2006). "Cloning and molecular characterization of *Penicillium expansum* genes upregulated under conditions permissive for patulin biosynthesis." FEMS Microbiology Letters **255**(1): 17-26.

Whitlow, L. W. (2005). Molds and mycotoxins in feedstuffs-Prevention and treatment. Proceedings-Florida Ruminant Nutrition Symposium.

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.

Winkelhausen, E., R. Pospiech and G. Laufenberg (2005). "Antifungal activity of phenolic compounds extracted from dried olive pomace." Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia **24**(1): 41-46.

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." Applied and Environmental Microbiology **60**(7): 2408-2414.

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.

Woodward, R. B. and G. Singh (1950). "The structure of patulin." Experientia **6**(6): 238-240.

Wright, S. A. I., G. Ianiri, D. V. De Felice, R. Castoria and P. Berolini (2007). A rapid assay for patulin degradation by the basidiomycetous yeast *Rhodotorula glutinis* strain LS11. Novel approaches for the control of postharvest diseases and disorders. Proceedings of the International Congress, Bologna, Italy, 3-5 May, 2007., CRIOF, University of Bologna.

Wu, F. (2007). "Measuring the economic impacts of *Fusarium* toxins in animal feeds." Animal feed science and technology **137**(3): 363-374.

Wu, T.-S., Y.-C. Liao, F.-Y. Yu, C.-H. Chang and B.-H. Liu (2008). "Mechanism of patulin-induced apoptosis in human leukemia cells (HL-60)." Toxicology Letters **183**(1): 105-111.

Wu, Z., Y. Tsumura, G. Blomquist and X. R. Wang (2003). "18S rRNA gene variation among common airborne fungi, and development of specific oligonucleotide probes for the detection of fungal isolates." Applied and Environmental Microbiology **69**(9): 5389-97.

-Y-

Yao, C., W. S. Conway and C. E. Sams (1996). "Purification and characterization of a polygalacturonase produced by *Penicillium expansum* in apple fruit." Phytopathology **86**(11): 1160-1166.

Yazici, S. and Y. S. Velioglu (2002). "Effect of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride and calcium-d-pantothenate on the patulin content of apple juice concentrate." Food/Nahrung **46**(4): 256-257.

Yiannikouris, A. and J.-P. Jouany (2002). "Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review." Animal Research **51**(2): 81-100.

Yin, W. and N. P. Keller (2011). "Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism." The Journal of Microbiology **49**(3): 329-339.

Ying, X. and K. Ma (2011). "Characterization of a zinc-containing alcohol dehydrogenase with stereoselectivity from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus guaymasensis*." Journal of Bacteriology **193**(12): 3009-3019.

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

Yu, J.-H., R. A. E. 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): 549-555.

Yu, J., D. Bhatnagar and T. E. Cleveland (2004a). "Completed sequence of aflatoxin pathway gene cluster in *Aspergillus parasiticus*." FEBS Letters **564**(1-2): 126-30.

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 (2004b). "Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis." Applied and Environmental Microbiology **70**(3): 1253-1262.

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.

Yuan, Y., H. Zhuang, T. Zhang and J. Liu (2010). "Patulin content in apple products marketed in Northeast China." Food Control **21**(11): 1488-1491.

-Z-

Zaied, C., S. Abid, W. Hlel and H. Bacha (2013). "Occurrence of patulin in apple-based-foods largely consumed in Tunisia." Food Control **31**(2): 263-267.

Zain, M. E. (2011). "Impact of mycotoxins on humans and animals." Journal of Saudi Chemical Society **15**(2): 129-144.

Zhang, T., X. Sun, Q. Xu, L. G. Candelas and H. Li (2013). "The pH signaling transcription factor PacC is required for full virulence in *Penicillium digitatum*." Applied Microbiology and Biotechnology **97**(20): 9087-9098.

