



**HAL**  
open science

# Etude de la diversité structurale et fonctionnelle au sein de l'espèce *Penicillium roqueforti*

Guillaume Gillot

► **To cite this version:**

Guillaume Gillot. Etude de la diversité structurale et fonctionnelle au sein de l'espèce *Penicillium roqueforti*. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2015. Français. NNT : 2015BRES0081 . tel-01998731

**HAL Id: tel-01998731**

**<https://theses.hal.science/tel-01998731v1>**

Submitted on 29 Jan 2019

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

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

**THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**  
*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

pour obtenir le titre de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**  
Mention : Biologie-Santé  
Spécialité : Microbiologie  
École Doctorale SICMA

présentée par

**Guillaume Gillot**

Préparée au Laboratoire Universitaire de  
Biodiversité et Ecologie Microbienne (EA 3882)

Etude de la diversité  
structurale et fonctionnelle  
au sein de l'espèce  
**Penicillium roqueforti**

**Thèse soutenue le 7 décembre 2015**  
devant le jury composé de :

**Philippe SILAR**  
Professeur, Université Paris Diderot / *Rapporteur*

**Henry-Eric SPINLER**  
Professeur, AgroParisTech / *Rapporteur*

**Tatiana GIRAUD**  
Directrice de Recherche, CNRS, Orsay / *Examinatrice*

**Jérôme MOUNIER**  
Professeur, Université de Brest / *Examineur*

**Emmanuel COTON**  
Professeur, Université de Brest / *Directeur de thèse*



« The important thing is not to stop questioning. Curiosity has its own reason for existing. One cannot help but be in awe when he contemplates the mysteries of eternity, of life, of the marvelous structure of reality. It is enough if one tries merely to comprehend a little of this mystery every day. Never lose a holy curiosity. »

**Albert Einstein (1879-1955)**





## REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à adresser mes plus sincères remerciements aux membres du jury pour avoir accepté de lire, commenter et évaluer mes travaux de recherche.

Je souhaite également remercier les co-financeurs de mon projet : le Ministère de *l'Education, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche ainsi que le CNIEL, sans qui ce projet de thèse n'aurait très vraisemblablement jamais pu être mené.*

*J'en profite également pour remercier une nouvelle fois la FIL France pour m'avoir attribué la bourse 2014 qui m'a offert l'opportunité de participer au congrès mondial de la FIL 2015 et m'a permis de me faire une idée plus précise du fonctionnement de la filière laitière.*

Je remercie le *professeur Emmanuel Coton, directeur du LUBEM, pour m'avoir à la fois accueilli au sein de son laboratoire et pour avoir dirigé cette thèse. Merci pour l'optimisme dont vous avez fait preuve et que vous avez essayé de me transmettre en particulier lorsque les heures étaient comptées.*

Je voudrais également remercier chaleureusement mes encadrants, les docteurs Monika Coton et Jean-Luc Jany, *pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce sujet et pour m'avoir fait confiance. Merci pour tout ce que vous m'avez appris et tout le temps que vous m'avez consacré malgré vos emplois du temps chargés. Merci pour votre aide tout au long de ces trois ans et en particulier pour les nombreuses relectures et corrections concernant les articles ou ce manuscrit. J'espère avoir été à la hauteur.*

Je tiens également à remercier les personnes avec qui nous avons collaboré et qui ont ainsi contribué de manière non négligeable à la réalisation et à la valorisation de ces travaux de recherche. Je pense à Tatiana Giraud, Jöelle Dupont, Jeanne Ropars ou encore Antoine Branca. Un grand merci également à Anne Thierry, Marie-Bernadette Maillard et Valérie Gagnaire pour votre gentillesse et pour votre accueil lorsque je suis *venu au STLO. J'ai également une pensée toute particulière pour Ricardo Vicente Ullán et mes amis espagnols, Rebeca, Vanesa et Antonio. Merci d'avoir pris du temps lors de ces deux mois passés à León pour me faire apprécier la vie à l'espagnole.*

Enfin, après *plus de trois ans passés ici et malgré mon goût pour le changement, c'est non sans émotion que je souhaiterais remercier tous ceux que j'ai côtoyés au cours de ces années passées au LUBEM.*

Je souhaiterais remercier tout particulièrement Stella et Christophe. Merci pour votre gentillesse et votre disponibilité de tous les instants. Merci à Marielle pour son aide dans la réalisation de toutes les tâches administratives et en particulier les commandes de dernière minute. Je voudrais également remercier chaleureusement Marie-Hélène pour son énergie à revendre, sa gentillesse et son humour.

Et comment ne pas remercier les membres du bureau 202 passés ou présents : Lucille, Marie-Caroline, Marlène et Nicolas. *Merci pour m'avoir écouté me plaindre à longueur de journée, vous étiez un peu mes psy' lorsque j'avais besoin d'exprimer mon humeur du moment. J'espère quand même ne pas trop vous avoir ennuyé. J'espère aussi que je vous aurais bien fait rire avec ma surdité précoce ou mes brefs pétages de plomb, surtout le vendredi. En tout cas, bon courage pour la suite même si je ne me fais pas beaucoup de souci pour vous.*

*J'ai aussi une pensée pour tous les joueurs du Spartak LUBEM, pour leur persévérance malgré le peu de victoires engrangées. Je pense en particulier à Jean-Luc (et ses frappes enroulées pas toujours très bien ajustées), Franck (et ses quelques boulettes de gardien qui nous ont bien fait rire), Kévin (alias le sanglier, qui arrache tout sur son passage) et Loïc (qui reste planté devant et nous explique comment jouer).*

*Je souhaiterais également remercier tous ceux que je n'ai pas encore cités, qui ont participé de près ou de loin à cette aventure et qui ont contribué à la bonne ambiance en particulier lors de l'institutionnelle pause-café. Merci à Adeline, Amélie, Angélique, Anne-Cécile, Antoine, Audrey, Céline, Dorothée, Elisabeth, Emilie, Fabienne, Florence, Florian, Gaëtan B, Gaëtan LF, Jasmine, Jérôme, Josiane, Karim, Laurence, Nolwenn, Pedro, Sophie, Stéphanie M, Stéphanie M-S, Sylvie, Valérie et Vanessa.*

*Un grand merci à ma famille qui n'a pas toujours tout compris de ce que je faisais mais qui m'a toujours soutenu et a cru en moi. Merci à mes amis les plus proches, ils se reconnaîtront, même si je suis obligé de te remercier, toi, Clément pour ton amitié sans faille et tous les bons moments passés depuis maintenant plusieurs années.*

*Enfin, un grand merci à toi, Leslie, qui a toujours été là pour moi, m'a écouté et soutenu dans les moments difficiles. Tu m'as permis de relativiser et de me recentrer sur l'essentiel. Tu sais tout ce que je pense de toi, de nous... Merci pour tout.*

# SOMMAIRE

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>5</b>
<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>7</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b> .....	<b>9</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>13</b>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>19</b>
<b>1. Les champignons</b> .....	<b>24</b>
1.1. Structure .....	24
1.2. Croissance .....	26
1.3. Reproduction .....	27
1.4. Modes de vie .....	28
1.5. Taxonomie fongique .....	29
1.6. Phylogénie.....	34
1.6.1. Le concept d'espèce biologique .....	35
1.6.2. Le concept d'espèce morphologique.....	35
1.6.3. Le concept d'espèce phylogénétique.....	36
1.6.4. La reconnaissance d'espèces phylogénétiques par la concordance généalogique (GC-PSR).....	37
1.7. Champignons et fermentations alimentaires .....	39
1.8. Fermentations alimentaires et domestication .....	40
<b>2. Les fromages</b> .....	<b>42</b>
2.1. Histoire et origines du fromage .....	42
2.2. La diversité fromagère .....	45
2.3. Les fromages à pâte molle persillée .....	48
2.3.1. Préparation du lait .....	49
2.3.2. Coagulation .....	51
2.3.3. Egouttage.....	53
2.3.4. Salage .....	54
2.3.5. Affinage.....	55
<b>3. Penicillium roqueforti Thom</b> .....	<b>60</b>
3.1. Synonymie.....	60
3.2. Morphologie .....	60
3.3. Ecologie.....	62
3.4. Taxonomie.....	63
3.5. Physiologie .....	64
3.6. Participation au processus d'affinage des fromages à pâte persillée .....	66
3.6.1. Lipolyse.....	67
3.6.2. Protéolyse et dégradation des acides aminés.....	70
3.6.3. Production d'arômes .....	73
3.7. Production de métabolites secondaires et de mycotoxines .....	75
3.7.1. Dosages dans les matrices alimentaires .....	77
3.7.2. Données toxicologiques .....	80
3.7.3. Voie de biosynthèse de la roquefortine C .....	81
3.7.4. Voie de biosynthèse de la PR toxine .....	85

3.7.5. Voie de biosynthèse de l'acide mycophénolique .....	86
<b>RESULTATS .....</b>	<b>89</b>
<b>DISCUSSION &amp; CONCLUSIONS .....</b>	<b>241</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>253</b>
<b>VALORISATIONS SCIENTIFIQUES .....</b>	<b>275</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>285</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### Figures

<b>Figure 1</b> : Arbre phylogénétique universel du vivant.....	22
<b>Figure 2</b> : Arbre phylogénétique du vivant basé sur la comparaison de 31 loci conservés de 191 espèces.....	23
<b>Figure 3</b> : Phylogénie consensus des principaux groupes constituant le domaine des eucaryotes .....	24
<b>Figure 4</b> : Photographies réalisées en Microscopie Electronique à Balayage présentant les changements morphologiques de <i>Candida viswanathii</i> .....	25
<b>Figure 5</b> : Structure pariétale et membranaire fongique.....	26
<b>Figure 6</b> : Cycle de reproduction sexuée et asexuée chez les champignons .....	27
<b>Figure 7</b> : Classification du règne des Champignons.....	30
<b>Figure 8</b> : Incertitude concernant les limites d'espèces dans une généalogie à un seul gène .	37
<b>Figure 9</b> : Principe de la GC-PSR .....	37
<b>Figure 10</b> : Schéma didactique présentant les différentes variétés de fromage en termes de technologie et de caractéristiques microbiologiques.....	47
<b>Figure 11</b> : Aperçu des différentes voies de biosynthèses menant à la production de composés aromatiques volatiles lors de l'affinage .....	57
<b>Figure 12</b> : Exemple des différences de couleur observables entre six souches de <i>Penicillium roqueforti</i> .....	59
<b>Figure 13</b> : Morphologies de deux isolats de <i>Penicillium roqueforti</i> .....	61
<b>Figure 14</b> : Présentation des différents éléments constituant un pinceau de <i>Penicillium roqueforti</i> .....	62
<b>Figure 15</b> : Représentation des relations phylogénétiques au sein du genre <i>Penicillium</i> divisé en 25 sections .....	64
<b>Figure 16</b> : Effet du O <sub>2</sub> et CO <sub>2</sub> sur la réponse physiologique de <i>Penicillium roqueforti</i> .....	66
<b>Figure 17</b> : Photographies de <i>Penicillium roqueforti</i> réalisées en Microscopie Electronique à Balayage .....	67
<b>Figure 18</b> : Voies de dégradation possibles des acides gras.....	68
<b>Figure 19</b> : Voies de dégradation au cours de la protéolyse et du catabolisme des acides aminés durant l'affinage des fromages .....	71
<b>Figure 20</b> : Structures de différents métabolites secondaires produit par <i>Penicillium roqueforti</i> .....	77
<b>Figure 21</b> : Cluster de gène impliqué dans la biosynthèse de la roquefortine C menant à la méléagrine chez <i>P. chrysogenum</i> .....	82
<b>Figure 22</b> : Voie de biosynthèse de la roquefortine C menant à la méléagrine, la néoxaline et d'autres roquefortines.....	83
<b>Figure 23</b> : Voie de biosynthèse de la roquefortine C chez <i>P. roqueforti</i> comparée à celle de la roquefortine/méléagrine décrite précédemment chez <i>P. chrysogenum</i> .....	84
<b>Figure 24</b> : Voie de biosynthèse de la PR toxine .....	86
<b>Figure 25</b> : Cluster de gènes impliqués dans la biosynthèse de l'acide mycophénolique chez <i>P. chrysogenum</i> .....	87
<b>Figure 26</b> : Proposition de voie de biosynthèse de l'acide mycophénolique .....	88

## Tableaux

<b>Tableau 1</b> : Les grands types d'interactions entre deux organismes.....	28
<b>Tableau 2</b> : Estimations de la diversité des espèces fongiques .....	31
<b>Tableau 3</b> : Fromages à pâte persillée bénéficiant d'une AOP ou IGP .....	48
<b>Tableau 4</b> : Evolution des paramètres physico-chimiques durant l'affinage du Valdeón, un fromage à pâte persillée espagnol .....	56
<b>Tableau 5</b> : Concentrations en acides gras libres retrouvées au niveau de différents fromages .....	69
<b>Tableau 6</b> : Principales enzymes produites par <i>P. roqueforti</i> impliquées dans la protéolyse et le catabolisme des acides aminés durant l'affinage .....	73
<b>Tableau 7</b> : Principales méthyl-cétones présentes dans les fromages à pâte persillée.....	74
<b>Tableau 8</b> : Concentration totale des principaux groupes de composés aromatiques retrouvés au sein de différents fromages à pâte persillée.....	75
<b>Tableau 9</b> : Exemples de mycotoxines détectées dans les fromages .....	78
<b>Tableau 10</b> : Exemples de mycotoxines détectées dans les ensilages .....	78
<b>Tableau 11</b> : Données toxicologiques de l'acide mycophénolique, la roquefortine C et la PR toxine.....	80

## ABREVIATIONS

- 5-MOA** : acide 5-méthylorsellinique
- ADN** : acide désoxyribonucléique
- AGL** : Acides Gras Libres
- AOC** : Appellation d'Origine Contrôlée
- AOP** : Appellation d'Origine Protégée
- ARN** : acide ribonucléique
- C/N** : ratio Carbone/Azote
- CLSA** : Closed-Loop Stripping Apparatus
- CMP** : CaséinoMacroPeptide
- CNIEL** : Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière
- CREA** : Creatine Sucrose Agar
- CSN** : Creatine Sucrose Neutral agar
- CYA** : Czapek Yeast Agar
- DHMB** : acide 6-dihydroxy-2-(hydroxyméthyl)-3-méthylbenzoïque
- DHMP** : 5,7-dihydroxy-4-méthylphthalide
- DHTD** : déhydrohistidyltryptophanyldicétopipérazine
- DMAPP** : diméthylallyl-pyrophosphate
- DMMPA** : acide deméthylmycophénolique
- EFSA** : European Food Safety Authority
- FAO** : Food and Agriculture Organization
- FDA** : Food and Drug Administration
- FDHMP** : 6-farnésyl-5,7-dihydroxy-4-méthylphthalide
- FPP** : Farnesyl-pyrophosphate
- G25N** : Glycérol (25 %) Nitrate Agar
- GC-MS** : Gas chromatography - Mass Spectrometry
- GC-PSR** : Genealogical Concordance - Phylogenetic Species Recognition
- GRAS** : Generally Recognized As Safe
- HTD** : Histidinytryptophanyldiketopiperazine
- IC50** : Inhibition Concentration 50
- ICBN** : International Code of Botanical Nomenclature
- ICN** : International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants



**IGP** : Indication Géographique Protégée  
**ITS** : Internal Transcribed Spacer  
**LD50** : Lethal Dose 50  
**MEA** : Malt Extract Agar  
**MEB** : Microscopie Electronique à Balayage  
**NRPS** : Non-Ribosomal Peptide Synthetase  
**OGM** : Organisme Génétiquement Modifié  
**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé  
**PKS** : Polyketide synthase  
**PCC** : Pressed Cooked Cheese  
**PFC** : Pasta Filata Cheese  
**PNCC** : Pressed Non-Cooked Cheese  
**PSCC** : Pressed Semi-Cooked Cheese  
**QPS** : Qualified Presumption of Safety  
**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire  
**SAM** : S-Adénosyl Méthionine  
**TNBS** : 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid  
**YES** : Yeast Extract Sucrose

# **INTRODUCTION GENERALE**



Les produits fermentés constituent, dans un grand nombre de pays dont la France, une partie non négligeable de l'alimentation humaine mais également du patrimoine culturel car produits de manière ancestrale (yaourts, fromages, vins, bières, etc.). Lors des processus de fermentation, les micro-organismes occupent un rôle central et contribuent de manière prépondérante au développement des caractéristiques organoleptiques des aliments concernés. De nos jours, ces derniers sont très souvent inoculés dans le produit de manière délibérée (fermentation dirigée) même si dans certains cas, et en particulier pour des productions plus artisanales, des micro-organismes provenant de l'environnement de production peuvent être impliqués dans les processus de fermentation. A ce jour, les micro-organismes utilisés dans les aliments fermentés sont considérés comme des ingrédients et leur utilisation n'est que peu réglementée. C'est dans ce cadre que la commission européenne, via l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), a défini depuis 2007 un statut concernant les micro-organismes utilisés en alimentation humaine ou animale. Ce statut de « présomption d'innocuité reconnue » ou QPS (Qualified Presumption of Safety) se rapproche dans l'esprit du statut GRAS (Generally Recognized As Safe) mis en place aux Etats-Unis par la Food and Drug Administration (FDA) même si les démarches employées sont très différentes (liste positive d'espèces dans le premier cas, démonstration d'innocuité dans une application dans le deuxième cas). Ainsi, le groupe scientifique de l'EFSA s'intéressant aux dangers biologiques (groupe BIOHAZ) est chargé de mettre à jour la liste QPS en évaluant l'innocuité des agents biologiques en fonction de quatre critères : (i) la définition du groupe taxonomique, (ii) l'ensemble des connaissances disponibles sur un micro-organisme, (iii) les éventuels problèmes d'innocuité et (iv) prend également en compte l'utilisation prévue. Depuis 2007, un grand nombre de micro-organismes se sont donc vu attribuer ce statut QPS qui concernait à l'origine tous les agents biologiques (bactéries, champignons ou virus). Cependant, durant plusieurs années certains champignons filamenteux utilisés en agroalimentaire (par exemple *Penicillium camemberti*, *P. nalgioense* ou *P. roqueforti*) n'avaient pas ce statut QPS en particulier du fait du potentiel de production de certains métabolites secondaires. Depuis 2014, ces champignons filamenteux, ont été exclus des activités d'évaluation QPS, l'EFSA ayant conclu que « les connaissances actuelles sur un historique d'utilisation sûre ne sont pas suffisamment documentées ».

C'est dans ce contexte de besoin d'amélioration des connaissances sur le champignon *P. roqueforti*, pourtant utilisé de manière ancestrale et dont le bénéfice sur la qualité organoleptique des fromages à pâte persillée n'est plus à prouver, que s'inscrivent ces travaux. Les fromages à pâte persillée, fabriqués et consommés dans un grand nombre de pays à travers le monde, constituent une vaste famille de fromages élaborés à partir de laits, principalement

de vache, de brebis, de chèvre voire de bufflonne, utilisés seuls ou en mélange dont le cœur est veiné de spores de couleur vert-bleu et de mycélium du champignon filamenteux *Penicillium roqueforti*. La fabrication des fromages à pâte persillée implique classiquement une inoculation du lait par une ou plusieurs souches de *P. roqueforti* et c'est lors de la période d'affinage que le champignon filamenteux va grandement participer au développement des qualités organoleptiques très caractéristiques de ce type de fromages.

Cependant, comme évoqué précédemment, malgré une utilisation et une consommation ancestrale, et un bénéfice avéré sur la qualité organoleptique des fromages à pâte persillée, un manque de connaissances persiste que ce soit au niveau génétique ou fonctionnel concernant cette espèce.

Par exemple, d'un point de vue taxonomique, *P. roqueforti* est actuellement reconnue comme une seule espèce bien que plusieurs dénominations aient été attribuées à différentes souches technologiques. Ainsi, certains noms d'espèces erronés et variables selon le producteur de ferment comme *P. glaucum*, *P. gorgonzolae* ou encore *P. stilton* sont parfois encore employés pour désigner des souches de *P. roqueforti*, ces différents noms traduisant généralement des différences phénotypiques et en particulier morphologiques.

Dans le cadre de cette thèse, il nous apparaissait donc comme primordial de clarifier dans un premier temps la position taxonomique de *P. roqueforti*, correspondant d'ailleurs au premier pilier de la démarche QPS. Pour cela, une vaste collection d'isolats de *P. roqueforti* issus principalement de fromages à pâte persillée du monde entier a tout d'abord été mise en place. Consécutivement, une étude morphologique impliquant l'utilisation de différents milieux de culture classiquement utilisés dans le but de différencier les représentants du genre *Penicillium* a été réalisée et a permis de mettre en évidence une diversité morphologique relativement importante, soulevant la question de l'existence de plusieurs espèces au sein de *P. roqueforti*. Dans ce contexte, la méthode GC-PSR (Genealogical Concordance - Phylogenic Species Recognition) (Taylor et al., 2000), basée sur la comparaison de phylogénies distinctes construites après analyse des séquences de différents gènes, a été utilisée afin de fixer les limites d'espèces. Une fois les limites de l'espèce *P. roqueforti* fixées, une étude de la diversité intraspécifique basée sur l'utilisation de marqueurs microsatellites a été menée.

Afin d'évaluer la diversité fonctionnelle des isolats de la collection, un criblage d'isolats préalablement sélectionnés sur une base génétique a par la suite été réalisé en s'intéressant plus particulièrement à la production de métabolites secondaires (incluant les arômes et les mycotoxines) ainsi qu'aux activités protéolytiques et lipolytiques. L'existence potentielle de liens entre diversités génétique et fonctionnelle a également été évaluée. Enfin, en lien avec les

résultats présentant la diversité fonctionnelle, la voie de biosynthèse de l'acide mycophénolique, mycotoxine potentiellement produite par *P. roqueforti* mais également décrite comme ayant des propriétés immunosuppressives et non élucidée à ce jour chez cette espèce, a été étudiée.



## **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**





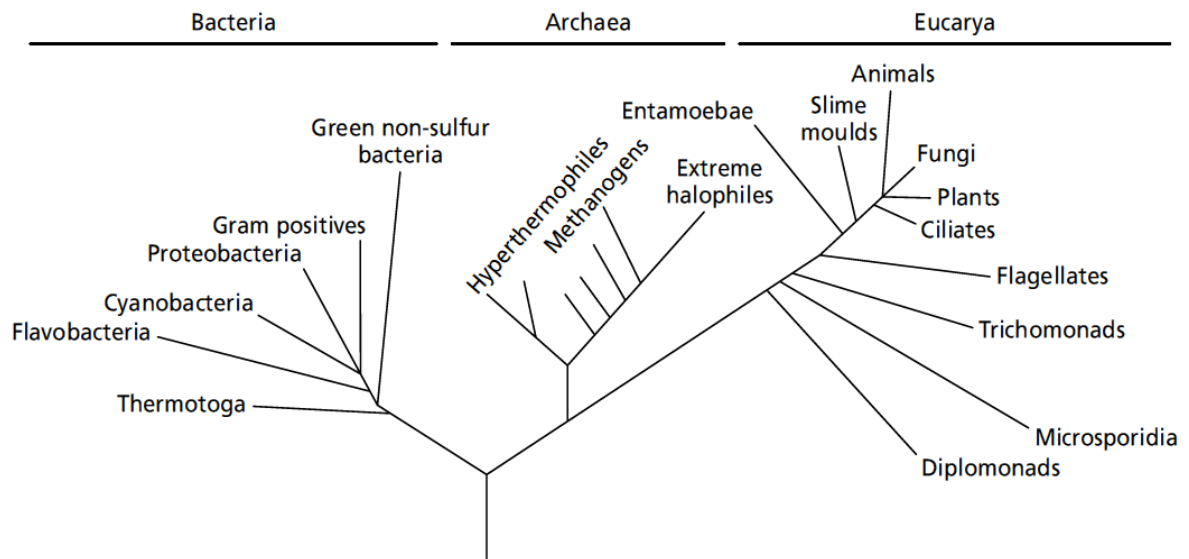
Notre connaissance du monde vivant s'améliorant continuellement, la taxonomie de ce dernier n'a cessé d'évoluer et continue de s'affiner. Caractérisé par une impressionnante diversité, le monde du vivant fut dès le 18<sup>ème</sup> siècle divisé en deux règnes par Carl Linnaeus, ce dernier distinguant les animaux des plantes. A cette époque, les champignons étaient considérés comme des plantes dépourvues de chlorophylle. Ce n'est qu'à la fin du 18<sup>ème</sup> siècle qu'un botaniste français, Jean-Jacques Paulet, définit, à travers son *Traité sur les champignons* (Paulet, 1793), la science du champignon comme étant la mycologie. Pour la première fois, le groupe des champignons est donc reconnu même si ces derniers restent à cette époque encore considérés comme des végétaux.