Zhou, S.-m., L.-p. Jiang, C.-y. Geng, J. Cao and L.-f. Zhong (2009). "Patulin-induced genotoxicity and modulation of glutathione in HepG2 cells." Toxicon **53**(5): 584-586.

Zhou, Y., W. Kong, Y. Li, A. F. Logrieco, J. Xu and M. Yang (2012). "A new solid-phase extraction and HPLC method for determination of patulin in apple products and hawthorn juice in China." Journal of Separation Science **35**(5-6): 641-649.

Zhu, R., T. Yu, S. Guo, H. Hu, X. Zheng and P. Karlovsky (2015). "Effect of the Yeast *Rhodosporidium paludigenum* on Postharvest Decay and Patulin Accumulation in Apples and Pears." Journal of Food Protection® **78**(1): 157-163.

Patulin, a mycotoxin of *Penicillium expansum*, the main apples postharvest pathogen: New data on its biosynthesis and development of preventive approaches

Supervised by: Dr. Isabelle OSWALD and Pr. Roger LTEIF

Among diseases affecting apples, blue mold caused by *Penicillium expansum* is a major concern causing yield and quality losses due to the production of mycotoxins, of which patulin is the most alarming one. This mycotoxin was proven to be harmful for humans and animals. The pathogen growth and the patulin production occur under specific physico-chemical conditions (temperature, pH…). However, the description of these conditions in literature remains largely insufficient for the development of strategies to fight the development of the fungus. Furthermore, patulin remains, along with ochratoxin A, the only toxins for which the biosynthetic pathway is not fully established yet at both chemical and molecular levels. Firstly, this study provides supplementary data on the physico-chemical factors that modulate *P. expansum* growth and its ability to produce patulin. The acquaintance of these conditions leads, in practice, to the control of the patulin contamination along the food chain. Secondly, significant improvements were brought on the fundamental level, especially by elucidating the patulin biosynthetic pathway. The cluster of genes involved in the biosynthesis of this mycotoxin was fully identified and characterized in the species of greatest concern *P. expansum*. In order to reveal additional info on the biosynthesis of this mycotoxin, the specific factor of the pathway (*patL*) was characterized. The disruption of this gene has led to failure in patulin production and an important decrease in *Pat* genes expression. Furthermore, pathogenesis studies, using this same deficient strain showed that patulin potentially acts as a virulence factor during *P. expansum* development on apples. The last step of the patulin biosynthetic pathway was later characterized by site-directed mutagenesis of the *patE* gene in the same species. This gene encodes a Glucose Methanol Choline (GMC) oxidoreductase that is responsible for the conversion of ascladiol to patulin. Ascladiol is not only the last intermediate in the patulin pathway but also the main product of patulin degradation during the alcoholic fermentation of apple juice. The non-toxicity of ascladiol accumulated by the Δ*patE* strain was proved against the human Caco-2 cell line. Finally a Real time PCR assay was developed to specifically detect and quantify *P. expansum*. This was done by targeting a highly specific gene from the patulin gene cluster in *P. expansum, patF.* This predictive approach allowed the quick estimation of the patulin content via the quantification of the *P. expansum* DNA in apples. To conclude, this thesis is part of the patulin's risk management study in the fruit sector; it provides significant improvements on both fundamental and practical levels. These advances are mainly characterized by the sequencing of the patulin gene cluster, the development of a molecular diagnostic tool and the demonstration of the non-cytotoxicity of ascladiol.

Keywords
Mycotoxins, patulin, ascladiol, *Penicillium expansum*, Biosynthetic pathway, gene cluster, *patL, patE,* apples, qPCR.

Discipline
Pathology, Toxicology, Genetic and Nutrition

Heading and address of the laboratory
National Institute for Agricultural Research - INRA
Research unit Toxalim - UMR 1331
Laboratory Biosynthesis and toxicity of mycotoxins
180, chemin de Tournefeuille - B.P. 93173
31027 Toulouse cedex 9 - France

Faculty of Sciences - Campus of Science and Technology, USJ
Analysis and Research Center
Riad El Solh - B.P. 11-514
2050 - 1107 Beirut Lebanon.