Dès 1866, Haeckel propose quant à lui de découper le monde vivant en trois règnes : animal, végétal et protistes (Haeckel, 1894, 1866), les champignons étant toujours classés parmi les végétaux du fait de la présence d'une paroi cellulaire, de l'absence de mobilité ou encore de plusieurs similitudes entre leurs cycles de reproduction et ceux des algues.

Mais en 1959, bien que le concept de Fungi, comme un des six règnes du vivant selon la répartition actuelle, fut introduit par Jahn & Jahn (1949), c'est bien Whittaker (1959) qui avance un découpage en quatre (animal, champignon, végétal et protistes) puis cinq règnes (animal, champignon, végétal, protistes et monères) et surtout reconnaît les champignons comme appartenant à un règne distinct (Whittaker, 1969).

Sur la base du séquençage de l'ADN et de la comparaison de séquences des gènes codant les ARN ribosomiques 16S, Woese et Fox (1977) permettront par la suite de subdiviser le règne des monères en archéobactéries et eubactéries, marquant par la même occasion l'avènement de la phylogénie moléculaire.

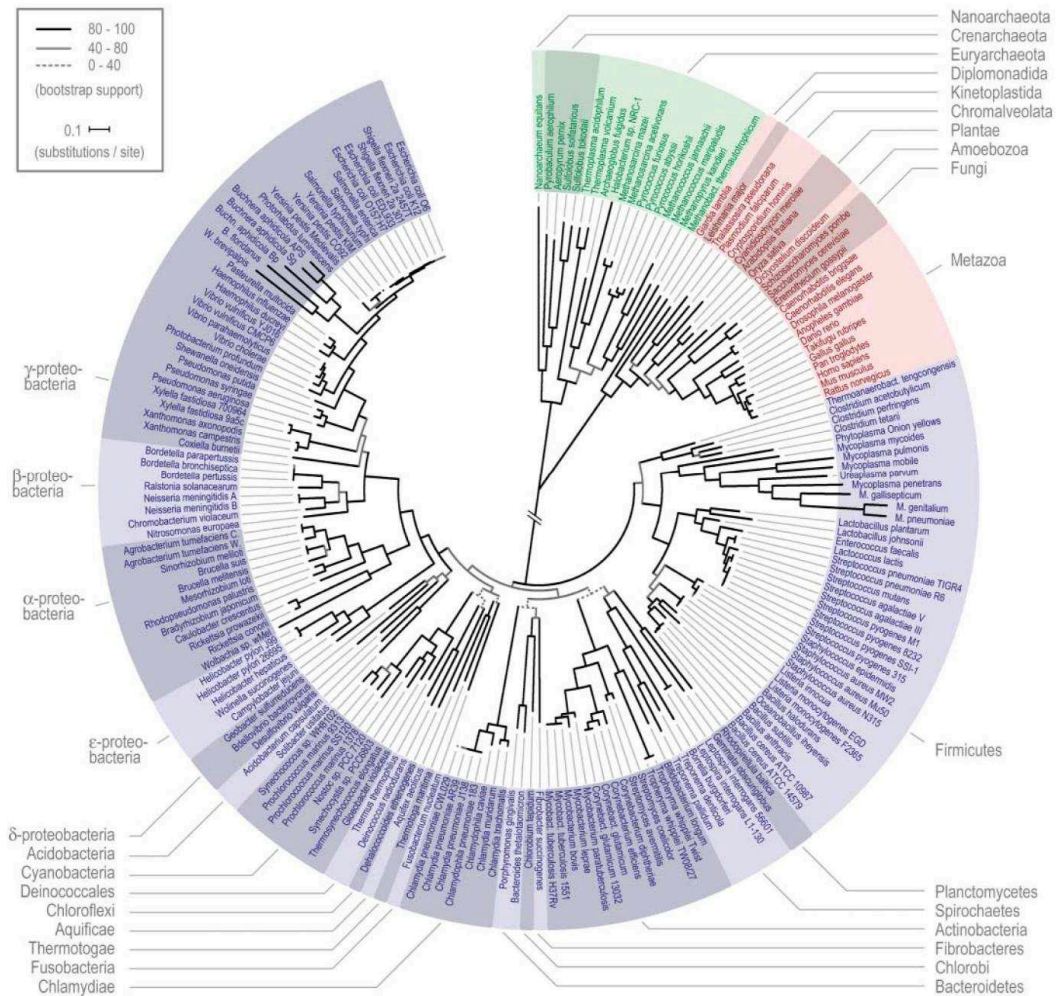
Et c'est le même Woese qui treize ans plus tard posera les bases du système actuel découpant le vivant en trois domaines : eucaryotes (Eucarya), archées (Archaea) et bactéries (Bacteria) (Woese et al., 1990) (**Figure 1**).



**Figure 1 : Arbre phylogénétique universel du vivant (d’après Deacon, 2006 sur la base de Woese, 2000 et Woese et al., 1990).**

Cavalier-Smith proposera quant à lui un regroupement en deux empires (eucaryotes et procaryotes) et six règnes : animal, champignon, végétal, chromistes, protozoaires et bactéries (Cavalier-Smith, 2004, 1998).

Plus récemment, des travaux basés sur des analyses phylogénétiques multi-loci ont permis de confirmer la classification du vivant en trois domaines et d’affiner le positionnement taxonomique de certains groupes (Ciccarelli et al., 2006). La **Figure 2**, présentée ci-après, permet de visualiser ces trois domaines ainsi que la place des Fungi dans le monde du vivant.



**Figure 2 : Arbre phylogénétique du vivant basé sur la comparaison de 31 loci conservés de 191 espèces (d’après Ciccarelli et al., 2006). En vert le domaine des Archaea, en rouge le domaine des Eukarya et en bleu celui des Bacteria.**

En ce qui concerne le domaine des eucaryotes, il comporterait 8 groupes dont celui des opisthokontes au sein duquel sont retrouvés les Fungi (**Figure 3**) (Baldauf, 2008).

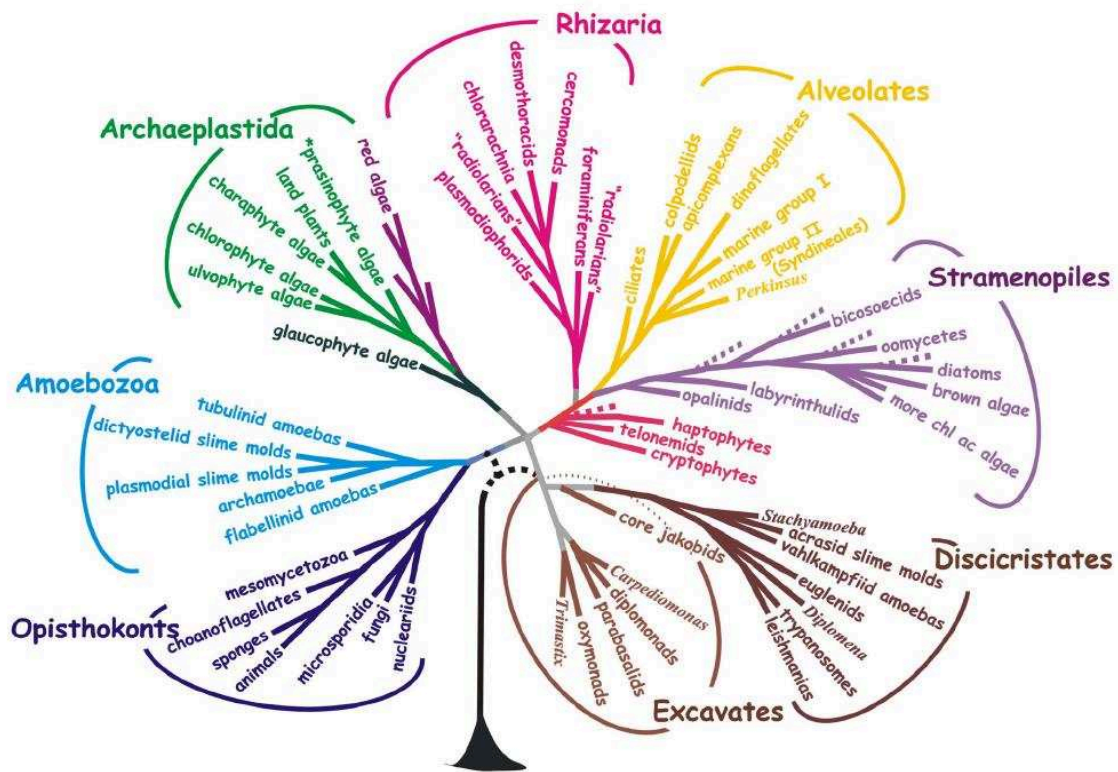
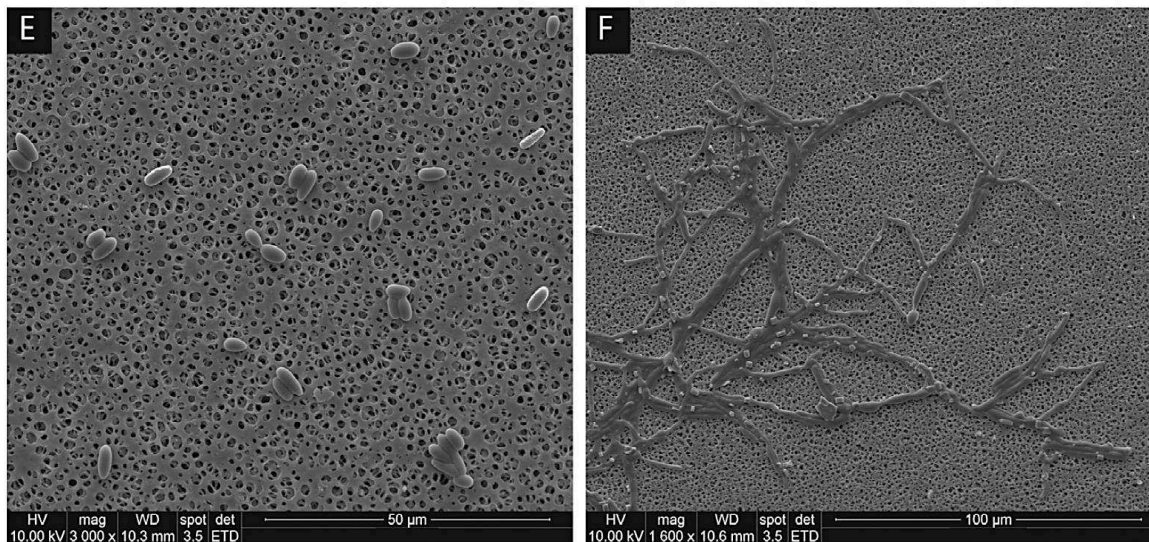


Figure 3 : Phylogénie consensus des principaux groupes constituant le domaine des eucaryotes (d'après Baldauf, 2008).

## 1. Les champignons

### 1.1. Structure

Chez les champignons, on distingue les formes mycéliennes, pluricellulaires, des formes levures, unicellulaires. Certaines espèces sont cependant dimorphes, c'est-à-dire capables de former des hyphes ou pseudo-hyphes ou bien de passer d'une forme pluricellulaire filamenteuse à une forme levure bourgeonnante selon les conditions environnementales. Ce phénomène a, par exemple, déjà été décrit chez *Candida albicans* (Sudbery, 2011), *Mucor circinelloides* (McIntyre et al., 2002) ou encore *Candida viswanathii* (Burgaud et al., 2015) (**Figure 4**).



**Figure 4 : Photographies réalisées en Microscopie Electronique à Balayage (MEB) présentant les changements morphologiques de *Candida viswanathii* en réponse à une variation de pression, de 0,1 MPa (E) à 24,5 MPa (F) (adapté de Burgaud et al., 2015).**

La cellule fongique est constituée d'une paroi, d'une membrane plasmique, d'un cytoplasme contenant de nombreux organites (mitochondries, ribosomes, réticulum endoplasmique ou appareil de Golgi, notamment), de vacuoles et d'un noyau.

Le mycélium des champignons filamenteux peut être retrouvé sous différentes formes. En effet, les hyphes peuvent être septées ou coenocytiques, c'est-à-dire comporter des cloisons ou non. En taxonomie, cette particularité permet de distinguer les champignons dits « inférieurs » (coenocytiques) des champignons dits « supérieurs » (septés).

Une des particularités très importantes des champignons est également de posséder une paroi. Celle-ci leur a d'ailleurs valu d'être très longtemps considérés comme des plantes de par sa similitude structurelle avec la paroi des végétaux. Cependant, leurs compositions chimiques sont différentes. En effet, la paroi cellulaire fongique est composée de microfibrilles de chitine (homopolymère de N-acétylglucosamine lié en  $\beta$ -1,4) associé à des polymères de glucose ( $\beta$ -1,3 glucanes liés de manière covalente à des  $\beta$ -1,6 glucanes), tandis que la paroi cellulaire des plantes est, quant à elle, principalement composée de cellulose, laquelle est un polymère de D-glucose caractérisé par des liaisons  $\beta$ -1,4. La structure pariétale est commune aux représentants du règne fongique (**Figure 5**). Cependant, les proportions et la répartition des différents éléments peuvent varier. La chitine est par exemple retrouvée en quantité plus importante au niveau de la paroi des champignons filamenteux comparativement à celle des levures. Egalement, les membranes des cellules fongiques possèdent un unique stérol, l'ergostérol,

lequel remplace le cholestérol présent au niveau des membranes cellulaires des mammifères (Figure 5).

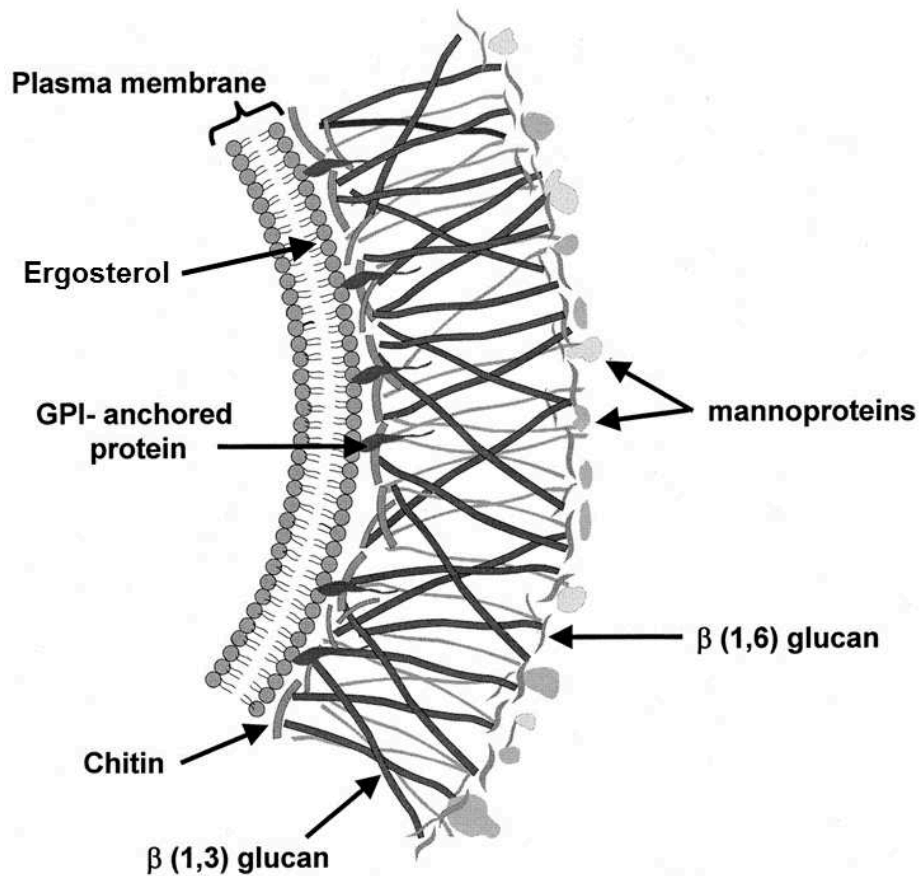


Figure 5 : Structure pariétale et membranaire fongique (d'après Selitrennikoff, 2001).

## 1.2. Croissance

Les champignons étant typiquement non mobiles, à l'exception de certains d'entre eux (e.g. chytrides) qui possèdent une phase mobile au cours de leur vie (spores flagellées), la croissance apicale est un des seuls moyens de conquête de nouveaux espaces. La croissance des champignons filamenteux se fait par élévation au niveau de l'apex des hyphes où la paroi est plus fine (Deacon, 2006). L'ensemble des hyphes ainsi formées donne naissance au thalle ou mycélium. Le mycélium assure trois fonctions principales : la croissance, la sécrétion d'enzymes capables de dégrader la matière organique et l'absorption d'éléments nécessaires à la croissance et à la nutrition par osmotrophie.

Les levures, champignons unicellulaires, se divisent pour la plupart par bourgeonnement ou fission cellulaire (Mata and Nurse, 1998) (Pour plus de détails sur les processus impliqués dans la croissance, voir Deacon, 2006).



### 1.3. Reproduction

Les champignons ont la particularité d'être majoritairement haploïdes durant leur cycle de vie, excepté lors de la reproduction sexuée. On distingue deux types de reproduction chez les champignons, asexuée et sexuée. La forme asexuée est appelée l'anamorphe tandis que la forme sexuée désigne le téléomorphe, le terme holomorphe désignant l'entité globale (formes asexuée et sexuée).

Le cycle sexué comprend généralement trois phases : la plasmogamie, la caryogamie et la méiose. Chez les champignons supérieurs, tout débute par la plasmogamie qui correspond à la fusion cytoplasmique de deux cellules haploïdes formant ainsi un mycélium secondaire possédant deux noyaux, et donc dit dikaryotique. Par la suite, ce sont les noyaux qui fusionnent pour donner naissance à un noyau diploïde (caryogamie). Chez les champignons inférieurs, plasmogamie et caryogamie sont quasiment simultanées. Enfin, la méiose rétablit dans les deux cas l'haploïdie et permet de former des spores dites sexuées. La reproduction asexuée, appelée également reproduction végétative, se caractérise par la production de spores mitotiques. La **Figure 6** présente les deux types de reproduction rencontrés chez les champignons.

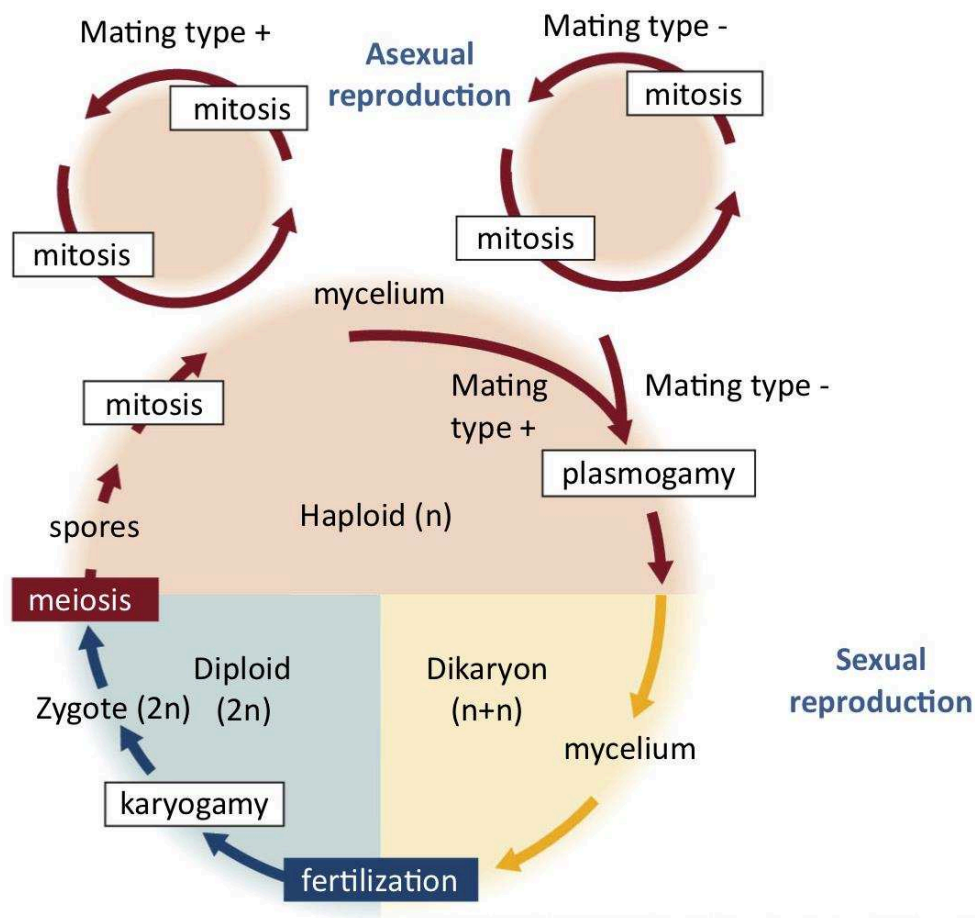


Figure 6 : Cycle de reproduction sexuée et asexuée chez les champignons (d'après Savara et al., 2007).



Dans les deux cas, les spores produites sont généralement disséminées grâce au vent, à l'eau voire via les animaux (en particulier les insectes). Il s'agit d'un autre moyen pour le champignon de conquérir de nouveaux espaces.

#### 1.4. Modes de vie

Les champignons sont hétérotrophes, c'est-à-dire qu'ils se nourrissent par absorption de composés organiques préexistants. Contrairement aux animaux eux aussi hétérotrophes qui ingèrent puis digèrent, les champignons digèrent via la production d'exoenzymes (cellulases, laccases, pectinases, estérases, lactases, peroxydases, lipases, protéases, etc.) puis ingèrent. L'énergie ainsi emmagasinée est stockée, par la plupart des champignons, sous forme de glycogène (comme les animaux) alors que la molécule de stockage chez les plantes est l'amidon (Volk, 2013).

On distingue différents modes de vie chez les champignons. En effet, ils peuvent vivre seuls (saprophytisme) ou en association avec d'autres organismes vivants. Dans ce cas, de nombreuses dénominations différentes permettent de définir les types d'interactions existants suivant que les effets soient favorables, défavorables ou nuls pour un ou les deux individus. Le **Tableau 1** présente les grands types d'interactions observées entre organismes.

**Tableau 1 : Les grands types d'interactions entre deux organismes (adapté de Selosse, 2012)**

Individu A	Individu B	Type d'interaction
+	+	mutualisme (interspécifique) ou coopération (cas général)
+	-	parasitisme (ou prédation, si mort immédiate)
+	0	commensalisme
0		amensalisme
0	0	neutralisme
-	-	compétition (ou antagonisme)

+ : effet favorable

- : effet défavorable

0 : aucun effet

De par son emploi controversé, le terme de symbiose n'est pas employé ici (Wilkinson, 2001). En effet, le terme « symbiose » fut créé par Frank en 1877, qui parlait de « Zusammenleben » (vivre ensemble, en allemand) (Selosse, 2012). Or, ce terme est très souvent utilisé de nos jours pour décrire une relation mutuellement bénéfique pour deux organismes et fait donc référence à du mutualisme. De manière intéressante, c'est d'ailleurs l'association de champignons avec des organismes photosynthétiques d'origine aquatique qui auraient permis à ces derniers de

pouvoir s'adapter aux différentes contraintes que conférait la vie terrestre puis de jouer un rôle majeur dans la colonisation des continents et la diversification des écosystèmes terrestres (Kenrick and Crane, 1997; Le Tacon and Selosse, 1997).

Parmi les champignons vivant en association avec d'autres organismes, les champignons mutualistes tiennent une place particulière. En effet, de très nombreux exemples de mutualismes existent entre des représentants du règne des Fungi et du règne végétal. On distingue entre autre les lichens, qui correspondent à l'association d'un champignon et de cellules possédant de la chlorophylle, ou encore les mycorhizes (ecto- ou endo-), qui sont le résultat de l'association d'un champignon du sol et de la racine d'une plante. Quand des champignons vivent en association avec d'autres organismes sans que l'hôte ne tire de bénéfices de cette association mais sans pour autant que le champignon nuise à l'hôte, on parle de commensalisme. Les champignons dits « parasites » vivent quant à eux aux dépens de leur hôte. Ils sont considérés comme pathogènes lorsqu'ils causent des dommages à leur hôte.

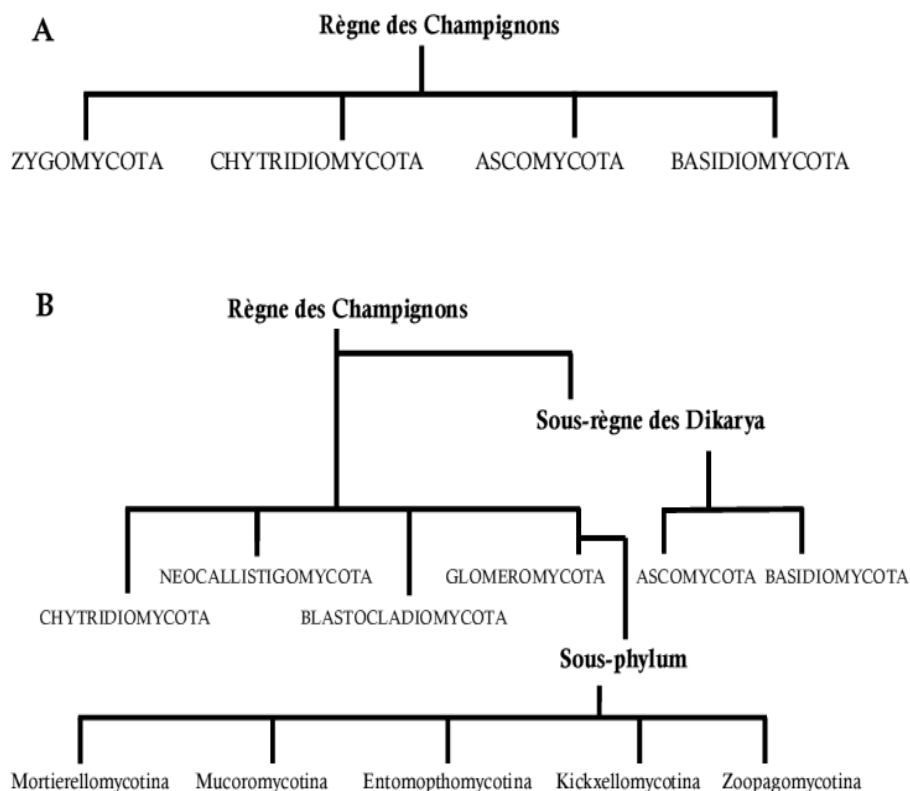
Concernant les champignons saprophytes, ils se nourrissent de matière organique morte ou en décomposition. Très présents au niveau des sols, ils jouent un rôle majeur dans le recyclage de la matière organique en remettant à disposition des autres organismes les éléments minéraux essentiels que sont l'azote, le phosphore ou encore le carbone.

Ainsi, au vu de la diversité structurale et fonctionnelle observée au sein même du règne des Fungi, le classement de ces individus devint très rapidement une nécessité.

### **1.5. Taxonomie fongique**

Trois classes ont d'abord été reconnues au sein des Fungi : les phycomycètes, les ascomycètes et les basidiomycètes. Les espèces dont la reproduction sexuée n'avait pas été observée ont été regroupées dans la « classe » des deutéromycètes ou Fungi Imperfecti (Ainsworth, 1973). Les connaissances générales sur les champignons s'améliorant (cycle de vie, écologie, modes alimentaires, ultrastructure, etc.), les taxonomistes ont tenté de placer ces organismes dans des taxons qui reflétaient le plus fidèlement leurs hypothétiques relations évolutives. Par conséquent, après avoir été reconnu comme un règne à part entière, ce dernier a subi d'importants changements. La classe des phycomycètes a été supprimée (Whittaker, 1969) et ses membres ont été regroupés dans cinq classes : les zygomycètes, les chytridiomycètes, les hypochytridiomycètes, les trichomycètes et les oomycètes (Ainsworth, 1973). Les classifications ultérieures du règne des champignons incluaient uniquement les Chytridiomycota, les Zygomycota, les Ascomycota et les Basidiomycota. Cette classification a été acceptée de manière universelle jusqu'aux années 2000 (**Figure 7A**).

Cette taxonomie est depuis en constante évolution. Certains phylums comme les Myxomycota ou les Oomycota ont été exclus du règne des champignons. En effet, depuis leur découverte, les Myxomycota ont successivement été classés comme des plantes, des animaux ou des champignons (Martin, 1960). Bien qu'étudiés presque exclusivement par des mycologues et traités longtemps comme des champignons, des études (Baldauf et al., 2000; Baldauf and Doolittle, 1997) ont clairement établi que les myxomycètes appartenaient au phylum des Amoebozoa du règne des Protista (Cavalier-Smith 1998). En raison de leur ressemblance morphologique avec les champignons (structures somatiques ramifiées qui portent des spores), les oomycètes ont été traditionnellement classés dans le même règne (Erwin and Ribeiro, 1996). Par la suite, les Oomycota ont été transférés dans le règne des Protista (Margulis and Schwartz, 1998). Egalement, les Ascomycota et les Basidiomycota ont été regroupés dans le sous-règne des Dikarya. Les Blastocladiomycota et les Neocallimastigomycota ont quant à eux été séparés des Chytridiomycota et élevés chacun au rang de phylum à part entière (Hibbett et al., 2007; James et al., 2006) (**Figure 7B**).



**Figure 7 : Classification du règne des Champignons. (A) classification jusqu'aux années 2000, (B) classification actuelle (adaptée de Kwon-Chung, 2012).**

Le règne des Fungi, aujourd’hui mieux délimité, regroupe donc les champignons macroscopiques, les moisissures, les levures mais également les lichens, les rouilles, les charbons ainsi que de nombreux organismes moins connus (Alexopoulos et al., 1996). Caractérisé par une très importante diversité structurale et fonctionnelle, le règne des Fungi a été le sujet de nombreuses estimations du nombre total d’espèces le composant. Une partie de ces estimations sont regroupées dans le **Tableau 2**.

**Tableau 2 : Estimations de la diversité des espèces fongiques (d’après Bass and Richards, 2011).**

<b>Publication</b>	<b>Estimation du nombre d’espèces</b>
Pascoe (1990)	2 700 000
Hawksworth (1991)	1 620 000
Hammond (1992)	1 000 000
Rossmann (1994)	1 000 000
Hammond (1992)	1 500 000
Cannon (1997)	9 900 000
Fröhlich & Hyde (1999)	1 500 000
Hawksworth (2001)	2 270 000
May (2000)	500 000
O’Brien et al. (2005)	3 500 000 - 5 100 000
Schmit & Mueller (2007)	712 000
Mora et al. (2011)	611 000 (+/- SE*=297 000)

\*SE : Standard Error

Le nombre le plus largement accepté de nos jours par la communauté scientifique, et en particulier les mycologues, est de 1,5 million (plus précisément 1,62 million) d’espèces (Hawksworth, 1991).

Cependant, comme Hawksworth le reconnaît lui-même, la méthode utilisée sous-estime le nombre réel d’espèces car elle ne prend pas en compte les champignons non associés à des plantes, ceux ne vivant pas dans le sol, les espèces cryptiques (non distinguables d’un point de vue morphologique), ainsi que la plus grande diversité existante au niveau des tropiques (Arnold and Lutzoni, 2007; Blackwell, 2011; Hawksworth, 2001; Hawksworth and Rossmann, 1997; Richards et al., 2012). Or, on sait que les champignons sont présents sur l’ensemble de la planète, sous les tropiques, au niveau des régions tempérées et même polaires, que ce soit sur terre ou dans la mer. Ceci renforce la théorie selon laquelle le nombre total d’espèces de champignons serait sous-estimé et est à réévaluer (Bass and Richards, 2011). Il est donc très

probable que le véritable nombre d'espèces fongiques présentes sur Terre soit un nombre à sept chiffres, voire d'un ordre de grandeur supérieur (Bass and Richards, 2011).

En ce qui concerne les espèces décrites, la dixième édition du « Dictionary of the Fungi » donne le chiffre de 98 998 (Kirk et al., 2008), la majorité de ces 98 998 espèces correspondant à des ascomycètes et basidiomycètes d'origine terrestre (Kirk et al., 2008).

Cependant, ce chiffre est sans aucun doute surestimé à cause des synonymes créés par les descriptions séparées des formes anamorphes et téléomorphes de certaines espèces (Blackwell, 2011). En effet, Bass et Richards (2011) déclarent que la grande augmentation du nombre d'espèces dans la dixième édition du « Dictionary of the Fungi » est probablement due, au moins en partie, au fait que des formes asexuées et sexuées aient été comptées séparément. Concernant le problème de synonymie, il a été pris en compte et se traduit par la disparition progressive du groupe artificiel des deutéromycètes. Ce groupe rassemblait des espèces ayant, soit une forme sexuée (téléomorphe) mais qui ne se développe que dans certaines conditions environnementales exceptionnelles (Houbraken et al., 2010; Kwon-Chung and Sugui, 2009; Lee et al., 2010), soit n'ayant pas de forme sexuée observée (Bolton et al., 2012), soit encore possédant des organes de la reproduction sexuée mais étant le plus souvent stériles (Ropars et al., 2014). De ce fait, une double nomenclature prenant en compte à la fois les formes anamorphes et téléomorphes des champignons avait été mise en place et pouvait paraître complexe. En 1910, la double nomenclature avait d'ailleurs été inscrite dans l'« International Code of Botanical Nomenclature » (ICBN). Le problème de nomenclature des champignons présentant des cycles de vie pléomorphes avait été abordé dans les précédentes versions de l'article 59 de l'ICBN et laissait entendre que plus d'un nom pour un taxon pouvait être utilisé (Cline, 2005). De nombreux champignons pléomorphes portaient donc deux noms : celui de la forme asexuée et de la forme sexuée. *Fusarium graminearum* est par exemple le nom d'une forme asexuée deutéromycète alors que son téléomorphe ascomycète se nomme *Gibberella zeae*.

Cependant, dans le but d'éliminer les synonymes et de faciliter la publication de nouvelles espèces, une proposition de révision de l'article 59 abolissant la double nomenclature a récemment été acceptée au « 2011 International Botanical Congress » à Melbourne et le principe « 1F = 1N » (i.e. « One Fungus = One Name ») a été mis en place (Norvell, 2011). Comme mentionné précédemment, le groupe artificiel des deutéromycètes devrait donc disparaître peu à peu au regard de ce principe. Il est à noter que le code lui-même a été renommé en « International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants » (ICN) (McNeill et al.,

2012) et que certaines modifications ont également été apportées, comme entre autres la non-obligation de la description en latin au profit d'une description en anglais (Hawksworth, 2011).

Représentant la quasi-totalité des espèces décrites à ce jour et ayant une importance économique indéniable, seuls les champignons dits supérieurs appartenant au sous-règne des Dikarya, les basidiomycètes et les ascomycètes, seront abordés ci-après. Il ne faut toutefois pas *exclure l'importance économique de certains champignons inférieurs comme ceux appartenant* entre autres au sous-phylum des Mucoromycotina (e.g. *Mucor fuscus*, *M. lanceolatus* ou encore *M. racemosus*) dans la production de fromages.

### **Champignons supérieurs : Ascomycota et Basidiomycota**

Les Ascomycota, avec plus de 64 000 espèces décrites (Kirk et al., 2008), forment le plus grand phylum des Fungi et l'un des phylums les plus diversifiés du domaine des eucaryotes. Les représentants des Ascomycota sont présents dans de très nombreuses niches écologiques en tant que saprophytes, parasites ou mutualistes et dans pratiquement tous les écosystèmes terrestres et aquatiques (Schoch et al., 2009). Les champignons ascomycètes sont généralement capables de produire une structure spécialisée (appelée asque) au sein de laquelle on retrouve les spores méiotiques (ascospores). Ils sont majoritairement microscopiques mais comprennent également des champignons mycorhiziens macroscopiques comme la truffe ou la morille. On retrouve entre autres à l'intérieur de ce groupe les moisissures et levures d'intérêt technologique ou d'altération.

Les Basidiomycota constituent le deuxième plus grand phylum fongique avec presque 32 000 espèces décrites (Kirk et al., 2008). Ubiquistes, on retrouve au sein de ce phylum des champignons macroscopiques comestibles bien connus comme *Agaricus bisporus* (champignon de Paris) ou *Pleurotus ostreatus* (pleurote), des champignons dits « vénéneux » comme *Amanita phalloides* (amanite phalloïde) mais également les rouilles et charbons, des levures et même des pathogènes humains et des endophytes (Greer, 1978; Yang, 2011). Ces champignons sont généralement capables de produire des basides portant les spores sexuées (basidiospores).

Afin de différencier ces presque 100 000 espèces *et de décrire ce qui s'apparente à une petite* partie de la diversité, différents critères (morphologie, interfécondité, génétique, etc.) furent ou *sont toujours utilisés. Le paragraphe suivant tente de lister et d'expliquer les différents concepts* et outils, précédemment ou toujours, utilisés en phylogénie fongique.

## 1.6. Phylogénie

La phylogénie a pour objectif de classer un ensemble d'entités (genres, espèces, individus ou gènes) dans un agencement logique décrivant les relations évolutives entre ces entités. Issues de l'évolution historique des espèces, les relations évolutives sont généralement représentées par un arbre de l'évolution. La question de l'espèce est donc primordiale. Cependant, comme l'écrivait déjà Charles Darwin en 1859 en parlant du concept d'espèce : « No one definition (of species) has as yet satisfied all naturalists ». Pour de nombreux scientifiques, il n'existe toujours pas à ce jour de concept consensus de l'espèce (Hey, 2006). En effet, les espèces correspondent à des segments de lignées évolutives qui évoluent indépendamment les unes des autres (Queiroz, 2007). De plus, les critères de définition d'espèces ne peuvent pas être universels car la spéciation est un processus temporel étendu, qui varie énormément entre les différents types d'organismes, plusieurs modes de spéciation peuvent se produire et enfin les caractéristiques de certains organismes rendent certains critères difficiles à appliquer (Manhart and McCourt, 1992).

Cependant, d'après Taylor (2000), bien que beaucoup de concepts d'espèce théoriques soient possibles, s'étendant de ceux basés sur la création divine à ceux basés sur l'évolution Darwinienne, il écrit qu'il est très difficile pour un biologiste s'intéressant à l'évolution de ne pas être d'accord avec le concept d'espèce évolutive qui définit l'espèce comme : "...a single lineage of ancestor-descendent populations which maintains its identity from other such lineages and which has its own evolutionary tendencies and historical fate" (Wiley, 1978).

Malheureusement, lorsqu'il s'agit d'identifier l'espèce, le concept d'espèce évolutive n'est pas pratique parce qu'il ne fournit aucun critère de reconnaissance. C'est pour cela que Mayden (1997) propose de distinguer concepts d'espèce théoriques et concepts d'espèce opérationnels. Considérés par Mayden (1997) comme étant secondaires au concept d'espèce évolutive, les concepts d'espèce les plus discutés (concept d'espèce morphologique, concept d'espèce biologique, concept d'espèce phylogénétique) sont cependant compatibles avec ce dernier dans le sens où ils essayent de reconnaître l'espèce évolutive (Avisé and Wollenberg, 1997).

Quatre concepts d'espèce opérationnels majeurs sont utilisés en taxonomie fongique : le concept d'espèce biologique qui met l'accent sur l'isolement reproducteur (Mayr, 1940), le concept d'espèce morphologique qui met l'accent sur la divergence morphologique (Ruse, 1969), le concept d'espèce phylogénétique qui souligne la divergence nucléotidique (Cracraft, 1983) et le concept de concordance généalogique des espèces (Avisé and Ball, 1990).

### **1.6.1. Le concept d'espèce biologique**

Le concept d'espèce biologique est basé sur la capacité ou non de deux individus à se reproduire entre eux. On fait ici référence à la reproduction sexuée décrite précédemment. Cette capacité définit le niveau intraspécifique, et les espèces dites biologiques sont des groupes interstériles (Mayr, 1940). Identifier une espèce biologique revient donc à rechercher des groupes d'individus sexuellement compatibles.

Cependant, ce concept semble peu adapté aux champignons car approximativement 20 % d'entre eux se reproduisent uniquement de manière asexuée (Reynolds, 1993). Egalement, la reproduction sexuée sans partenaire, ou homothallisme, est fréquente chez les champignons et ne permet pas la reconnaissance de l'espèce biologique. Il faut également noter que des conditions très particulières doivent parfois être reproduites pour induire un cycle sexuel comme dans le cas d'*Aspergillus fumigatus* (substrat approprié, 30°C, 6 mois) (Kwon-Chung and Sugui, 2009) ou de *P. psychrosexualis* (substrat approprié, 9°C ou 15°C, 3-4 mois) (Houbraken et al., 2010). De même, de nombreux champignons ne peuvent tout simplement pas être cultivés, ce qui est également un inconvénient dans le cas du concept d'espèce morphologique.

### **1.6.2. Le concept d'espèce morphologique**

Ce concept est celui qui a permis de décrire à quelques exceptions près, 70 000 champignons sur la base de leurs caractères morphologiques (Hawksworth et al., 1995) ou d'autres caractères phénotypiques comme, par exemple, la croissance à différentes températures (Pitt, 1979), la production de métabolites secondaires (Frisvad and Filtenborg, 1990, 1983), ou la présence de pigments (Besl and Bresinsky, 1997; Velisek and Cejpek, 2011). Jusqu'à un passé récent, ce concept d'espèce était le plus couramment utilisé chez les champignons.

Cependant, bien que le concept d'espèce morphologique ait été massivement utilisé pour le diagnostic des espèces de champignons, sa fiabilité est limitée par le manque de caractères diagnostiques au niveau de l'espèce. Ainsi, de nombreuses espèces cryptiques ont été découvertes au sein d'espèces morphologiquement semblables, en appliquant le concept d'espèce biologique (Anderson and Ullrich, 1979; Korhonen, 1978), le concept d'espèce phylogénétique (Hibbett et al. 1995) ou encore la GC-PSR (Genealogical Concordance - Phylogenetic Species Recognition) (Taylor et al. 2000 ; Hermet et al. 2012). Ceci s'explique entre autres par le fait que la différenciation génétique semble précéder la différenciation morphologique chez les champignons (Taylor et al., 2000). De même, certains champignons



peuvent avoir des morphologies distinctes selon leur stade de vie et la présence de caractères diagnostiques peut varier fortement parmi les souches.

La grande force de ce concept réside cependant dans le fait qu'il ait été largement appliqué de sorte que les comparaisons peuvent être faites parmi les taxons existants mais également entre les nouveaux taxons et les taxons existants, ces comparaisons pouvant parfois suffire dans le cadre de certains travaux d'identification présomptive réalisés en routine.

### 1.6.3. Le concept d'espèce phylogénétique

Le concept d'espèce phylogénétique est basé sur les notions de monophylie et de synapomorphie. En effet, l'espèce phylogénétique est définie comme la plus petite division monophylétique généralement définie comme un groupe d'organismes qui inclut l'ancêtre commun et tous ses descendants (Cracraft, 1983) et partageant des caractères dérivés (synapomorphie).

Dans le cas d'une simple identification, il faut par contre noter que la région ITS (Internal Transcribed Spacer) de l'ADN ribosomique est la plus couramment séquencée en écologie moléculaire fongique et a récemment été recommandée par le « Fungal Barcoding Consortium » comme code-barres fongique universel (Schoch et al., 2012). Pour certains groupes taxonomiques, d'autres régions sont habituellement ciblées. Il s'agit par exemple du gène de la  $\beta$ -tubuline dans le cas du genre *Penicillium* (Frisvad and Samson, 2004; Samson et al., 2004) ou encore du facteur d'élongation 1-alpha (EF-1 $\alpha$ ) pour le genre *Fusarium* (Geiser et al., 2004).

L'analyse phylogénétique d'un seul gène peut être utilisée pour regrouper les individus en groupes monophylétiques mais ne permet par contre pas de les classer en espèces. La décision relative au niveau auquel placer la limite d'espèce est dans ce cas très subjective (Taylor et al., 2000).

En effet, si un gène est polymorphe et possède deux allèles (A et B) parmi les individus d'une même espèce, et que ce gène est utilisé pour appliquer le concept d'espèce phylogénétique, les individus partageant l'allèle A et ceux partageant l'allèle B pourraient être considérés comme des espèces à part entière (**Figure 8**). Ce problème de délimitation des espèces peut être contourné en s'appuyant sur la concordance de plus d'un gène comme l'expliquent Avise et Ball (1990).

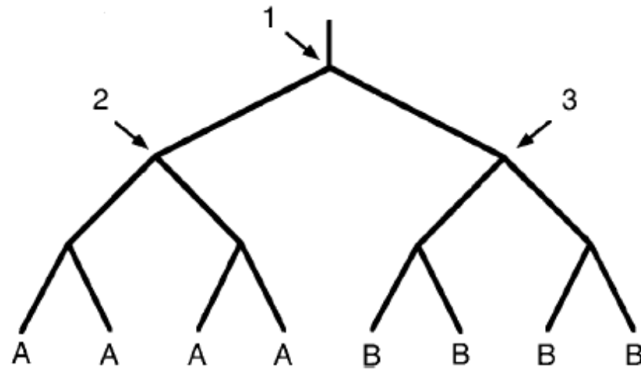


Figure 8 : Incertitude concernant les limites d'espèces dans une généalogie à un seul gène. Si la limite d'espèce est placée au niveau de la flèche 1, ceci laisse entendre que les allèles A et B représentent une variation intraspécifique. Mais si les limites d'espèces sont placées au niveau des flèches 2 et 3, alors cela signifie que les allèles A et B sont fixés chez deux espèces génétiquement isolées (d'après Taylor et al. 2000).

#### 1.6.4. La reconnaissance d'espèces phylogénétiques par la concordance généalogique (GC-PSR)

L'intérêt et la force de la GC-PSR réside dans le fait que la généalogie est basée sur la comparaison de plusieurs gènes et non d'un seul. Lorsque les différents arbres issus de l'analyse phylogénétique de chacun des gènes sont concordants, les arbres sont caractérisés par la même topologie due à la fixation de loci polymorphes après l'isolement génétique. Les conflits entre topologies d'arbre sont, à ce moment-là, très vraisemblablement dus à la recombinaison existant entre les individus d'une même espèce. Les limites d'espèce sont ainsi déterminées par la transition de la concordance aux conflits (**Figure 9**).

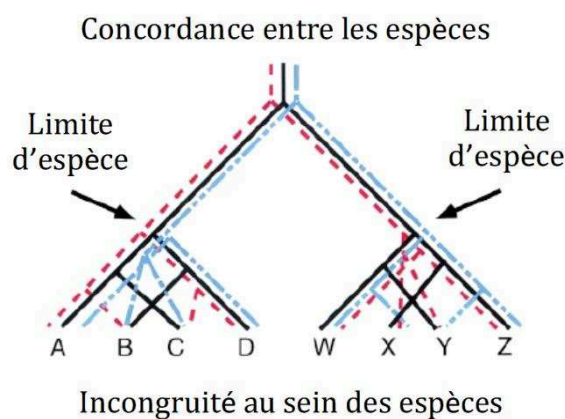


Figure 9 : Principe de la GC-PSR. L'analyse simultanée de la généalogie de trois gènes montre la transition de la concordance au conflit entre les branches et peut être utilisée pour délimiter les espèces (adapté de Taylor et al. 2000).