Patuline, mycotoxine de *Penicillium expansum,* principal pathogène post-récolte des pommes: Nouvelles données sur sa biosynthèse et développement d'approches préventives

Sous la direction de : Dr. Isabelle OSWALD et Pr. Roger LTEIF

La pourriture bleue causée par *Penicillium expansum* est l'une des maladies les plus dommageables des fruits *pomaceae* (pommes et poires). Outre des dégâts directs, cette maladie pose un problème de santé publique car l'agent pathogène produit des mycotoxines nocives pour l'homme et les animaux dont la plus sérieuse est la patuline. La croissance du champignon pathogène et la production de patuline requièrent des conditions physico-chimiques particulières. Les informations existantes à ce propos demeurent cependant modestes et insuffisantes pour envisager de développer des moyens de lutte contre l'apparition du champignon. Par ailleurs, la patuline reste avec l'ochratoxine A, les seules toxines dont la voie de biosynthèse n'a pas encore été complètement établie, tant sur le plan chimique que moléculaire. Cette étude apporte dans un premier temps des données complémentaires sur les facteurs physico-chimiques (température, pH….) qui conditionnent la croissance de *P. expansum* de même que sa capacité à produire la patuline. La connaissance de ces besoins et de ces conditions conduit en pratique à lutter et contrôler la contamination par la patuline tout le long de la chaine alimentaire. Dans un deuxième temps, cette thèse apporte des améliorations spectaculaires sur le plan fondamental, en termes d'élucidation de la voie de biosynthèse de la patuline. Le cluster des gènes impliqués dans la biosynthèse de cette mycotoxine chez l'espèce la plus préoccupante *P. expansum* a été entièrement identifié et caractérisé. Pour lever encore plus le voile sur la biosynthèse de cette mycotoxine, la caractérisation du facteur de régulation spécifique de cette voie (*patL*) a été également établie. Une perturbation de ce gène a provoqué une incapacité de production de patuline et une sévère diminution de l'expression des gènes *Pat*. De même, grâce à ce mutant déficient, il a été montré que la patuline pourrait agir comme facteur de virulence lors du développement de la moisissure dans les pommes. La caractérisation de la dernière étape de la voie de biosynthèse de la patuline a ensuite été entreprise par mutagenèse dirigée du gène *patE* du cluster de la patuline, chez la même espèce. Ce dernier code pour une Glucose méthanol Choline (GMC) oxydoréductase responsable de la conversion de l'ascladiol en patuline. L'ascladiol est également une molécule clé de la dégradation de la patuline par diverses espèces bactériennes ou de levures et plus particulièrement lors de la fermentation alcoolique. La non-toxicité de l'ascladiol accumulé chez le mutant Δ*patE* a été démontrée sur une lignée cellulaire intestinale humaine (Caco-2), suggérant que la patuline perd sa toxicité avec l'ouverture du deuxième cycle. Finalement, un système de détection et de quantification de *P. expansum* par PCR en temps réel a été développé en ciblant un gène hautement spécifique de la voie de biosynthèse de la patuline, *patF*. Cette approche préventive nous a ainsi permis d'avoir une estimation rapide de la contamination en patuline dans les pommes à partir de la quantification d'ADN de *P. expansum*. En conclusion, l'ensemble de ces travaux qui s'inscrivent dans le cadre de la gestion du risque « patuline » dans la filière fruit a permis d'amener des réponses tant sur le plan fondamental que sur le plan appliqué avec le séquençage du cluster, le développement d'un outil de diagnostic et la démonstration que l'ascladiol ne présentait aucune cytotoxicité.

Mots clés
Mycotoxines, patuline, ascladiol, *Penicillium expansum*, voie de biosynthèse, cluster de gènes, *patL, patE,* pommes, qPCR.

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.