La difficulté principale de cette méthode est de trouver des gènes ayant des dynamiques évolutives de l'espèce étudiée. En effet, la GC-PSR est conservative et ne permet pas de reconnaître des espèces récemment dérivées pour lesquelles la coalescence des allèles n'est pas encore achevée (Chung, 2012; Degnan and Rosenberg, 2009; Knowles, 2009; Taylor et al., 2000). De plus, un inconvénient de la GC-PSR provient du fait que la transition de la concordance au conflit ne peut se produire pour des espèces réellement clonales alors qu'entre 20 et 25 % des champignons décrits à ce jour seraient mitosporiques et donc considérés comme clonaux (Taylor et al., 1999; Taylor et al., 1999; Taylor et al., 2015). Cependant, cette préoccupation peut être levée car l'examen de plusieurs champignons mitosporiques a montré que, dans la nature, ces champignons peuvent subir des recombinaisons malgré leur reproduction clonale (Anderson and Kohn, 1998; Taylor et al., 2015, 1999a, 1999b). La GC-PSR s'est avérée extrêmement pratique chez les Fungi, car elle est plus finement discriminante que les autres concepts dans beaucoup de cas, ou plus pratique (e.g. pour les espèces qui ne peuvent être croisées), et est actuellement la plus largement utilisée dans le règne des champignons (Alastruey-Izquierdo et al., 2010; Dettman et al., 2003; Fournier et al., 2005; Giraud et al., 2008; Hermet et al., 2012; Jacques et al., 2009; Johnson et al., 2005; Jurjevic et al., 2012; Koufopanou et al., 2001; Le Gac et al., 2007; O'Donnell et al., 2004; Pavlic et al., 2009; Peterson, 2008; Pringle et al., 2005; Rintoul et al., 2012; Starkey et al., 2007).

Fort de ces outils de reconnaissance, l'identification des espèces fongiques est donc relativement précise. Or, de par leur importance dans divers domaines, l'identification des champignons est une étape clé qui donne accès aux connaissances accumulées sur un organisme.

Comme indiqué précédemment, un grand intérêt est donc accordé aux champignons du fait de leur importance au niveau économique, en particulier dans l'agriculture en tant que pathogènes végétaux (*Fusarium graminearum* dans le blé), dans l'industrie alimentaire comme micro-organisme technologique (*Penicillium camemberti*, *Geotrichum candidum*, *Mucor lanceolatus* et *P. roqueforti* dans la fabrication de certains fromages) ou d'altération, dans l'industrie pharmaceutique (*P. rubens* pour la production de pénicilline), dans les biotechnologies (production d'éthanol, d'enzymes, bioremédiation, etc.).

*Le paragraphe qui suit aura pour objectif de donner un rapide aperçu de l'importance des champignons dans les fermentations alimentaires.*

## 1.7. Champignons et fermentations alimentaires

Comme indiqué précédemment, les champignons (levures et moisissures) ont un grand intérêt économique, et en particulier en alimentaire. En effet, de très nombreux aliments fermentés, entre autres, à l'aide de champignons sont consommés à travers le monde.

Parmi les fermentations les plus connues, on retrouve la fermentation alcoolique. Cette dernière permet la fabrication du pain, de la bière, du vin ou encore du cidre. Elle fait essentiellement intervenir des levures du genre *Saccharomyces*, qui transforment le sucre en éthanol et CO<sub>2</sub>.

Les laits fermentés, comme le kéfir ou le viili, font également intervenir des champignons, et plus particulièrement des levures. *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces turicensis* et *Pichia fermentans* sont ainsi associées aux grains de kéfir. On retrouve des levures communes au sein du viili comme *Kluyveromyces marxianus* ou *Pichia fermentans*, mais également *Saccharomyces unisporus* (Wang et al., 2008).

Les moisissures peuvent également jouer un rôle important dans la fermentation des produits carnés. *Penicillium nalgiovense* est par exemple utilisé pour l'affinage du saucisson. Il est responsable de l'aspect typique poudreux blanc et intervient dans le développement des qualités organoleptiques (Leistner, 1995).

Les produits fermentés asiatiques sont très nombreux et font également appel à l'utilisation de moisissures et de levures. Parmi ces dernières, *Aspergillus oryzae* est connu pour son implication dans la fabrication du sake, de la sauce soja et du miso (Shibasaki and Hesseltine, 1962). De même, le sufu ou furu, produit fermenté à base de soja d'origine chinoise, fait intervenir des champignons inférieurs des genres *Actinomucor*, *Mucor* et *Rhizopus* (Han et al., 2001; Hesseltine, 1983).

De même, le kombucha, un thé sucré fermenté, est issu de l'action de levures principalement osmotolérantes qui initient la fermentation alcoolique et de bactéries acétiques (Marsh et al., 2014). Parmi les levures, on retrouve de nombreux genres comme *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera/Hanseniaspora*, *Torulaspora*, *Pichia*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Saccharomyces* et *Saccharomycoïdes* (Marsh et al., 2014).

Parmi les micro-organismes (bactéries, levures et moisissures) utilisés pour réaliser ces diverses fermentations, nombre d'entre eux ont subi une adaptation forcée, la domestication (Gibbons and Rinker, 2015).

## 1.8. Fermentations alimentaires et domestication

Au fil du temps et pour ses besoins, l'Homme a sélectionné et continue de sélectionner des plantes, des animaux mais également des micro-organismes possédant des caractéristiques jugées avantageuses pour ses cultures, ses élevages et ses fermentations.

Cette sélection a pour conséquence de conduire à des changements phénotypiques importants. On distingue deux types de sélection : une sélection qualifiée de « consciente » lorsque l'Homme choisit un individu pour ses propriétés particulières et une sélection « inconsciente » due au fait que les individus sélectionnés sont très généralement isolés de leur environnement naturel pour être placés dans un nouvel environnement contrôlé, ceci ayant pour conséquence d'entraîner des changements très importants au niveau des pressions de sélection (Zohary et al., 1998).

La domestication a été très étudiée chez les plantes et les animaux mais nous ne nous intéresserons ici qu'aux micro-organismes, moins largement étudiés, et en particulier à ceux utilisés pour réaliser certaines fermentations alimentaires.

Des études basées sur la génomique ont mis en évidence des preuves de domestication chez des micro-organismes utilisés pour des produits fermentés (Gibbons and Rinker, 2015). Par exemple, sur la base de comparaison de génomes, Gibbons et al. (2012) suggèrent qu'une lignée d'*Aspergillus flavus* toxigène et potentiellement pathogène pour les plantes et les animaux (Machida et al., 2005), aurait évolué vers une lignée atoxigène possédant des caractéristiques enzymatiques et métaboliques améliorant le processus de saccharification impliqué dans la production de sake, de sauce soja et de miso et que cela serait dû à une sélection opérée par l'Homme.

Le même phénomène a été mis en évidence chez *Saccharomyces cerevisiae*, un des principaux modèles d'étude des processus cellulaires et moléculaires eucaryotes. Ainsi, comme l'explique Sicard et Legras (2011), il est difficile de définir la période à laquelle les hommes ont commencé à utiliser de manière consciente des levures en les sélectionnant pour la production de pain, de bière et de vin. Cependant, on sait que par hybridation interspécifique ou polyploïdisation, les activités humaines ont été associées à la création de nouvelles espèces du genre *Saccharomyces* sensu stricto. Chez *S. cerevisiae*, elles ont favorisé la différenciation de groupes génétiques en lien avec les différents processus de fermentation (Fay and Benavides, 2005; Legras et al., 2007; Sicard and Legras, 2011).

Au niveau fromager, des preuves de domestication ont également été mises en évidence chez plusieurs espèces de micro-organismes. Trois conséquences majeures d'adaptation ont par exemple été mises en évidence chez les bactéries lactiques : une réduction de la taille du génome due à la perte de gènes non-essentiels aux activités de fermentations (Makarova et al., 2006), l'acquisition de nouvelles propriétés avantageuses via des transferts horizontaux de gènes (O'Sullivan et al., 2009) et, comme observé pour les levures, une spécialisation à différents matrices alimentaires via des mutations adaptatives améliorant une nouvelle fois les activités de fermentations (Germond et al., 2003). De même, une analyse génomique comparative a permis de montrer que le génome d'*Arthrobacter arilaitensis* présentait plusieurs particularités comme une meilleure tolérance au sel ou une assimilation du fer plus efficace (Monnet et al., 2010) que les auteurs interprètent comme une adaptation génétique à l'environnement fromager. Concernant les moisissures, *P. camemberti* est considéré comme l'espèce domestiquée pour laquelle la souche sauvage serait *P. commune* (Pitt et al., 1986). Giraud et al. (2010) émettent l'hypothèse que *P. camemberti* serait un mutant de *P. commune* dont les mutations auraient affecté, entre autres, la pigmentation des conidies. Toujours concernant les moisissures, une étude portant sur la comparaison de plusieurs génomes comprenant ceux de *P. roqueforti* et *P. camemberti* a permis de mettre en évidence des transferts horizontaux récents (Cheeseman et al., 2014). L'acquisition de nouvelles potentialités métaboliques par transferts horizontaux de gènes serait une stratégie écologique pour beaucoup d'espèces fongiques (Wisecaver and Rokas, 2015). Dans l'étude de Cheeseman et al. (2014), la région génomique de 575 kb, acquise par transferts horizontaux de gènes, et nommée Wallaby, n'a été détectée qu'au sein de souches de *Penicillium* (par exemple, *P. roqueforti*, *P. camemberti*, *P. caseifulvum*, *P. bifforme*, *P. fuscoglaucum*, *P. palitans*, *P. solitum*, *P. nordicum* ou encore *P. polonicum*) issues de l'environnement alimentaire. Les auteurs suggèrent que cette région pourrait conférer des avantages compétitifs vis-à-vis d'autres micro-organismes (entre autres la production de composés antimicrobiens) et qu'elle serait une preuve de domestication. Dans ce type d'étude, l'échantillonnage est crucial ; en effet, comme l'explique Gibbons et Rinker (2015), c'est par un vaste échantillonnage combiné plus largement à des études de population basées sur des approches génomiques et phylogénomiques que l'on pourra peut-être identifier l'origine et/ou le nombre d'événements de domestication ayant eu lieu au sein d'une espèce. D'après les mêmes auteurs, l'utilisation de ce type d'approches est celui qui pourrait permettre la reconstruction de l'évolution génotypique et phénotypique, étape primordiale pour pouvoir identifier l'espèce « ancêtre » et les origines des micro-organismes domestiqués, cela restant un défi dans un domaine encore en grande partie inexplorée.

Parmi les fermentations alimentaires, le fromage est un écosystème très particulier au sein duquel coexistent et se succèdent non seulement des moisissures mais également des bactéries *ou encore des levures*. *Etant au cœur du sujet de ces travaux, le prochain chapitre sera consacré aux fromages et s'intéressera plus particulièrement aux fromages à pâte persillée pour lesquels la moisissure étudiée, P. roqueforti, est classiquement utilisée comme culture d'affinage.*

## **2. Les fromages**

### **2.1. Histoire et origines du fromage**

La croyance générale veut que le fromage se soit développé dans une région connue sous le nom de « Croissant fertile » il y a environ 8000 ans (Fox and McSweeney, 2004). Cette région, berceau de la « Révolution agricole » caractérisée par le début de la domestication des plantes et des animaux, s'étendait des fleuves Tigre et Euphrate, de ce qui est aujourd'hui le sud-est de la Turquie et ce jusqu'à la côte méditerranéenne. Les hommes ont vraisemblablement reconnu très tôt la valeur nutritive du lait produit par des animaux domestiqués. Plus sociables et dociles que d'autres animaux, les chèvres furent l'une des premières espèces animales à être domestiquée vers 8000 avant JC (Dubeuf and Boyazoglu, 2009). Les toutes premières traces de production de fromage renvoient, elles, au sixième millénaire avant JC, c'est-à-dire, pendant l'ère Néolithique. En effet, l'étude de résidus organiques de très anciens fragments de poteries datant du sixième millénaire avant JC et retrouvés en Europe du Nord a mis en évidence les plus anciennes preuves de fabrication de fromage (Salque et al., 2013). De même, des opérations de traite et de caillage du lait ont été représentées sur une frise datant du début de l'ère Sumérienne (4<sup>ème</sup> millénaire avant JC) et un produit alimentaire identifié comme étant du fromage a été retrouvé dans la tombe de Hor-Aha datant d'environ 3000 ans avant JC (Farnworth, 2003).

L'utilisation des bactéries lactiques à l'origine de la production d'acide lactique mais également celle de la présure fut, dans les deux cas, très vraisemblablement accidentelle et permit la découverte du caillage du lait marquant par la même occasion le début de la production fromagère. La capacité à convertir le lait en fromage procurait en réalité de nombreux avantages comme par exemple l'apport d'un moyen de stabilisation et de stockage du lait, et facilitait en même temps son transport. Egalement, le fromage constituait un moyen d'améliorer la digestibilité du lait de par sa teneur réduite en lactose et de diversifier le régime alimentaire humain (Fox and McSweeney, 2004).

La fabrication du fromage était en réalité déjà bien établie dans les anciennes civilisations du Moyen-Orient, d'Egypte et dans les civilisations grecque et romaine (Fox and McSweeney,

2004). Mais, les grandes migrations de peuples immédiatement avant et après la chute de l'empire romain occidental, tout comme les croisés et les pèlerins au cours du Moyen Age, ont sans aucun doute contribué à la diffusion du savoir-faire fromager dans toute l'Europe (Fox and McSweeney, 2004). C'est d'ailleurs au Moyen Age, et plus particulièrement sous l'influence monastique, que la production fromagère s'est développée et que les techniques de production se sont diversifiées. En plus de leurs rôles dans la diffusion du Christianisme et dans la protection et l'expansion du savoir durant le Moyen Âge, les monastères ont en effet très fortement contribué au développement de l'agriculture en Europe, et par la même occasion à l'amélioration de la qualité de certains produits comme le vin, la bière et le fromage. Ainsi, de nombreuses variétés de fromage aujourd'hui célèbres ont été développées dans des monastères comme, par exemple, le Saint-Paulin ou encore le Maroilles (Fox and McSweeney, 2004). Le mouvement de moines entre monastères aurait également contribué à la diffusion de variétés de fromage et probablement au développement de nouvelles variétés hybrides. Les grands domaines féodaux du Moyen Âge étant des communautés indépendantes, la conservation de surplus de nourriture produite en été pour la consommation au cours de l'hiver était très importante et le fromage a sans aucun doute représenté un des principaux produits conservés avec les céréales, les viandes séchées et salées, les fruits séchés, les légumes séchés et fermentés, la bière et le vin. Par la suite, les domaines féodaux évoluèrent en villages et certains d'entre eux en plus grandes communautés. De même, comme l'écrivent Fox et McSweeney (2004), parce que les monastères et les domaines féodaux étaient des communautés majoritairement indépendantes, il est clair que plusieurs centaines de variétés distinctes de fromage se sont développées tout au long du Moyen Age, à partir de la même matière première, le lait, et dans des conditions de communication limitée. Ainsi, traditionnellement, beaucoup de variétés de fromage ont été produites dans des régions géographiques limitées, en particulier dans les zones montagneuses où les communautés sont isolées. La production localisée de certaines variétés est d'ailleurs toujours apparente et, dans certains cas, protégée par des appellations reconnues au niveau européen comme l'Appellation d'Origine Protégée (AOP) ou l'Indication Géographique Protégée (IGP). A partir du XV<sup>ème</sup> siècle, les paysans remplacèrent les moines dans la production fromagère. La transformation du lait en fromage permettait de réduire l'impôt sur la production laitière. La dernière étape dans la diffusion du savoir-faire fromager à travers le monde est marquée par la colonisation des Amériques, de l'Océanie et de l'Afrique par les européens qui ont apporté avec eux leurs connaissances et leurs compétences en matière de production fromagère. Depuis, le fromage est devenu un produit d'importance économique majeure dans certains des pays concernés, notamment les Etats-Unis (5 055 000



tonnes produites en 2013), le Canada (343 000 tonnes produites en 2013), l'Australie (305 000 tonnes produites en 2013) ou encore la Nouvelle-Zélande (311 000 tonnes produites en 2013) (CNIEL, 2015), même si les variétés produites sont principalement d'origine européenne, modifiée dans certains cas pour satisfaire aux exigences locales (Fox and McSweeney, 2004). Le fromage n'était pas fabriqué dans ces régions avant la colonisation par les Européens. En réalité, il n'y avait originellement aucune vache, mouton ou chèvre en Australie, en Amérique du Nord et du Sud et même aucun mammifère terrestre en Nouvelle-Zélande (Fox and McSweeney, 2004). La découverte de la pasteurisation au XIX<sup>ème</sup> siècle, suivie du développement de l'industrialisation au XX<sup>ème</sup> siècle, a conduit à l'expansion de la production fromagère. De même, l'acquisition progressive de connaissance sur la chimie et la microbiologie du lait et du fromage eut, entre autres, comme conséquence la mise en place de nombreuses réglementations telles que les normes d'hygiène, visant à protéger le consommateur. Dans le même temps, des appellations permettant de préserver un patrimoine culturel et gastronomique mais également de garantir l'origine et la typicité du produit concerné ont vu le jour. Dans un premier temps, les Appellations d'Origine Contrôlée (AOC) apparurent en France avant que celles-ci ne soient englobées dans leur très grande majorité sous les Appellation d'Origine Protégée (AOP) et Indication Géographique Protégée (IGP) reconnues au niveau européen.

Bien que l'objectif premier de la production de fromage fut de conserver les constituants principaux du lait, de nos jours, le fromage s'est développé pour devenir un produit gastronomique tout en gardant une fonction hautement nutritive. En 1970, Sandine & Elliker (1970) suggéraient déjà l'existence de plus de 1000 variétés de fromages à travers le monde. Si l'on en croit les chiffres actuels, il n'existerait pas moins de 1775 variétés de fromage à travers le monde ([www.cheese.com](http://www.cheese.com)) même si de très nombreuses variétés sont extrêmement similaires et devraient être considérées comme des variantes plutôt que comme de véritables variétés (McSweeney et al., 2004).

Si l'on s'intéresse plus particulièrement aux fromages à pâte persillée (ou bleus), ces derniers sont très certainement produits depuis plusieurs millénaires (Dumay, 1982), que ce soit de manière délibérée ou accidentelle. En effet, même si des moines rapportent son transport à travers les Alpes à partir du 8<sup>ème</sup> siècle et qu'il ne fut décrit pour la première fois dans la littérature qu'en 1070 (Fox and McSweeney, 2004), le Roquefort serait produit depuis plus de 3500 ans. Des vestiges retrouvés près de Roquefort-sur-Soulzon indiquent que la production de fromage serait millénaire dans cette région (Albillos et al., 2011; Dumay, 1982).

Concernant certains autres bleus d'Europe, la première apparition dans la littérature faisant état de leur production remonte à 879 pour le Gorgonzola et 962 pour le Cabrales (Albillos et al., 2011; Fox and McSweeney, 2004). Le Stilton et le Danablu ne sont, quant à eux, pas mentionnés avant, respectivement, 1785 et les années 1870 (Cantor et al., 2004; Fox and McSweeney, 2004). Il faut toutefois noter que comme l'écrit Dumay (1982) : « [...] jusqu'en 1910, une partie du camembert continuait à être fabriqué avec du lait de brebis et [...] le fromage mis en vente était bleu. L'emploi des moisissures issues du pays de Bray lui a donné sa forme actuelle. » Autrement dit, on peut très vraisemblablement imaginer qu'une partie plus ou moins importante des fromages produits depuis le Néolithique était partiellement bleus (tout du moins en surface) du fait d'une maîtrise approximative des conditions de production et d'affinage.

## **2.2. La diversité fromagère**

La norme FAO/OMS n° A-6 (1978, modifiée en 1990) définit le fromage comme « le produit frais ou affiné, solide ou semi-solide, dans lequel le rapport protéines de lactosérum/caséine n'excède pas celui du lait, obtenu :

- par coagulation du lait, lait écrémé, lait partiellement écrémé, crème de lactosérum ou babeurre, seul ou en combinaisons, grâce à l'action de la présure ou d'autres agents coagulants appropriés et par égouttage partiel du lactosérum résultant de cette coagulation ;
- par l'emploi de techniques de fabrication entraînant la coagulation du lait et/ou des matières obtenues à partir de lait, présentant des caractères physiques, chimiques et organoleptiques similaires à ceux du produit défini plus haut.»

Au niveau français, l'article 1 du décret n° 2013-1010 du 12 novembre 2013 accorde la dénomination « fromage » au produit fermenté ou non, affiné ou non, obtenu à partir des matières d'origine exclusivement laitière suivantes : lait, lait partiellement ou totalement écrémé, crème, matière grasse, babeurre, utilisées seules ou en mélange et coagulées en tout ou en partie avant égouttage ou après élimination partielle de la partie aqueuse.

Ces deux définitions juridiques mettent en évidence que seules les étapes de coagulation et d'égouttage, qu'elles soient partielles ou non, sont communes à tous les types de fromages.

Cependant, d'autres étapes sont communes à un très grand nombre de fromages. On retrouve la préparation du lait, la coagulation, l'égouttage, le salage et l'affinage (pour plus de détails sur ces étapes de fabrication voir les Dossiers Techniques de l'Ingénieur - Procédés de transformation fromagère parties 1, 2 et 3 (Goudédranche et al., 2002, 2001a, 2001b).

Comprenant tout ou seulement une partie de ces étapes, on distingue généralement huit grandes familles de fromages : fromages à pâte fraîche, à pâte filée, à pâte fondue, à pâte pressée cuite, à pâte pressée non cuite, à pâte molle persillée, à pâte molle à croûte fleurie et à pâte molle à croûte lavée.

La **Figure 10** tente de répertorier l'éventail des différentes technologies à l'origine de la diversité fromagère.

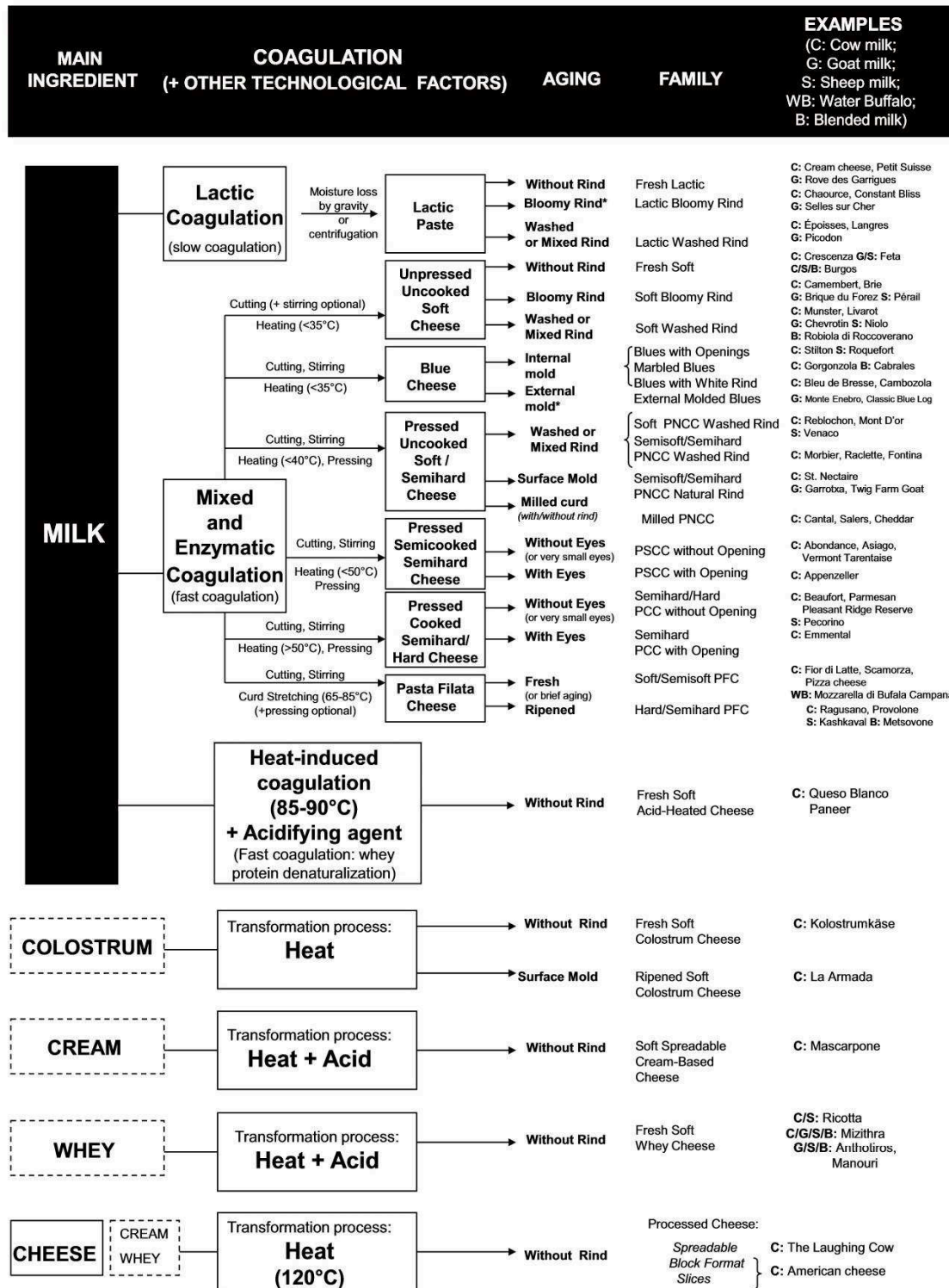


Figure 10 : Schéma didactique présentant les différentes variétés de fromage en termes de technologie et de caractéristiques microbiologiques. PNCC, Fromage à pâte pressé non cuite; PSCC, Fromage à pâte pressé semi-cuite; PCC, Fromage à pâte pressé cuite; PFC, Fromage à pâte filée (d'après Almena-Aliste and Mietton, 2014).

Chacune de ces familles et des variétés qui les composent sont donc caractérisées par un procédé de fabrication particulier mais également par un microbiote qui lui est propre.

La suite de ce chapitre consacré aux *fromages s'intéressera plus particulièrement aux fromages à pâte persillée*, type de fromage au sein duquel la moisissure étudiée, *P. roqueforti*, est un des micro-organismes les plus impliqués dans le développement des qualités organoleptiques.

### 2.3. Les fromages à pâte molle persillée

Ainsi, comme évoqué précédemment, bien que les premières traces de bleus dans la littérature soient relativement récentes, ils sont très probablement produits depuis plusieurs millénaires (Dumay, 1982), que ce soit de manière délibérée ou accidentelle.

De ce fait, de nombreux pays ont depuis longtemps développé leurs propres types de bleu, chacun ayant des caractéristiques spécifiques. On distingue par exemple le Roquefort français, le Danablu danois, le Gorgonzola italien, le Stilton anglais ou encore le Cabrales espagnol. Si on se restreint aux bleus bénéficiant d'une Appellation d'Origine Protégée (AOP) ou d'une Indication Géographique Protégée (IGP) européenne, on ne dénombre pas moins de 21 fromages à pâte persillée, preuve de la diversité existante au sein même de cette famille de fromages (**Tableau 3**).

**Tableau 3 : Fromages à pâte persillée bénéficiant d'une AOP ou IGP (d'après Fontaine, 2015)**

Fromage	Origine	Appellation	Type de lait	Période d'affinage
Bleu d'Auvergne	France	AOP	Vache	2 <sup>a</sup> /4 <sup>b</sup> semaines
Bleu des Causses	France	AOP	Vache non écrémé	3 à 6 mois (70 <sup>c</sup> jours)
Bleu de Gex Haut-Jura	France	AOP	Vache cru	2 mois (21 <sup>c</sup> jours)
Buxton Blue	Royaume-Uni	AOP	Vache entier	2 mois
Cabrales	Espagne	AOP	Vache	6 semaines
Danablu	Danemark	IGP	Vache cru thermisé	2 à 5 mois
Dorset Blue Cheese	Royaume-Uni	IGP	Vache écrémé	3 à 4 mois
Dodevale Cheese	Royaume-Uni	AOP	Vache	3 à 12 mois
Exmoor Blue Cheese	Royaume-Uni	IGP	Vache	3 à 4 semaines
Fourme d'Ambert	France	AOP	Vache	2 mois (28 <sup>c</sup> jours)
Fourme de Montbrison	France	AOP	Vache	1 à 3 mois (28 <sup>c</sup> jours)
Gamonéu	Espagne	AOP	Mélange de laits crus (vache, brebis, chèvre)	8 <sup>c</sup> semaines
Gorgonzola	Italie	AOP	Vache	3 <sup>c</sup> mois
Jihočeská Niva	République tchèque	IGP	Vache	4 semaines
Jihočeská Zlatá Niva	République tchèque	IGP	Vache	6 semaines
Kopanisti	Grèce	AOP	Vache, chèvre, brebis ou mélange	30 à 40 jours
Stilton Cheese	Royaume-Uni	AOP	Vache entier pasteurisé	6 <sup>c</sup> à 15 semaines
Strachitunt	Italie	AOP	Vache cru	75 <sup>c</sup> jours
Roquefort	France	AOP	Brebis cru	3 <sup>c</sup> à 9 <sup>d</sup> mois
Picón Bejes-Tresviso	Espagne	AOP	Mélange (vache, brebis, chèvre)	2 <sup>c</sup> mois

a : pour conditionnement en petit format, b : pour conditionnement en grand format, c : durée minimale, d : durée maximale

Comme on peut le constater en observant le **Tableau 3**, le lait de vache est le principal lait utilisé mais certains d'entre eux sont produits à partir d'autres laits comme celui de brebis, de chèvre voire dans certains cas de bufflonne.

D'un point de vue juridique français, l'article 3 du décret n° 2013-1010 du 12 novembre 2013 indique que la dénomination « bleu » est réservée à un fromage affiné, à pâte légèrement salée, éventuellement malaxée, et persillée en raison de la présence de moisissures internes de couleur bleu-vert à blanc-gris.

Plus simplement, les bleus sont en principe caractérisés par la croissance de la moisissure *P. roqueforti*, qui confère à ces derniers des caractéristiques organoleptiques particulières.

Les différentes étapes réalisées pour la production de fromages à pâte persillée sont présentées ci-après, de nombreux *procédés n'étant pas* spécifiques aux bleus.

### **2.3.1. Préparation du lait**

Comme indiqué précédemment, les bleus peuvent être produits à partir de différents types de lait (principalement de vache, de brebis, de chèvre voire de bufflonne) utilisés seuls ou en mélange. De nos jours, assez peu de laits sont utilisés sous leur forme originelle, c'est-à-dire crus et entiers. Seuls certains fromages bénéficiant d'une AOP ou d'une IGP continuent d'être produits à partir de lait cru et/ou entier. Ainsi, dans la majorité des cas le lait est préparé dès la collecte. Au moment de la traite, un refroidissement du lait à 3-4°C est généralement réalisé afin de préserver ses qualités chimique et microbiologique. Par la suite et afin d'assainir le lait, différents traitements peuvent être appliqués de manière indépendante ou combinée. On distingue le traitement thermique, la bactofugation basée sur le principe de centrifugation et les filtrations (ultra- ou micro-) (Goudédranche et al., 2001a). En ce qui concerne le traitement thermique, il est pratiqué de manière plus ou moins intense. Lorsque le couple temps/température est de 57-68°C pendant 15 secondes ou de 72-85°C pendant 15 à 20 secondes on parle respectivement de thermisation et de pasteurisation (CNIEL). Il faut noter que lorsque le lait n'est pas chauffé au-dessus de 40°C ni soumis à un traitement non thermique d'effet équivalent notamment du point de vue de la réduction de la concentration en micro-organismes, le fromage produit est dit au lait cru (article 14 du décret n° 2013-1010 du 12 novembre 2013). On observe une réduction variable du nombre total de micro-organismes selon le traitement thermique. Cependant, lorsque le seuil du couple temps/température de la pasteurisation est atteint les principaux agents pathogènes rencontrés dans le lait cru comme *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* (par exemple, *E. coli* O157 : H7 ou plus largement les *E. coli* entérohémorragiques), *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. sont détruits. À 95°C, on ne retrouve plus que les bactéries sporulées comme

*Clostridium tyrobutyricum* responsable, par exemple, de gonflements indésirables sur les fromages à pâte pressée cuite.

Dans ce cas, des méthodes alternatives au traitement thermique existent. Il est ainsi possible de procéder à une bactofugation. Cette technique permet de séparer par centrifugation les micro-organismes ayant une densité supérieure à celle du lait. Cette technique généralement associée à un traitement thermique permet d'éliminer les spores butyriques contenues dans le lait. Une autre alternative réside en l'ultra- ou la microfiltration sur membrane. Cela résulte en la filtration du lait à l'aide d'une membrane dans le but de réduire la densité microbienne, en particulier dans les fromages susceptibles d'être contaminés par des bactéries sporulées. Cette méthode nécessite de réaliser au préalable un écrémage. La crème est ensuite traitée thermiquement puis réincorporée dans les proportions recherchées au lait écrémé micro-filtré. La diminution du nombre de micro-organismes est comparable à celle obtenue par traitement thermique. Cependant, la sélection ne se faisant plus selon la résistance thermique de chaque espèce mais étant relative à la taille et à la quantité de micro-organismes présents, ces derniers sont séparés du lait et ainsi leur équipement enzymatique (outre les enzymes extracellulaires et thermostables) n'est plus présent dans le lait micro-filtré comme cela est partiellement le cas dans le lait traité thermiquement.

Par contre, ces différents traitements ont un impact direct sur la diversité et le nombre de micro-organismes présents. C'est particulièrement vrai pour les bactéries lactiques « non-starter » qui influencent habituellement positivement l'affinage du fromage lorsque celui-ci est produit à partir de lait cru (Fox and McSweeney, 2004). La pasteurisation peut également provoquer une inactivation partielle voire complète des enzymes natives du lait.

Après avoir subi un ou plusieurs des traitements cités précédemment, le lait contient peu de micro-organismes. C'est pour cela qu'il est nécessaire de recréer un écosystème particulier et de maîtriser son développement pour chaque type de fromage.

Egalement, la composition biochimique du lait étant fortement dépendante du mammifère dont il est issu et de son alimentation (Barłowska et al., 2011), les propriétés du lait et, par conséquent, les qualités organoleptiques du fromage peuvent être affectées. Ainsi, pour conserver une certaine régularité, la composition du lait (matières grasses, protéines, lactose) peut être soumise à certains ajustements (pour plus de détails sur les techniques employées voir les Dossiers Techniques de l'Ingénieur : Procédés de transformation fromagère partie 1). Il faut cependant noter que selon les types de bleus et en particulier lorsque ces derniers bénéficient d'une AOP ou d'une IGP, cette standardisation peut être prohibée.

### 2.3.2. Coagulation

La coagulation est l'étape durant laquelle le lait, à l'état liquide, passe à l'état solide en formant un réseau protéique tridimensionnel sous l'action de ferments lactiques, de présure ou de la combinaison des deux.

Les ferments lactiques ou cultures « starter » sont des cultures simples ou mixtes de bactéries lactiques dont la fonction principale est d'acidifier le lait via la production d'acide lactique à partir du lactose présent naturellement dans le lait. La formation du caillé sous l'action des bactéries lactiques est donc due à la production d'acide lactique qui provoque une chute de pH du lait entraînant l'agrégation des micelles de caséines à un pH proche de leur point isoélectrique (pH ~4,6) (Law and Tamime, 2010).

La coagulation provoquée par la présure résulte, elle, d'un processus en trois étapes. On distingue tout d'abord une première phase caractérisée par l'hydrolyse spécifique (liaison phénylalaninéméthionine PHE<sub>105</sub>-MET<sub>106</sub>) de la caséine  $\kappa$  formant deux composés, la paracaséine  $\kappa$  et le caséinomacropéptide (CMP) (Law and Tamime, 2010). Cette réaction obéit à la cinétique de Michaelis-Menten et dépend donc de la concentration en enzyme. La deuxième phase est caractérisée par l'agrégation des micelles de caséine dont l'hydrolyse a entraîné une modification de la charge. Cette étape, très dépendante de la température et de la présence en ions calcium, permet la formation de cette phase solide appelée caillé.

La troisième phase, dénommée phase de durcissement, correspond à la réorganisation du caillé et à sa réticulation, celle-ci mettant en jeu les liaisons intermoléculaires.

En ce qui concerne la présure, la préparation utilisée à l'origine en production fromagère contenait des enzymes extraites de l'estomac du veau (chymosine et pepsine essentiellement). De nos jours, on retrouve différentes préparations coagulantes sous la dénomination présure. On distingue ainsi les produits coagulants d'origine animale (chymosine et pepsine en proportions variables), d'origine fongique (protéases acides extraites de moisissures) ou encore d'origine fermentaire obtenus par voie génétique (chymosine) (Goudédranche et al., 2001a).

En réalité, l'acidité du lait favorise l'action de la présure. Ainsi, selon l'acidité du lait au moment de la coagulation, on distingue, en fromagerie, trois types de coagulation :

- la coagulation-présure qui a lieu lorsque l'acidité est restée proche de celle du lait. L'ajout de présure est alors important et la température proche de 33°C voire supérieure. Le gel obtenu est relativement élastique, souple et fortement minéralisé. Des moyens mécaniques sont généralement nécessaires pour éliminer le sérum ;
- la coagulation lactique qui s'applique lorsque l'acidité s'est développée de manière intense (pH compris entre 4,6 et 5,5). La dose de présure ajoutée est faible et la température est en



général comprise entre 18 et 28°C. Le caillé qui en résulte est friable, déminéralisé, poreux et les protéines fortement hydratées ;

- la coagulation mixte obtenue lorsqu'au moment de la coagulation le lait présente une acidité moyenne (pH 5,5 à 6,5) et qu'une dose de présure intermédiaire est utilisée (Goudédranche et al., 2001a).

Dans le cas des bleus, la coagulation est généralement mixte mais avec différents niveaux de présure. On distingue ainsi deux grandes classes de pâtes molles persillées (Goudédranche et al., 2001b) dont certaines bénéficient d'une AOP :

- les bleus dits « à pâte douce » (Gorgonzola, bleu de Gex, bleu de Bresse, Fourme d'Ambert), à caractère mixte à tendance présure ;

- les bleus dits « forts » (bleu d'Auvergne, Roquefort), à dominance lactique.

Elle est habituellement réalisée à une température comprise entre 28 et 34°C pendant approximativement 2,5 à 4 heures.

Même si dans certains cas l'ajout de ferments lactiques est interdit, les bactéries lactiques les plus communément utilisées pour produire les bleus sont les espèces mésophiles *Leuconostoc mesenteroides* (hétérofermentaire) et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ou *cremoris* (homofermentaire) (Cantor et al., 2004) ainsi que les espèces thermophiles *Streptococcus thermophilus* ou *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Cantor et al., 2004; Gobbetti et al., 1997a).

Les cultures primaires ont au moins deux rôles importants durant cette étape de coagulation.

Le rôle principal est, comme indiqué précédemment, d'acidifier le lait en métabolisant le lactose en acide lactique mais certaines cultures possèdent également un rôle dans la formation de gaz qui influe sur la structure du caillé. Plus précisément, les bactéries lactiques homofermentaires et thermophiles sont utilisées pour acidifier le lait tandis que les espèces hétérofermentaires sont utilisées non seulement pour leur capacité à produire de l'acide lactique mais également de l'éthanol, de l'acétate et du CO<sub>2</sub>. En effet, la production de CO<sub>2</sub> est essentielle pour créer des cavités dans le caillé et ainsi faciliter les échanges gazeux et le développement ultérieur de *P. roqueforti*. Au cours de la première semaine de production et selon le type de fromage produit, le pH est généralement compris entre 4,4 et 5,1 (Alonso et al., 1987; Cantor et al., 2004; Gobbetti et al., 1997a; Prieto et al., 2000). Le pH est considéré comme un paramètre très important car il affecte directement la texture du caillé en influant sur la solubilité des caséines (McSweeney, 2004) et a donc un impact sur la texture finale du fromage.

Concernant *P. roqueforti*, il s'agit d'une espèce clé dans l'élaboration des fromages à pâte persillée. *P. roqueforti* est ensemencé sous forme de spores ou conidies. Ces dernières sont soit

ajoutées au lait en début de coagulation, pulvérisées à la surface du caillé ou bien viennent naturellement coloniser le caillé dans le cas des productions les plus artisanales. Dans certains cas, les cultures servant à produire les spores de *P. roqueforti* sont réalisées sur du pain de seigle et de blé. *P. roqueforti* est impliqué dans l'assimilation de nombreux substrats dont les sucres (lactose, glucose, galactose). Il est capable de métaboliser le lactate et le citrate et est bien adapté aux conditions de pH, d' $a_w$ , de concentrations en NaCl, de basses températures et aux faibles concentrations en oxygène généralement rencontrées lors de la production de fromages à pâte persillée (Cantor et al., 2004; Cerning et al., 1987; Vivier et al., 1992).

### **2.3.3. Egouttage**

L'égouttage est l'étape de concentration des éléments du lait au cours de laquelle les liaisons moléculaires qui se créent entre les caséines et les différents minéraux entraînent une contraction spontanée du coagulum expulsant ainsi le lactosérum, mélange d'eau et de solutés (protéines sériques, minéraux solubles, lactose, composés azotés non protéiques). Ce phénomène naturel porte le nom de synérèse. L'égouttage s'effectue à ce moment-là simplement par gravité. Cependant, étant relativement lent et limité, il peut être accéléré en utilisant différents procédés : centrifugation, découpage, pressage, retournement ou encore traitement thermique. L'utilisation de l'une ou l'autre ou d'une combinaison de ces techniques va, entre autres, dépendre du caractère présure ou lactique du coagulum (Goudéranche et al., 2001a). Cet éventail de possibilités explique une nouvelle fois la diversité fromagère observée. Dans le cas d'un coagulum-présure, un égouttage précoce est généralement recherché avec une acidification limitée. Pour cela, le coagulum est découpé, pressé et parfois chauffé. Dans le cas d'un coagulum acide, l'acidification est terminée et l'écoulement se fait essentiellement par gravité avec retournement voire par centrifugation en fonction de la texture recherchée. Dans le cas des fromages à caillé mixte, l'acidification se poursuit lors de l'égouttage et joue un rôle sur la déminéralisation (calcium en particulier). De ce fait, le mode de découpage ainsi que le suivi de l'acidification et de l'égouttage sont capitaux pour contrôler la minéralisation du fromage.

En ce qui concerne les bleus, après que le lait ait coagulé, le caillé est généralement découpé en dés de 1,5 à 3 cm de côté avant d'être brassé en cuve afin que le lactosérum résiduel soit évacué. Les dés sont ensuite placés dans des moules perforés qui permettent de poursuivre et terminer l'égouttage. Généralement, de simples retournements sont réalisés afin de faciliter une nouvelle fois l'égouttage. Au moment du travail en cuve et du moulage des fromages à pâte persillée,

l'objectif principal est de retarder la soudure des grains et d'éviter de compacter le caillé (Goudédranche et al., 2001a).

#### **2.3.4. Salage**

L'étape de salage se caractérise par l'incorporation de chlorure de sodium au fromage. Deux procédés de salage peuvent être utilisés : le salage à sec (par saupoudrage à la main ou à la machine, par frottement ou par incorporation dans le caillé) ou le salage en saumure généralement saturée (318 g/litre à 20°C) et ce, durant un temps pouvant varier de quelques minutes à plusieurs heures voire plusieurs jours selon la taille du fromage et le taux de sel recherché (Cantor et al., 2004; Guinee and Fox, 2004).

Le salage peut être réalisé par frottement au sel sec à la surface du caillé dans le cas du Roquefort, par incorporation au caillé chaud lors de la mise en moule pour la Fourme d'Ambert ou encore par trempage en saumure saturée dans le cas des bleus de Bresse et Danablu.

Après salage, le sel est généralement concentré dans les couches les plus superficielles du fromage et au cours de l'affinage un gradient de concentration de l'extérieur vers l'intérieur va ainsi se former. Les concentrations finales en sel des fromages à pâte persillée sont généralement comprises entre 2 et 5% (Gobbetti et al., 1997b; Hansen and Jakobsen, 2001; Madkor et al., 1987; Prieto et al., 2000; Zarpoutis et al., 1997, 1996).

Plusieurs rôles sont attribués au chlorure de sodium. Il permet tout d'abord de compléter l'égouttage. En effet, il entraîne une modification de l'hydratation des protéines qui a pour conséquence de faciliter le drainage du lactosérum (Goudédranche et al., 2001a). Il a également une incidence sur l'activité de l'eau que ce soit à l'intérieur ou en surface du fromage, et conditionne de ce fait le développement des micro-organismes et les activités enzymatiques au cours de l'affinage. Concernant le développement microbiologique, le chlorure de sodium joue un rôle particulier dans l'inhibition de micro-organismes indésirables (pathogènes ou d'altération) et favorise le développement du microbiote halotolérant ayant un rôle prépondérant dans le processus d'affinage (Guinee and Fox, 2004). Enfin, il joue le rôle d'exhausteur en relevant le goût de certaines substances formées au cours de l'affinage.

Les fromages à pâte persillée sont ensuite généralement percés de part en part avec des aiguilles. Cette étape a deux objectifs : permettre la sortie du CO<sub>2</sub> produit par les bactéries lactiques acidifiantes comme les espèces hétérofermentaires appartenant au genre *Leuconostoc* et favoriser l'entrée de l'air dans le cœur du fromage afin de créer des conditions favorables au bon développement de *P. roqueforti*.

### 2.3.5. Affinage

L'affinage correspond à un ensemble de réactions enzymatiques, simultanées ou successives, ayant lieu au niveau du caillé. Il se caractérise par la transformation des constituants du caillé (en fin d'égouttage) qui peuvent entraîner une modification des caractéristiques aromatiques, de la texture, de la couleur et des caractéristiques physico-chimiques et nutritionnelles du fromage (McSweeney, 2004). Il s'agit d'un processus extrêmement complexe de par la nature du substrat, la diversité des agents impliqués, la variété des transformations et du nombre de produits formés. A l'exception des fromages à pâte fraîche et des fromages fondus, tous les types de fromages sont affinés et les caractéristiques organoleptiques des différentes variétés résultent en réalité de deux composantes majeures : leur processus de fabrication (vu précédemment) et leur microbiote (voir ci-après) qui peuvent différer en tout ou partie d'une variété à une autre (Beresford and Williams, 2004). Une grande partie de la diversité et de la typicité des fromages résulte ainsi du microbiote qui leur est associé.

Concernant les fromages à pâte persillée, la période d'affinage peut varier de quelques semaines à plusieurs mois (**Tableau 3**). Des périodes d'affinage courtes sont par exemple respectées pour des fromages comme la Fourme d'Ambert ou le Bleu d'Auvergne (de 3 à 8 semaines) alors que le Gorgonzola est affiné pendant environ 3 mois. Le Stilton et le Cabrales sont eux affinés pendant des périodes un peu plus longues qui peuvent aller jusqu'à 4 à 5 mois. Enfin, des périodes d'affinage plus longues encore peuvent être respectées pour le Roquefort (jusqu'à 9 mois).

D'un point de vue technique, l'affinage est généralement réalisé dans des salles prévues à cet effet comme des hâloirs ou des caves, comme c'est le cas pour le fromage de Roquefort. Plusieurs paramètres dont la température et l'hygrométrie sont généralement maîtrisées lors de cette étape. La germination, la croissance et la sporulation de *P. roqueforti* a lieu durant cette phase d'affinage. L'affinage se déroule à basses températures, généralement comprises entre 8 à 15°C et à des niveaux d'humidité relative élevés (85-95 %), des variations étant observées selon le type de bleu (Ardö, 2011).

Dans tous les cas, l'étape d'affinage suit des règles bien précises en fonction de leur appellation comme c'est le cas pour le Roquefort. La particularité du Roquefort est qu'il doit être affiné et mûri pendant une période minimale de 90 jours à compter de son jour de fabrication. Au cours de cette période, il est procédé à un affinage, suivi d'une maturation à température dirigée. L'affinage est réalisé dans les caves situées dans la zone des éboulis de la montagne du Combalou (commune de Roquefort-sur-Soulzon) parcourues naturellement par les courants d'air frais et humides provenant des failles calcaires, dites « fleurines » de cette montagne. Le

fromage est exposé à nu dans lesdites caves pendant la durée nécessaire au bon développement de *P. roqueforti*, cette durée ne pouvant en aucun cas être inférieure à deux semaines. Une maturation lente sous emballage protecteur (étape d'emballage à l'aide d'une feuille d'étain nommée « plombage ») se poursuit dans ces caves ou dans des salles à température dirigée dans lesquelles les fromages sont entreposés. Cette étape de « plombage » a entre autres effets de limiter les échanges gazeux et de créer des conditions d'anaérobiose partielle. Elle permet également de prévenir le développement de micro-organismes d'altération à la surface du fromage, et de ralentir la croissance et le métabolisme de *P. roqueforti*. Une partie des producteurs de Roquefort placent, après les 15 jours d'affinage en cave, leurs fromages à une température comprise entre -2 et -4°C et ce jusqu'à 3 mois (durée minimale d'affinage). La baisse rapide d'O<sub>2</sub> disponible crée des conditions d'anaérobiose partielle.

L'affinage est une étape importante et complexe entraînant des changements multiples tant au niveau des facteurs biotiques et abiotiques du microenvironnement, de la croissance microbienne et des communautés qu'au niveau de la composition biochimique. Des gradients importants de NaCl, de pH, d'a<sub>w</sub> et de composition en gaz (O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> en particulier) peuvent être observés aussi bien que divers changements biochimiques résultant de la lipolyse, la protéolyse et de la formation d'arômes. Plusieurs études de suivi des paramètres physico-chimiques réalisées tout au long de l'affinage sur des fromages à pâte persillée sont disponibles (Diezhandino et al., 2015; González de Llano et al., 1992; Prieto et al., 2000). Le **Tableau 4** présentant les résultats de Diezhandino et al. (2015) illustre ces changements biochimiques.

**Tableau 4 : Evolution des paramètres physico-chimiques durant l'affinage du Valdeón, un fromage à pâte persillée espagnol (d'après Diezhandino et al., 2015)**

	2 jours	15 jours	30 jours	60 jours	90 jours	120 jours	
<b>Extrait sec<sup>a</sup></b>	51,93 ± 2,32	57,15 ± 2,98	58,61 ± 2,59	60,87 ± 2,79	61,78 ± 2,87	62,74 ± 2,41	***
<b>Protéines<sup>b</sup></b>	34,53 ± 2,33	33,56 ± 1,27	33,82 ± 1,62	33,93 ± 1,73	34,35 ± 1,31	33,98 ± 1,39	NS
<b>Matières grasses<sup>b</sup></b>	53,62 ± 1,19	53,15 ± 1,10	56,10 ± 2,16	55,50 ± 2,23	56,33 ± 1,09	57,29 ± 1,92	***
<b>Lactose<sup>b</sup></b>	0,78 ± 0,30	0,18 ± 0,12	0,11 ± 0,10	0,14 ± 0,15	0,09 ± 0,10	0,07 ± 0,10	***
<b>Acide D-lactique<sup>b</sup></b>	0,33 ± 0,19	0,64 ± 0,39	0,36 ± 0,23	0,16 ± 0,14	0,17 ± 0,15	0,10 ± 0,10	***
<b>Acide L-lactique<sup>b</sup></b>	3,24 ± 0,33	2,23 ± 0,51	1,21 ± 0,48	0,49 ± 0,24	0,43 ± 0,23	0,38 ± 0,21	***
<b>NaCl<sup>b</sup></b>	1,85 ± 0,76	4,68 ± 0,42	4,78 ± 0,30	4,86 ± 0,35	4,78 ± 0,44	5,33 ± 1,05	***
<b>Sel/phase aqueuse<sup>c</sup></b>	2,03 ± 0,87	6,25 ± 0,48	6,78 ± 0,58	7,60 ± 0,96	7,79 ± 1,24	8,92 ± 1,12	***
<b>pH</b>	5,03 ± 0,14	5,19 ± 0,13	5,97 ± 0,27	7,08 ± 0,39	6,83 ± 0,37	6,85 ± 0,41	***
<b>Aw</b>	0,979 ± 0,006	0,956 ± 0,004	0,945 ± 0,007	0,937 ± 0,008	0,928 ± 0,008	0,917 ± 0,006	***

La dernière colonne montre les différences significatives calculées lors l'affinage. NS : Pas de différences significatives ; \*\*\* p < 0,001.

<sup>a</sup> exprimé en g pour 100 g de fromage

<sup>b</sup> exprimé en g pour 100 g d'extrait sec

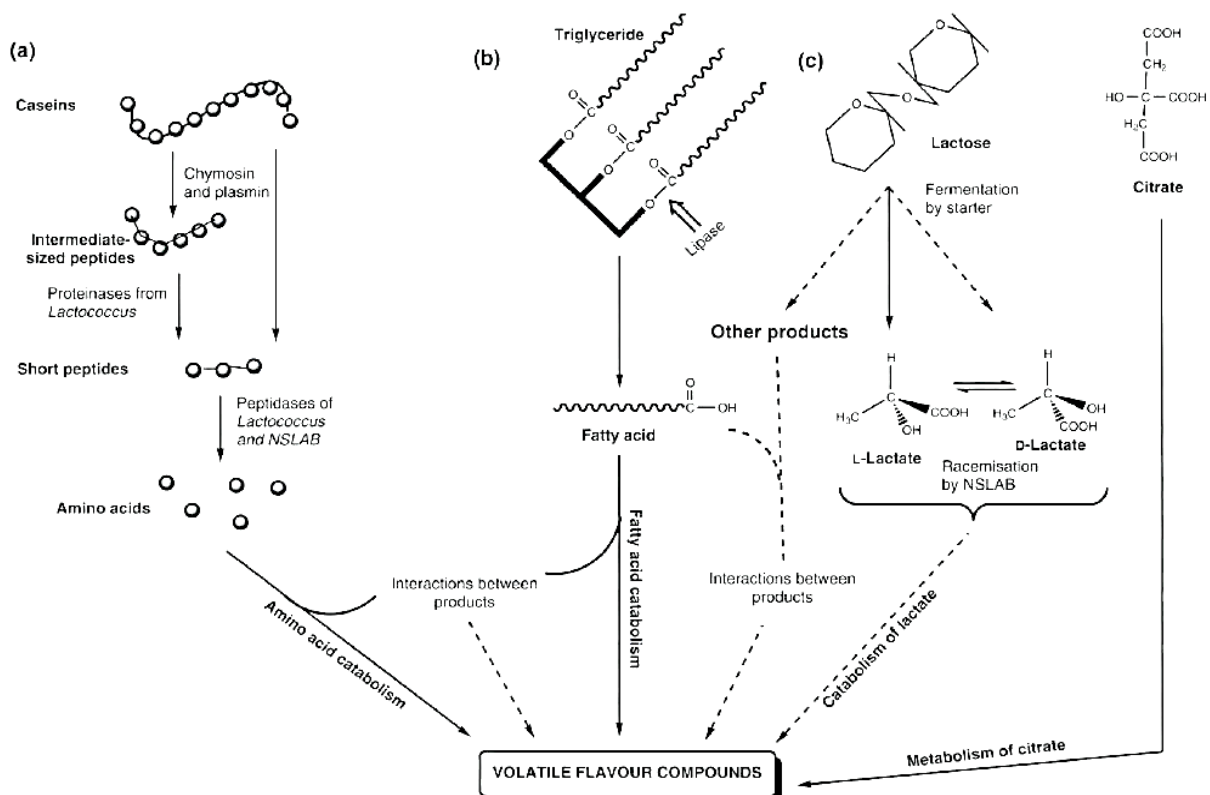
<sup>c</sup> exprimé en g de sel pour 100 g de phase aqueuse

Certains paramètres peuvent être fortement influencés par la présence de nombreuses espèces microbiennes et par leurs activités métaboliques respectives, ayant un impact sur la qualité de produit fini.

Comme vu précédemment, ces espèces peuvent être inoculées durant les étapes précédant l’affinage ou bien provenir spontanément de l’environnement de production.

On distingue en particulier les bactéries lactiques acidifiantes (cultures « starter » et « non-starter », principalement les espèces hétérofermentaires facultatives), les levures (principalement *Debaryomyces hansenii* et dans une moindre mesure *Kluyveromyces marxianus* ou *Yarrowia lipolytica*) et *P. roqueforti*, ce dernier étant réparti de manière hétérogène (Martín and Coton, 2015). *P. roqueforti* joue clairement un rôle prépondérant pendant cette étape en raison de ses activités enzymatiques dominantes.

Les réactions biochimiques les plus notables lors de l’affinage des fromages peuvent être regroupées en quatre grandes catégories: i) la glycolyse du lactose résiduel et la transformation du lactate, ii) la dégradation du citrate (très important pour certaines variétés de fromage), iii) la lipolyse et la dégradation des acides gras libres et iv) la protéolyse et le catabolisme des acides aminés (**Figure 11**) (McSweeney, 2004).



**Figure 11 : Aperçu des différentes voies de biosynthèses menant à la production de composés aromatiques volatiles lors de l’affinage (d’après McSweeney, 2004)**

Les enzymes impliquées dans ces réactions peuvent avoir des origines diverses. En effet, elles peuvent provenir à la fois du lait, des agents coagulants ajoutés ou encore des différents micro-organismes (bactéries, levures et moisissures).

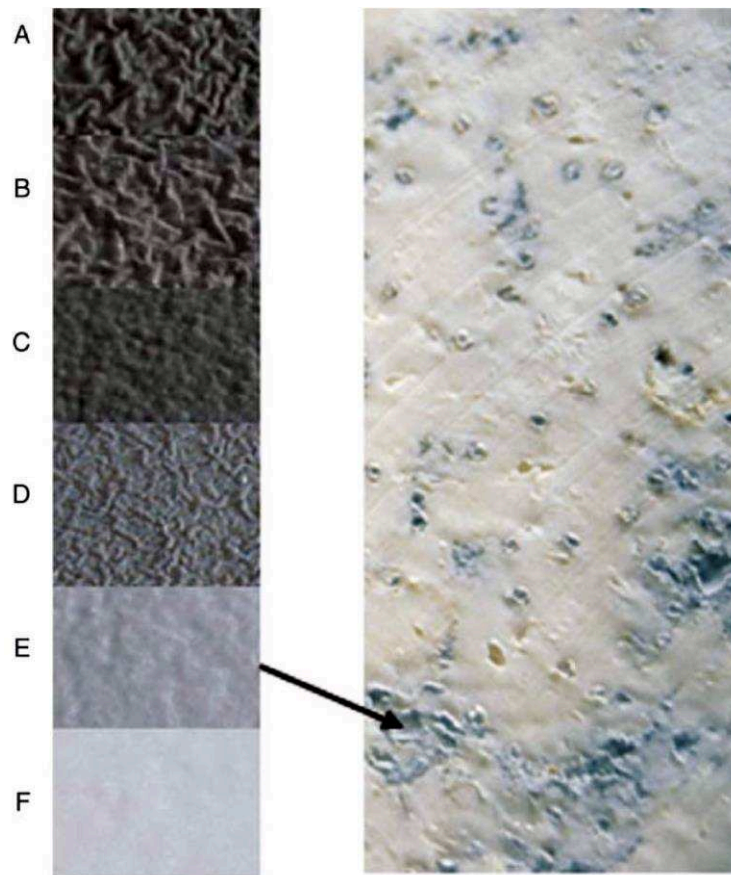
Ainsi, le lactose est hydrolysé à l'intérieur de la cellule en glucose et galactose, eux-mêmes dégradés par différentes voies métaboliques, l'acide lactique sous forme lactate étant le métabolite majeur issu de cette transformation. Ce dernier joue un rôle extrêmement important car il règle le pH du caillé et régule ainsi les activités microbiennes et enzymatiques ainsi que les réactions chimiques et biochimiques. D'autres composés comme le CO<sub>2</sub>, l'eau, l'éthanol, les acides acétique, formique et succinique, le galactose... peuvent être issus de la transformation du lactose. Par exemple, le lactate peut être transformé en acides acétique et propionique et en CO<sub>2</sub> lors de la fermentation propionique. De même, *Clostridium tyrobutyricum* est capable de produire les acides butyrique et acétique, du CO<sub>2</sub> et du H<sub>2</sub> via la fermentation butyrique. Et lorsque celle-ci est importante, elle peut nuire aux qualités organoleptiques du fromage.

La matière grasse du lait, essentiellement composée de triglycérides, subit elle aussi des transformations. Les lipases peuvent avoir des origines diverses. Tout d'abord, une lipoprotéine lipase est issue directement du lait. Cependant, cette dernière est susceptible d'être affectée par les traitements thermiques. Ensuite, elles peuvent être d'origine microbienne (bactéries, levures et moisissures), les moisissures étant les micro-organismes les plus lipolytiques dans les fromages. Enfin, elles peuvent avoir été intentionnellement ajoutées afin d'obtenir une lipolyse intense recherchée pour certains fromages. Dans tous les cas, les acides gras ainsi formés peuvent ensuite être métabolisés et entrer dans les voies de biosynthèses menant à des composés comme les méthylcétones, les alcools secondaires, les esters ou les lactones (voir paragraphes 3.6.1 et 3.6.3).

Les protéines subissent, quant à elles, une série de transformations menant à des éléments peptidiques de poids moléculaire de plus en plus faible (polypeptides, peptides, acides aminés, ammoniac). Ces transformations jouent un rôle important sur la texture et le profil aromatique des fromages. On distingue les protéases coagulantes, les plasmines et les protéases et peptidases issues des différents micro-organismes.

Pour revenir plus globalement aux fromages à pâte persillée, la technologie fromagère a bien évidemment son importance dans la définition des caractéristiques organoleptiques du produit fini mais il apparaît également que l'action de *P. roqueforti* est prépondérante. De plus, des variations considérables peuvent exister entre les souches de *P. roqueforti* en termes d'activités lipolytique et protéolytique (Gallois and Langlois, 1990) mais également en termes de

pigmentation des conidies (**Figure 12**), d'halotolérance, de caractéristiques de germination et de croissance ainsi que de réponse aux facteurs environnementaux (Ratray and Eppert, 2011).



**Figure 12 : Exemple des différences de couleur observables entre six souches (A-F) de *Penicillium roqueforti*. Le fromage illustré par le développement de la souche E est un Gorgonzola (d'après Ratray and Eppert, 2011).**

Ainsi, le choix de la souche de *P. roqueforti* apparaît clairement comme primordial lorsque des qualités organoleptiques particulières sont recherchées.

*L'objectif du chapitre suivant sera avant tout de présenter un état de l'art des connaissances sur la moisissure *P. roqueforti* mais également de revenir sur son importance dans le contexte fromager.*



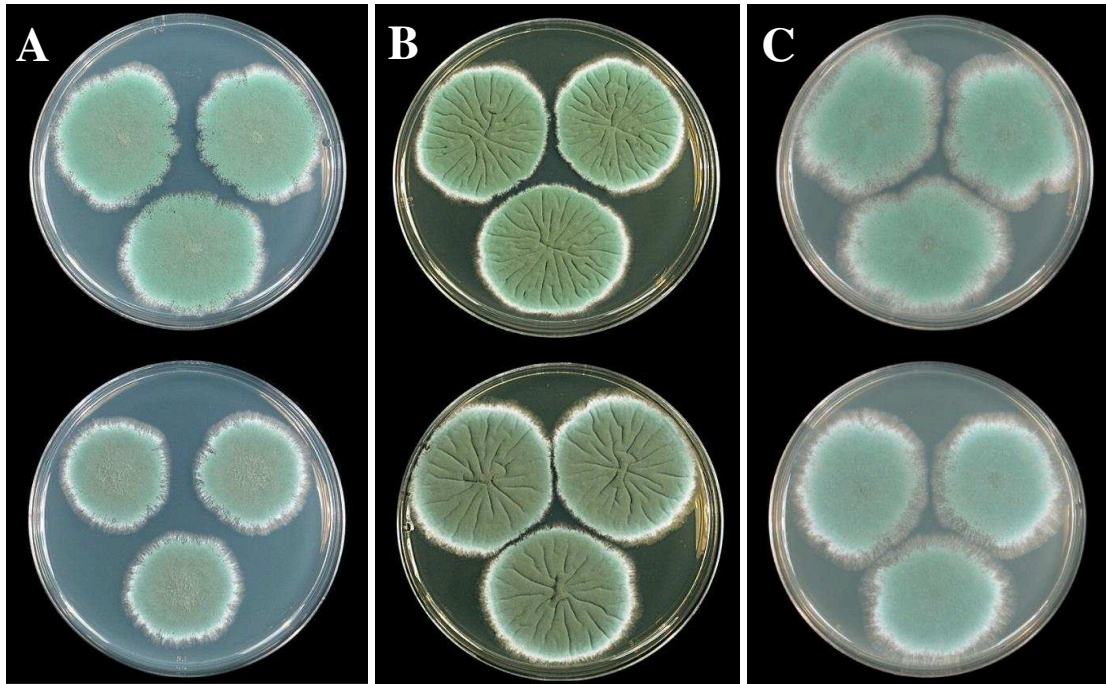
### 3. *Penicillium roqueforti* Thom

#### 3.1. Synonymie

= *P. aromaticum-casei*, *P. vesiculosum*, *P. roqueforti* var. *weidemannii*, *P. atroviride*, *P. virescens*, *P. gorgonzolae*, *P. aromaticum*, *P. weidemannii*, *P. stilton*, *P. weidemannii* var. *fuscum*, *P. biourgei*, *P. roqueforti* var. *viride*, *P. roqueforti* var. *weidemannii*, *P. conservandi*, *P. glaucum*, *P. suavolens* (Cantor et al., 2004; Samson et al., 2010).

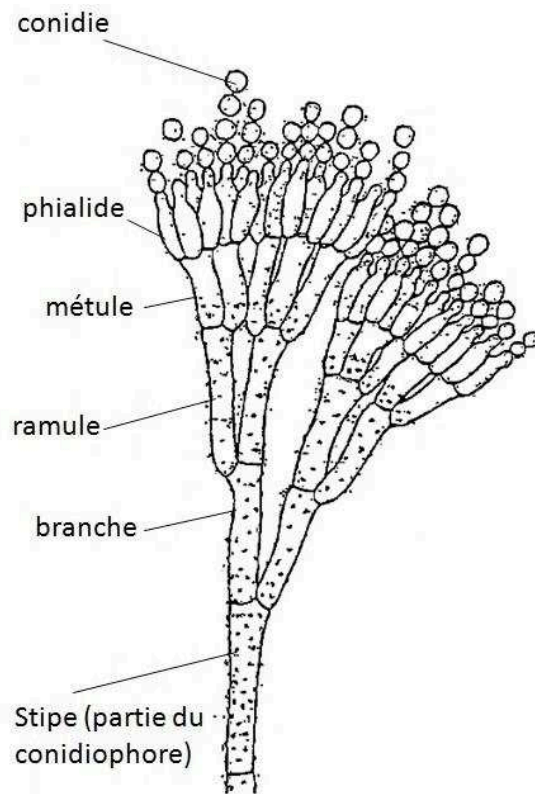
#### 3.2. Morphologie

*P. roqueforti* est un champignon qui se développe rapidement sur milieux MEA et CYA en atteignant un diamètre généralement compris entre 40 et 70 mm après 7 jours de croissance à 25°C (Pitt and Hocking, 2009). Le champignon est caractérisé par un thalle ras à l'aspect de velours, un mycélium blanc et une production de conidies modérée à intense qui explique en partie la gamme de couleur étendue observée. Les conidies arborent généralement des nuances de couleur bleu-verte et sont occasionnellement accompagnées de gouttelettes d'exsudat à l'aspect hyalin (Samson et al., 2010). Cependant, il est très souvent observé plusieurs nuances de couleurs au sein d'un même thalle. Ainsi, une couleur grisâtre presque blanche avec des reflets turquoise peut être observée à la marge alors que le reste du thalle sera d'un vert qualifié de terne et que le centre de la colonie sera de couleur olive-brune. Il en est de même pour le revers, pouvant être très pâle, mais pouvant également aller jusqu'à des nuances plus sombres de vert. La marge de la colonie est généralement de forme arachnoïde (Samson et al., 2010). Le diamètre des colonies sur G25N est habituellement compris entre 20 et 22 mm après 7 jours d'incubation à 25°C mais la marge est parfois plus étalée et amène le diamètre jusqu'à 28 mm. Les couleurs observées sont généralement similaires à celles observées sur CYA et MEA. Sur CYA, les colonies mesurent entre 2 et 5 mm de diamètre après 7 jours de croissance à 5°C et le champignon ne se développe pas à 37°C (Pitt and Hocking, 2009). Sur milieu solide YES, le diamètre de croissance est généralement compris entre 38 et 71 mm après 7 jours de croissance à 25°C. Le degré de sporulation est lui très élevé et le revers est d'un vert très foncé. Sur milieu CREA, une bonne croissance est observée mais pas de production d'acides (Samson et al., 2010). Sur CSN, les colonies mesurent entre 25 et 40 mm de diamètre après 7 jours de croissance à 25°C, la croissance est importante (même si peu profonde), la réaction au milieu est variable, d'acide (jaune) à alcalin (violet). Le revers est habituellement violet (Pitt and Hocking, 2009). La **Figure 13** illustre l'aspect de deux isolats de *Penicillium roqueforti* cultivées sur différents milieux cités précédemment.



**Figure 13 :** Morphologies de deux isolats de *Penicillium roqueforti*, KE28G (haut) et LS04A (bas), cultivées sur CYA (A), YES (B) et MEA (C) pendant 7 jours à 25°C (adapté de O'Brien et al., 2008).

Au niveau microscopique, les conidiophores sont portés par des hyphes avec des stipes (hyphes supportant la structure de fructification, formant le conidiophore) dont la taille est comprise entre 100 et 200  $\mu\text{m}$  de long et 4 à 6,5  $\mu\text{m}$  de diamètre. Ces stipes sont en général ornementés et portent les grands pinceaux terminaux qui sont rarement biverticillés, généralement terverticillés et parfois tetraverticillés. Les métules cylindriques, habituellement ornementées à leur base, mesurent entre 10 et 15  $\mu\text{m}$  de long et 3 à 4,5  $\mu\text{m}$  de diamètre. Ces dernières portent entre 4 et 7 phialides. Les phialides cylindriques sont effilées à leur apex et mesurent entre 8 et 12  $\mu\text{m}$  de long et 3 à 3,5  $\mu\text{m}$  de diamètre. C'est à partir de ces phialides que les conidies généralement sphériques sont produites en chainettes, mesurant entre 4 et 6  $\mu\text{m}$  de diamètre. Les différents éléments constituant les pinceaux sont présentés dans la **Figure 14**. Enfin, des sclérotés peuvent se former au sein de cultures relativement âgées (Samson et al., 2010).



**Figure 14 : Présentation des différents éléments constituant un pinceau de *Penicillium roqueforti* (d'après Raper and Thom, 1949).**

### 3.3. Ecologie

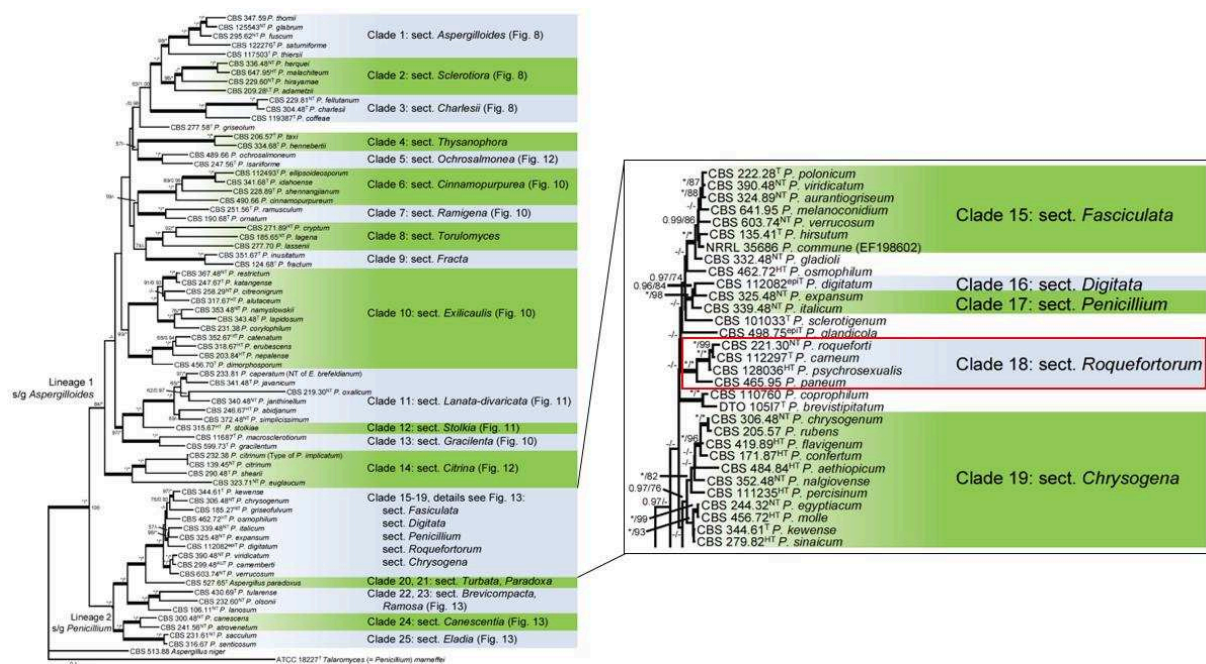
*P. roqueforti* est l'une des espèces les plus connues du genre *Penicillium* du fait de son utilisation ancestrale dans la fabrication de fromages à pâte persillée, et plus particulièrement du Roquefort qui lui a donné son nom. C'est un champignon saprophyte très répandu dans la nature. On le retrouve très fréquemment dans le sol et les déchets organiques en putréfaction comme le bois. Sa croissance se trouve favorisée dans des climats humides et des températures modérées. Il est fréquemment isolé de céréales, ensilage et autres matières premières végétales stockées en conditions micro-aérobie sur plusieurs saisons (Alonso et al., 2013; O'Brien et al., 2008, 2006; Ohmomo et al., 1994). Dans de telles conditions, certaines souches sont capables de produire une grande variété de métabolites secondaires dont des mycotoxines (PR toxine, roquefortine C et acide mycophénolique) qui altèrent donc ces produits destinés à l'alimentation animale (Alonso et al., 2013; O'Brien et al., 2006; Sumarah et al., 2005).

Sa capacité à croître rapidement à des températures de réfrigération fait que c'est un contaminant communément retrouvé sur les aliments conservés dans de telles conditions. A l'image de *P. commune*, il est aussi un contaminant de fromages, une des sources pouvant être le lait cru (Pitt and Hocking, 2009).

Du fait de sa résistance à un grand nombre de conservateurs, *P. roqueforti* a également déjà été isolé de pain de seigle emballé (Pitt and Hocking, 1997), même si *P. paneum* précédemment identifié comme *P. roqueforti* a sans doute été responsable d'une partie de la contamination. Moins fréquemment isolé de céréales que certaines autres espèces du même genre, *P. roqueforti* a cependant également déjà été retrouvé sur de l'orge, du riz, dans de la farine, sur des viennoiseries mais également sur de la viande, du bœuf séché, du salami, de la viande fumée (Pitt and Hocking, 1997).

### 3.4. Taxonomie

Historiquement, *P. roqueforti* a été identifié pour la première fois par Charles Thom en 1906 (Thom, 1906) et en réalité, l'espèce ainsi décrite comprenait plus d'un taxon (Frisvad and Samson, 2004). Deux variétés furent tout d'abord reconnues par Frisvad et Filtenborg (1989) : *P. roqueforti* var. *roqueforti*, utilisé pour la fabrication de fromage, et *P. roqueforti* var. *carneum*, un contaminant. Ces variétés différaient du point de vue de leur production en mycotoxines et dans une certaine mesure au niveau écologique. Quelques années plus tard et sur la base de différences observées aux niveaux moléculaires et biochimiques, Boysen et al. (1996) séparèrent *P. roqueforti* en trois espèces : *P. roqueforti*, *P. carneum* et *P. paneum*. Des analyses ultérieures prenant en compte, pour la plupart, plusieurs paramètres (morphologie, production de métabolites, analyse d'un ou plusieurs gènes) confirmèrent l'existence de trois espèces distinctes (Frisvad and Samson, 2004; Karlshøj and Larsen, 2005; Samson et al., 2004). Par la suite, sur la base de caractères phénotypiques comme la formation de cléistothèces, par comparaison des métabolites produits et par comparaison génomique de séquences partielles de gènes, Houbraken et al. (2010) ont mis en évidence l'existence d'une nouvelle espèce, *P. psychrosexualis*, appartenant à la section *Roqueforti* (Frisvad and Samson, 2004) rebaptisée plus récemment section *Roquefortorum* à la suite d'une étude portant sur le genre *Penicillium* et la famille des *Trichocomaceae* (Houbraken and Samson, 2011). Visagie et al. (2014) ont confirmé cette dernière dénomination. La classification actuelle de *P. roqueforti* Thom est donc la suivante : Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Eurotiales, Aspergillaceae, genus *Penicillium* sensu stricto, subgenus *Penicillium*, section *Roquefortorum*, species *roqueforti* (Houbraken and Samson, 2011) (**Figure 15**).



**Figure 15 : Représentation des relations phylogénétiques au sein du genre *Penicillium* divisé en 25 sections (Houbraken and Samson, 2011) avec un focus particulier sur la section Roquefortorum. Cette représentation est basée sur l'analyse et la concaténation des séquences partielles des gènes *cct8*, *tsr1*, *rpb1* et *rpb2*. La représentation de l'encadrée se base sur l'analyse de la séquence partielle du gène *rpb2*.**

### 3.5. Physiologie

Tout d'abord, *P. roqueforti* est psychrotolérant. En effet, il croît très bien à des températures de réfrigération. Sa température de croissance optimale est en réalité proche de 25°C et il ne se développe pas au-dessus de 35°C (Moreau, 1980). Même si son développement est favorisé à un pH proche de 4, il croît au sein d'une large gamme de pH (3-10,5) (Moreau, 1980), tolérant, de plus, la présence d'acides faibles utilisés comme conservateurs. En effet, il a été montré que *P. roqueforti* était capable de croître en présence de 0,5% d'acide acétique, une propriété utilisée par Engel et Teuber (1978) pour mettre au point un milieu sélectif. Ces mêmes travaux ont également mis en évidence que la grande majorité des souches de *P. roqueforti* était capables de croître en présence de 0,2% d'acide propionique ou encore de 4% d'acide lactique. C'est précisément sa capacité à métaboliser l'acide lactique, provoquant une augmentation du pH du milieu, qui explique en partie son développement et son importance dans le processus d'élaboration des fromages à pâte persillée. Suhr and Nielsen (2004) ont eux montré que sa croissance était stimulée en présence de 0,3% d'acide propionique à une valeur d'*a<sub>w</sub>* égale à 0,97. Une certaine tolérance à l'acide sorbique a aussi été observée (Bullerman, 1984; Liewen and Marth, 1984), suivie de la dégradation de ce dernier (Finol et al., 1982).

Concernant l' $a_w$ , la germination des conidies, à des valeurs d' $a_w$  égales à 0,89 et 0,92, a lieu que ce soit à 25 ou 30°C mais ne se produit par contre pas à 37°C ou à des valeurs d' $a_w$  inférieures (Gock et al., 2003). De hautes valeurs d' $a_w$  semblent donc primordiales pour son développement. En effet, la croissance de *P. roqueforti* est grandement affectée par des concentrations élevées en NaCl, connu pour faire diminuer l' $a_w$ . Elle est, par exemple, stimulée jusqu'à des concentrations atteignant 3,5% pour une  $a_w$  de 0,98 (même si la limite est souche-dépendante) tandis que pour des concentrations plus élevées le taux de croissance diminue de 92% ( $a_w$  de 0,92) en comparaison à l'optimum de croissance à une  $a_w$  de 0,98 (Cantor et al., 2004).

La germination des conidies de *P. roqueforti* est, elle, favorisée pour des concentrations en NaCl comprises entre 1 et 3% pour la majorité des souches même si des différences au niveau de la tolérance en NaCl ont été observées (López-Díaz et al., 1996).

Des résultats récemment obtenus au sein du LUBEM ont permis de confirmer certaines tendances présentées précédemment (K. Rigalma, communication personnelle). Ainsi, les travaux menés ont permis de mettre en évidence que les isolats de *P. roqueforti* étudiés étaient capable de se développer à des températures comprises entre 5 et 30°C (optimal de croissance à 25°C), à des pH compris entre 3 et 8 (optimal de croissance à pH 4) et à une  $a_w$  comprise entre 0,88 et 0,99 (optimal de croissance à une  $a_w$  de 0,97).

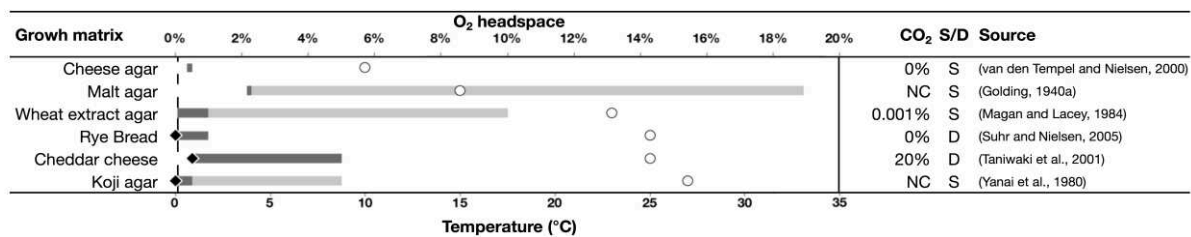
Mais ce qui distingue le plus *P. roqueforti* vis-à-vis d'autres espèces du même genre est très vraisemblablement qu'il apparaît comme ayant les besoins les moins importants en oxygène pour croître (Pitt and Hocking, 2009) et montre également une tolérance élevée aux fortes concentrations en CO<sub>2</sub> comme le montre, entre autres, l'étude de Suhr & Nielsen (2005). En effet, le développement de *P. roqueforti* sur pain de seigle dans une atmosphère modifiée contenant 0,03% d'O<sub>2</sub> et presque 100% de CO<sub>2</sub> a été rapportée (Suhr and Nielsen, 2005).

Ces propriétés sont sans aucun doute une des raisons majeures expliquant la tolérance de cette espèce aux conditions micro-aérobies retrouvées en particulier au niveau des cavités internes des fromages à pâte persillée et des ensilages.

La **Figure 16** récapitule les résultats d'une très grande partie des études réalisées sur l'impact des concentrations en gaz sur la croissance de *P. roqueforti*.



A



B

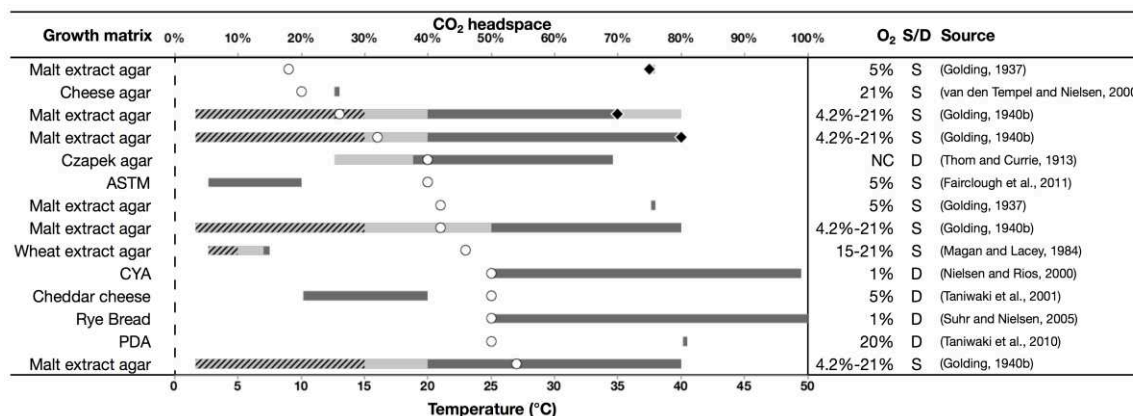


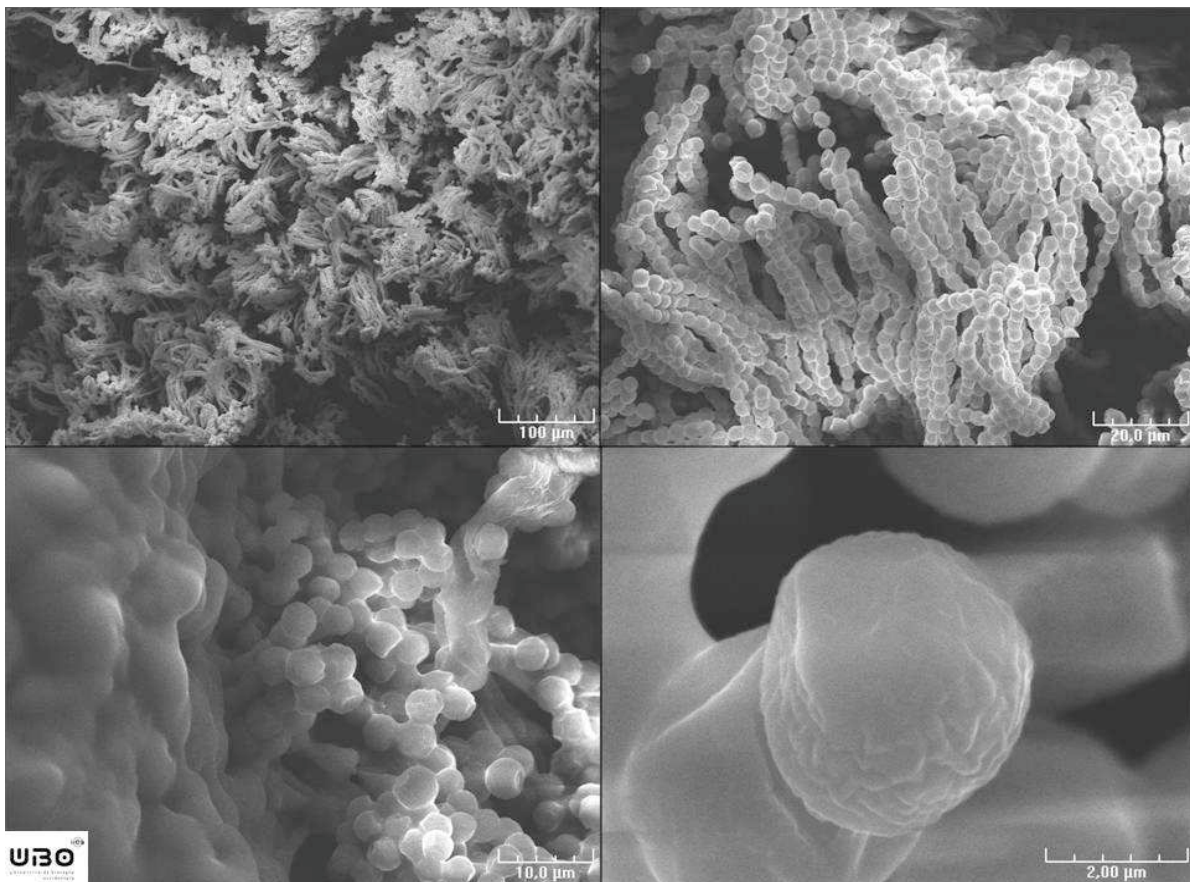
Figure 16 : Effet du O<sub>2</sub> (A) et CO<sub>2</sub> (B) sur la réponse physiologique de *Penicillium roqueforti* (adapté de Nguyen Van Long and Dantigny, 2016). Les bandes gris clair et gris foncé correspondent respectivement aux concentrations testées et à celles entraînant une inhibition partielle de la croissance. Les losanges noirs marquent le niveau à partir duquel une inhibition totale est observée. Les bandes zébrées correspondent aux concentrations entraînant une stimulation de la croissance. Les cercles indiquent la température à laquelle les expérimentations ont été réalisées. Les études ont été réalisées en conditions statique (S) ou dynamique (D).

### 3.6. Participation au processus d'affinage des fromages à pâte persillée

*P. roqueforti* joue un rôle fondamental dans le processus d'élaboration du fromage à pâte persillée, en accomplissant deux fonctions majeures : i) une désacidification du caillé, au moyen de la dégradation de l'acide lactique produit par les bactéries lactiques acidifiantes et ii) une sécrétion d'enzymes protéolytiques et lipolytiques dont l'action détermine les qualités organoleptiques (texture, goût et arômes) du produit fini.

Dans les paragraphes qui suivent, les activités enzymatiques, en particulier lipolytiques et protéolytiques, décrites chez *P. roqueforti* et menant entre autres à la production d'arômes seront plus longuement abordées.

Dans un premier temps, *P. roqueforti* utilise comme source de carbone l'acide lactique résultant de l'action des bactéries « starter ». La dégradation rapide et presque totale de l'acide lactique par *P. roqueforti* assure la neutralisation de la pâte. Il se développe au niveau des cavités issues en particulier de la production de dioxyde de carbone, conséquence principale du métabolisme hétérofermentaire des bactéries lactiques (genre *Leuconostoc*) (**Figure 17**).



**Figure 17 : Photographies de *Penicillium roqueforti* réalisées en Microscopie Electronique à Balayage. (Photographies réalisés par la plate-forme d'imagerie, de mesures en microscopie et de diffraction par rayons X de l'Université de Bretagne Occidentale, Pr. Jérôme Mounier, LUBEM).**

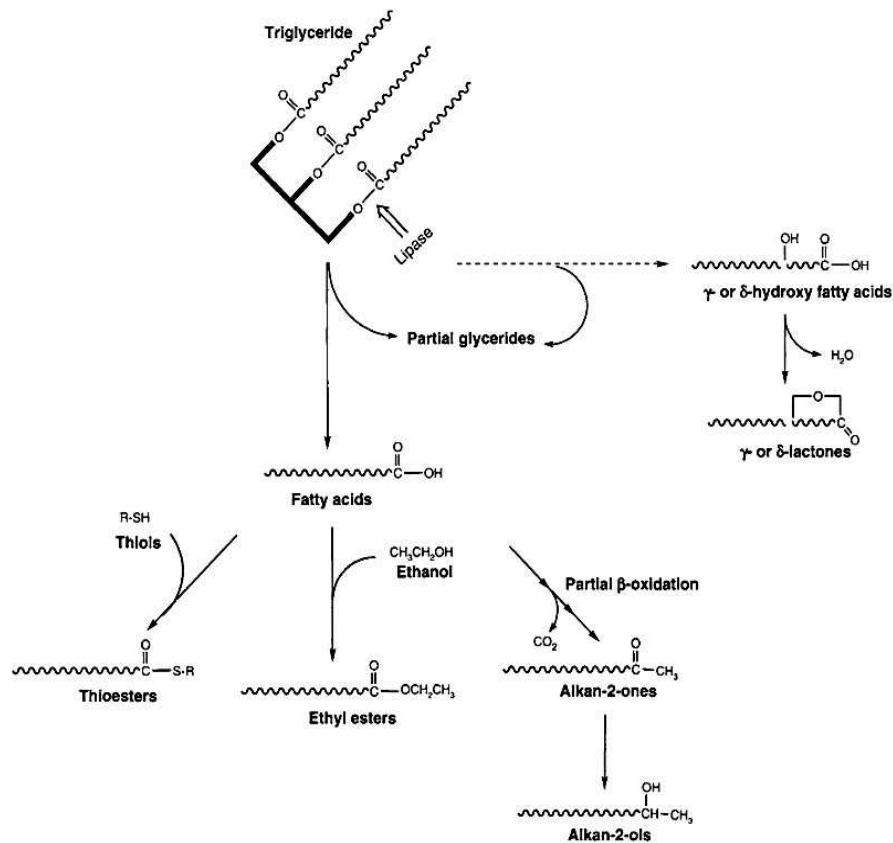
Les deux phénomènes les plus importants chez *P. roqueforti* sont la lipolyse et la protéolyse.

### **3.6.1. Lipolyse**

Les lipides retrouvés au niveau des fromages sont essentiellement des triglycérides et peuvent subir des dégradations oxydatives ou hydrolytiques. La dégradation enzymatique ou lipolyse de ces triglycérides libère des acides gras, avec formation de mono- ou diglycérides voire de glycérol, considérés comme essentiels dans le développement aromatique des fromages (McSweeney and Sousa, 2000). Dans le fromage, les acides gras libres sont les précurseurs de



beaucoup de composés d'arômes, comme les méthyl-cétones, les lactones, les esters, les alcanes et les alcools secondaires. Les différentes voies de dégradation possibles des acides gras sont schématisées dans la **Figure 18**.



**Figure 18 : Voies de dégradation possibles des acides gras (d'après Collins et al., 2004).**

Dans les fromages à pâte persillée, la lipolyse est particulièrement intense comparée aux autres fromages (**Tableau 5**). Cette dégradation des lipides est principalement issue de l'action des enzymes produites par *P. roqueforti* (Coghill, 1979; Gobbetti et al., 1997a; Kinsella and Hwang, 1976).

**Tableau 5 : Concentrations en acides gras libres (AGL) retrouvées au niveau de différents fromages (adapté de Cantor et al., 2004 et Martín and Coton, 2015).**

Nom du fromage	Concentration en AGL (mg.kg <sup>-1</sup> )	Référence
Gamonedo*	75685	González de Llano et al., 1992
Blue (US)*	35230	Woo et al., 1984
Cabrales*	33153	Alonso et al., 1987
Roquefort*	32453	Woo et al., 1984
Danablu*	32639	Cantor et al., 2004
Parmesan	13697	de la Fuente et al., 1993
Munster	6260	de León-González et al., 2000
Camembert	5066	de la Fuente et al., 1993
Brie	2678	Woo et al., 1984
Gruyère	1481	Woo et al., 1984
Cheddar	997 - 1028	Woo et al., 1984
Port Salut	700	Woo et al., 1984
Edam	356	Woo et al., 1984

\* : fromages à pâte persillée

*P. roqueforti* produirait au minimum 3 lipases. On distingue principalement deux lipases extracellulaires, une acide et une alcaline (Lamberet and Menassa, 1983; Mase et al., 1995; Menassa and Lamberet, 1982) ainsi qu'une lipase intracellulaire (Stepaniak et al., 1980).

La lipase extracellulaire acide a un pH optimum à 6,0 et un autre optimum à 2,8, avec une stabilité maximale pour un pH compris entre 3,7 et 6,0 (Gilles Lamberet and Menassa, 1983). La température optimale d'activité de cette enzyme est comprise entre 35 et 40°C même si une activité correspondant à 37% de l'activité maximale a été rapportée à 5°C.

Concernant la lipase extracellulaire alcaline, le pH optimum est compris entre 8,8 et 9,0 à 30°C et entre 9,0 et 10,0 à 20°C même si elle est active pour un pH compris entre 4,5 and 11,0 (Gilles Lamberet and Menassa, 1983). Lamberet et Menassa (1983) ont par exemple mis en évidence une activité équivalente à 15 et 20% de l'activité maximale à des pH égaux respectivement à 4,5 et 6,0.

L'importance relative des lipases acides et alcalines dans le fromage reste à déterminer même si quelques études s'y sont intéressées. Par exemple, Lamberet et Menassa (1983) ont étudié l'activité lipolytique à pH 5,5 sur tricaproïne et à pH 8,0 sur tributyrine. Ainsi, les auteurs ont montré que l'activité à pH 5,5 dominait et qu'à pH 8 seuls deux échantillons avaient une activité mesurable. Bien que le pH acide des fromages à pâte persillée favorise généralement l'activité de la lipase acide, il faut noter que la lipase alcaline a une activité plus importante sur la matière grasse laitière (Eitenmiller et al., 1970; Gilles Lamberet and Menassa, 1983; Lamberet and Menassa, 1983).

Grâce à ses enzymes, *P. roqueforti* domine ainsi la dégradation des lipides au niveau des fromages à pâte persillée même si d'autres agents lipolytiques sont également présents comme *Y. lipolytica* (Cantor et al., 2004).

Il faut souligner que l'étude des séquences des génomes de *P. roqueforti* disponibles pourrait permettre d'actualiser les connaissances concernant le potentiel enzymatique et notamment lipolytique de cette espèce.

### 3.6.2. Protéolyse et dégradation des acides aminés

La protéolyse est l'événement biochimique le plus complexe et, pour la plupart des variétés de fromage, le plus important qui se déroule durant l'affinage des fromages (McSweeney, 2004). Elle contribue à la fois au développement de la texture du fromage et du profil aromatique. En effet, en hydrolysant les caséines qui donnent sa structure au fromage, la protéolyse influence la texture de ce dernier et augmente également la capacité de rétention d'eau du caillé. De même, les peptides formés peuvent avoir un impact direct sur la saveur du fromage, certains étant amers (peptides courts et hydrophobes) (McSweeney, 2004). Mais plus encore, la protéolyse influence grandement les qualités aromatiques en libérant une quantité importante d'acides aminés qui, pour certains, agissent directement sur la flaveur en apportant des notes sucrées (e.g. glycine, sérine, thréonine, alanine, proline), aigres (e.g. histidine, glutamine, asparagine) ou amères (e.g. arginine, méthionine, valine, leucine, phénylalanine, tyrosine, isoleucine, tryptophane) mais qui servent également de précurseurs pour une gamme complète de réactions cataboliques produisant de nombreux composés aromatiques (McSweeney, 2004). La **Figure 19** résume de manière globale l'ensemble des réactions pouvant avoir lieu lors de la protéolyse et du catabolisme des acides aminés.

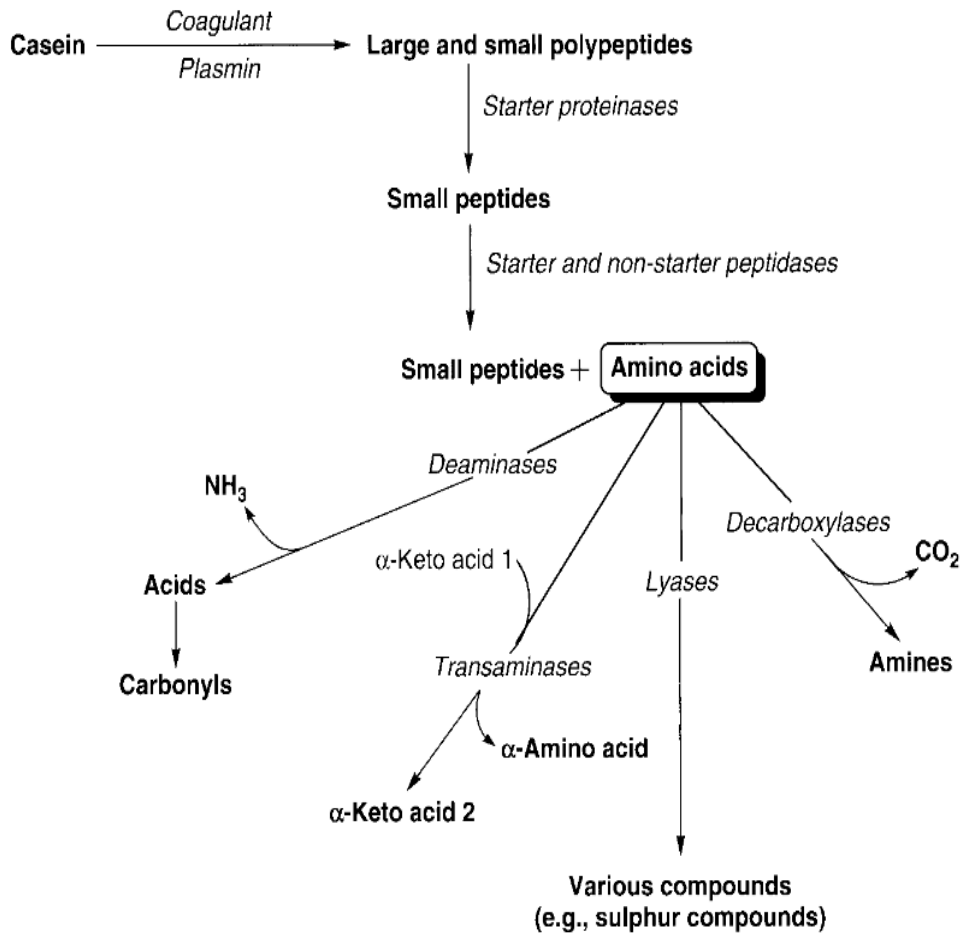


Figure 19 : Voies de dégradation au cours de la protéolyse et du catabolisme des acides aminés durant l'affinage des fromages (d'après McSweeney, 2004).

Au niveau des fromages à pâte persillée, plusieurs études ont révélé que la protéolyse y était plus intense comparativement à d'autres fromages (De Llano et al., 1995; Marcos et al., 1979; Trieu-Cuot and Gripon, 1983). Les enzymes contribuant à la protéolyse dans les fromages à pâte persillée peuvent provenir du lait, de la présure, des bactéries « starter » et « non-starter », des moisissures et des levures, même si la contribution principale provient de l'activité protéolytique de *P. roqueforti* (Coghill, 1979). En effet, une augmentation significative de la protéolyse a été observée à partir du moment où *P. roqueforti* se développe (Trieu-Cuot and Gripon, 1983; Zampoutis et al., 1996). Après environ deux semaines, *P. roqueforti* domine la protéolyse au niveau des fromages à pâte persillée, libérant à la fois des peptides et des acides aminés grâce à différentes enzymes (Madkor et al., 1987; Zampoutis et al., 1997, 1996).

*P. roqueforti* est connu pour produire deux protéases extracellulaires : une métalloprotéase et une aspartyl-protéase, l'activité de ces enzymes, relativement stables dans le fromage, étant

maximale dans les fromages à pâte persillée et en particulier lorsque *P. roqueforti* commence à sporuler (Cantor et al., 2004).

La métalloprotéase, caractérisée par un large spectre d'action, est active lorsque le pH est compris entre 4,5 et 8,5. Le pH optimal pour l'hydrolyse des caséines est de 5,5 ce qui est égale ou très proche des pH généralement retrouvés dans les fromages à pâte persillée.

En ce qui concerne l'aspartyl-protéase, elle est stable pour des valeurs de pH comprises entre 3,5 à 6,0 et possède deux valeurs de pH optimales pour l'hydrolyse des caséines (3,5 et 5,5) (Cantor et al., 2004). D'après Cantor et al. (2004), cela pourrait s'expliquer par des changements de conformation au niveau du substrat. Une relation a été établie entre le développement de *P. roqueforti*, l'activité de l'aspartyl-protéase et l'apparition de peptides amers (Gripon, 1999). De même, Gente et al. (1997) ont démontré que l'expression d'*aspA*, gène codant une aspartyl-protéase, était fortement induite par la présence de caséines dans le milieu et réprimé par celle de l'ammoniaque.

Afin de dégrader ces peptides (dont des peptides amers) en acides aminés, *P. roqueforti* produit plusieurs exopeptidases. Tout d'abord, on distingue une carboxypeptidase extracellulaire acide, avec un large spectre d'action, et qui produit des acides aminés acides, basiques et hydrophobes. Cette dernière est certainement très importante dans le processus de désamérisation (Cantor et al., 2004). Testé sur un substrat artificiel, son pH optimum a été calculé à une valeur de 3,5 et serait également stable pour un pH compris entre 5,0 à 5,5. *P. roqueforti* produit également une métalloaminopeptidase extracellulaire alcaline avec un pH optimum de 8,0. Elle est spécifique des acides aminés hydrophobes (amers) et par conséquent, son activité de désamérisation est susceptible d'augmenter au cours de l'affinage, le pH du fromage ayant tendance à augmenter. Plusieurs peptidases intracellulaires ont également été détectées, parmi elles on distingue des carboxy- et amino-peptidases alcalines (Gripon, 1999) même si leur contribution au processus d'affinage n'est pas encore bien compris. Enfin, il faut noter que, comme l'ont montré Larsen et al. (1998), l'activité protéolytique, caractérisée par la production de protéases et de peptidases par *P. roqueforti*, peut varier de manière importante entre les souches.

Le **Tableau 6** liste les principales enzymes produites par *P. roqueforti* et impliquées dans la protéolyse et le catabolisme des acides aminés durant l'affinage. L'étude des séquences des génomes de *P. roqueforti* récemment disponibles pourrait permettre d'actualiser les connaissances concernant le potentiel protéolytique de *P. roqueforti*

**Tableau 6 : Principales enzymes produites par *P. roqueforti* impliquées dans la protéolyse et le catabolisme des acides aminés durant l’affinage (d’après Cantor et al., 2004).**

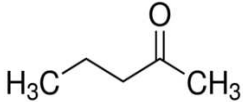
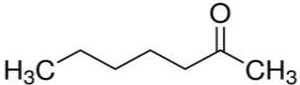
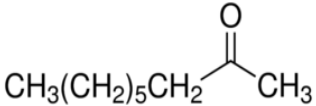
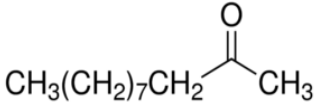
<b>Enzyme</b>	<b>Mode d’action</b>
Aspartyl-protéase	Hydrolyse des $\beta$ -caséines préférentiellement en $\beta$ -caséines (98-209, 30-209, 1-29, 100-209, 197/99)
Métalloprotéase	Hydrolyse des $\alpha_{s1}$ -caséines Large spectre d’action
Carboxypeptidase sérine (extracellulaire, acide)	Libération d’acides aminés acides, basiques et hydrophobes
Métalloaminopeptidase (extracellulaire, alcaline)	Libération d’acides aminés apolaires

### **3.6.3. Production d’arômes**

Une large gamme de composés aromatiques volatiles et non volatiles est donc produite dans les fromages à pâte persillée lors de l’affinage, principalement due à l’action des enzymes lytiques de *P. roqueforti*. Cela influence tant le goût que la flaveur du produit final. La variation des proportions de chacun des composés détermine les profils aromatiques des différents fromages à pâte persillée (Gallois and Langlois, 1990). Les saveurs caractéristiques des fromages à pâte persillée proviennent principalement de la dégradation des lipides. Les acides gras libres contribuent à la fois au goût et à la flaveur, mais plus important encore sont les composés produits à partir de ces derniers, par exemple, les méthyl-cétones, essentiels aux qualités organoleptiques des fromages à pâte persillée (Kinsella and Hwang, 1976; Moio et al., 2000). Les méthyl-cétones sont les composés aromatiques majoritaires dans des fromages à pâte persillée. Elles constituent 50 à 75 % des composés aromatiques volatils totaux dans les fromages à pâte persillée et leur concentration peut être corrélée à l’intensité de la note caractéristique des bleus (Ardö, 2011). En effet, la saveur piquante associée aux fromages à pâte persillée a été corrélée aux concentrations élevées en acides gras libres et particulièrement de leurs produits d’oxydation, les méthyl-cétones (Ratray and Eppert, 2011). Les méthyl-cétones retrouvées en concentrations les plus importantes sont la 2-heptanone et la 2-nonanone, mais les concentrations en 2-pentanone et 2-undécanone sont également élevées.

Le **Tableau 7** présente la structure de chacune des méthyl-cétones citées précédemment et leurs niveaux de production dans différents fromages à pâte persillée.

**Tableau 7 : Principales méthyl-cétones présentes dans les fromages à pâte persillée (adapté de Spinnler, 2009).**

Nom	Structure moléculaire	Quantités (mg.kg <sup>-1</sup> )		
		Roquefort	Bleu des Causses	Bleu d'Auvergne
2-pentanone		0,56 à 9,4	3,4	0,34
2-heptanone		3,9 à 13,1	2,9	1,8
2-nonanone		3,9 à 10	1,6	4,5
2-undécaneone		0,5 à 1,1	0,45	1,5

La concentration totale de méthyl-cétones dans les fromages à pâte persillée dépend à la fois du processus de fabrication, du temps d'affinage et de la souche de *P. roqueforti* utilisée tandis que les proportions des composés appartenant à cette famille retrouvées dans le fromage dépendent en particulier de la souche de *P. roqueforti* utilisée (Gallois and Langlois, 1990). Les notes issues des méthyl-cétones sont, en général, fruitées, florales parfois moisies. Plus spécifiquement, le 2-heptanone apporte une note plus épicée et surtout il est caractéristique de la note « bleu » (Cantor et al., 2004). Etant donné que des concentrations importantes en acides gras libres inhibent la croissance de *P. roqueforti* et retardent ainsi la lipolyse, la production de méthyl-cétones à partir d'acides gras libres a été décrite comme un potentiel mécanisme de détoxification (Kinsella and Hwang, 1976).

Les alcools représentent entre 15 et 30 % des composés aromatiques volatils totaux dans les fromages à pâte persillée (Ardö, 2011). Les méthyl-cétones peuvent, en condition anaérobie, être réduites en alcools secondaires. Ces alcools sont généralement plus abondants dans les bleus que les alcools primaires. Les alcools secondaires principaux sont le 2-heptanol, le 2-nonanol et le 2-pentanol, les proportions dépendant grandement de la souche de *P. roqueforti* utilisée (Gallois and Langlois, 1990; Gonzales De Llano et al., 1990).

Les alcools primaires sont aussi présents, le 3-méthyl-1-butanol étant généralement le plus abondant. D'autres composés aromatiques avec des notes fruitées et florales sont retrouvés et appartiennent à la famille des esters et des lactones, ces dernières étant généralement retrouvées

en faibles concentrations (Gallois and Langlois, 1990; Gonzales De Llano et al., 1990). Il en est de même pour les aldéhydes dont l'impact sur la saveur n'est pas connu.

Les peptides et les acides aminés de la protéolyse apportent également leur contribution à la saveur du fromage, les composés formés ayant des notes variées comme, par exemple, sucrée ou amère. Le **Tableau 8** présente les concentrations totales des principaux groupes de composés aromatiques retrouvés au sein de différents fromages à pâte persillée.

**Tableau 8 : Concentration totale ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  de fromage) des principaux groupes de composés aromatiques retrouvés au sein de différents fromages à pâte persillée (d'après Cantor et al., 2004 sur une adaptation de Gallois and Langlois, 1990).**

Famille de composés aromatiques	Roquefort (souche PF <sup>a</sup> )	Roquefort (souche PO <sup>b</sup> )	Roquefort (souche PG <sup>c</sup> )	Bleu de Causses <sup>d</sup> (souche PG <sup>c</sup> )	Bleu d'Auvergne <sup>e</sup>
Cétones	11095	14350	34940	9345	9780
Alcools	4025	3305	7670	3795	8110
Esters	1390	2985	3835	3155	2950
Lactones	50	255	325	425	2230
Aldéhydes	5	10	15	0	250

Modifié à partir de (Gallois and Langlois, 1990)

<sup>a</sup> Faibles activités protéolytiques et lipolytiques ; 210 jours d'affinage

<sup>b</sup> Fortes activités protéolytiques et lipolytiques ; 210 jours d'affinage

<sup>c</sup> Activités protéolytiques et lipolytiques intermédiaires ; 210 jours d'affinage

<sup>d</sup> 100 jours d'affinage

<sup>e</sup> Approximativement 45 jours d'affinage

*Outre ses activités protéolytiques et lipolytiques menant entre autres à la formation d'arômes volatiles ou non, P. roqueforti est également capable de produire une gamme de métabolites secondaires et intermédiaires métaboliques plus ou moins large selon les souches dont certains sont considérés comme des mycotoxines. Le paragraphe qui suit permettra de faire un point sur les connaissances que nous avons à ce jour sur ces métabolites secondaires et en particulier concernant les mycotoxines que P. roqueforti peut potentiellement produire.*

### **3.7. Production de métabolites secondaires et de mycotoxines**

Le terme « mycotoxine » tient son étymologie du grec « mykes » (champignon) et du latin « toxicum » (poison). Les mycotoxines sont des composés naturels, généralement de faible poids moléculaire, issus du métabolisme secondaire des champignons microscopiques et qui possèdent des propriétés toxiques à faible concentration vis-à-vis des animaux (Jard et al., 2011).



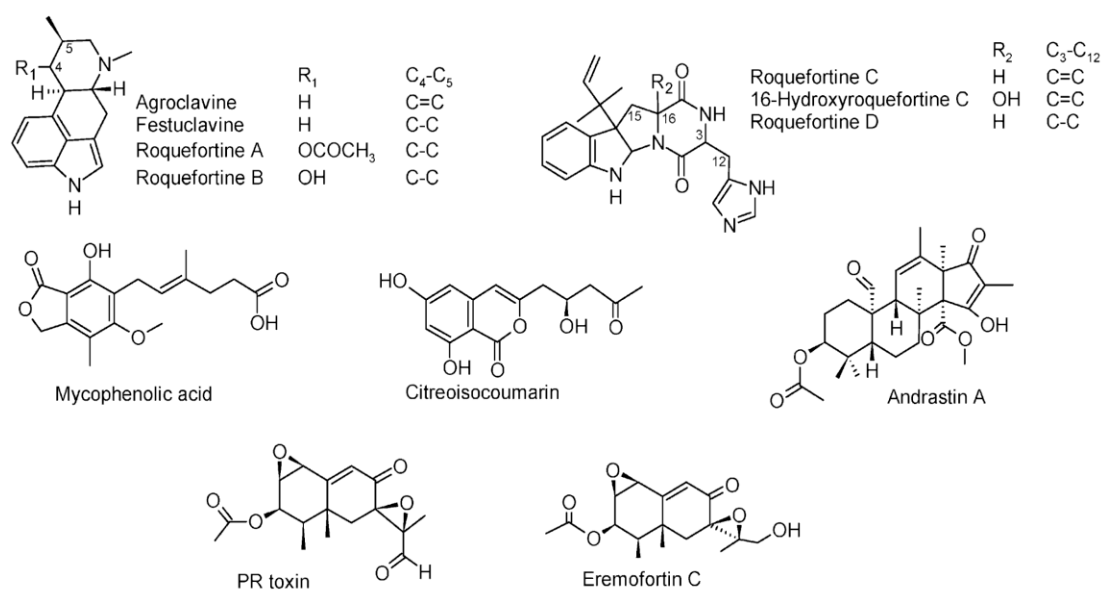
Ces composés ont vraisemblablement, entre autres rôles, celui de conférer un avantage compétitif aux champignons qui les produisent vis-à-vis d'autres espèces fongiques ou bactériennes de la même niche écologique (Magan and Aldred, 2007). Cet atout compétitif a pu représenter un avantage sélectif pour des espèces se développant dans des milieux soumis à une compétition interspécifique et qui ont acquis ou conservé au cours de l'évolution cette production coûteuse d'un point de vue énergétique (Calvo et al., 2002).

Les mycotoxines ont surtout un effet cytotoxique, en altérant différentes structures cellulaires comme les membranes ou en interférant sur des processus cellulaires vitaux, tels que la synthèse de protéines, d'ARN ou d'ADN (Riley, 1998). Leur spécificité ainsi que leur niveau de toxicité peuvent varier selon l'espèce productrice. Les composés et leurs niveaux de production dépendent, en grande partie, des conditions environnementales dans lesquelles sont placés les champignons qui les produisent. C'est pour cela que la problématique des mycotoxines dans la chaîne alimentaire est particulièrement prise au sérieux.

La contamination des aliments (matières premières ou produits transformés) par les mycotoxines, peut avoir lieu à toutes les étapes de la chaîne alimentaire. On distingue deux types de contaminations, directe et indirecte. La contamination en mycotoxines est qualifiée de « directe » lorsqu'elle résulte d'une production par une espèce fongique présente dans la matrice alors qu'elle est dite « indirecte » si la production mycotoxique a lieu en amont. Dans le cas d'un fromage, une contamination directe émane d'un champignon présent sur le fromage alors qu'une contamination indirecte peut résulter, par exemple, de l'utilisation de lait issu d'un animal ayant consommé de l'ensilage contaminé par des mycotoxines. Très généralement, cette contamination est accidentelle. Toutefois, certaines moisissures possédant la capacité de produire ces métabolites sont ajoutées intentionnellement dans certains aliments fermentés et sont donc susceptibles d'en produire, comme c'est le cas pour *P. roqueforti* au sein des fromages à pâte persillée (Fontaine, 2015). Cette potentialité justifie pour l'EFSA qu'à ce jour *P. roqueforti* ou plus largement les champignons filamenteux n'ait pas le statut QPS (Qualified Presumption of Safety) (EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), 2013). Cependant, il faut noter que les fromages à pâte persillée caractérisés par la présence du champignon *P. roqueforti*, ont un statut GRAS (Generally Recognized As Safe) aux Etats-Unis (U.S. Food and Drug Administration, Foods for human consumption that may contain or be derived from microorganisms, Code of Federal Regulations, Title 21, §131.106).

*P. roqueforti* produit une gamme de métabolites secondaires et intermédiaires métaboliques plus ou moins large selon les souches dont certains sont considérés comme des mycotoxines.

On distingue entre autres la PR toxine (*Penicillium roqueforti* toxine) et ses précurseurs que sont l'aristolochène, qui intervient au tout début de la voie de biosynthèse et les éremofortines A à E, la roquefortine C et son précurseur la roquefortine D, les isofumigaclavines A et B (= roquefortines A et B) mais aussi le limonène, l'acide mycophénolique, l'agroclavine, l'époxyagroclavine, la citreoisocoumarine, la festuclavine, la roquecine, la chanoclavine-I et l'andrastine A (Fernández-Bodega et al., 2009; Frisvad et al., 2004; Martín and Coton, 2015; Vinokurova et al., 2001). Parmi ces métabolites secondaires, seuls la PR toxine, la roquefortine C et l'acide mycophénolique sont à ce jour considérés comme étant des mycotoxines (Frisvad et al., 2004). La structure des principaux métabolites secondaires cités précédemment sont présentés en **Figure 20**.



**Figure 20 : Structures de différents métabolites secondaires produit par *Penicillium roqueforti* (d'après Nielsen et al., 2006).**

De par leur potentielle *présence dans les denrées destinées à l'alimentation humaine et animale*, de nombreuses études se sont intéressées au dosage des mycotoxines dans diverses matrices. Le paragraphe qui suit présentera une partie des études réalisées en lien avec la présence de *P. roqueforti*.

### 3.7.1. Dosages dans les matrices alimentaires

Plusieurs études ont permis la détection et la quantification de mycotoxines au sein de différentes variétés de fromages et en particulier au niveau des fromages à pâte persillée dans

lesquels *P. roqueforti* est classiquement utilisé. Le **Tableau 9** présente un grand nombre des résultats de dosage de ces métabolites secondaires.

**Tableau 9 : Exemples de mycotoxines détectées dans les fromages (d'après Fontaine, 2015).**

Mycotoxines	Fromage	Origine	Technique analytique	Nombre d'échantillons	Nombre d'échantillons positifs	Niveau de concentration (µg/kg)	LD (µg/kg)	Références
<b>PR-toxine</b>	Bleu	Danemark/Italie/Islande/Grèce/Allemagne/Autriche/Royaume-Uni/Irlande	HPLC	13	0	-	200	Engel and Prokopek, 1979
	Bleu		HPLC	60	0	-	1,5	Siemens and Zawistowski, 1993
	Bleu		HPLC	30	0	-	nr	Finoli et al. 2001
<b>PR-imine</b>	Bleu		HPLC	60	50	19 - 42	1	Siemens and Zawistowski, 1993
<b>Isofumigaclavine A</b>	Bleu	Danemark/France/ Allemagne/Royaume-Uni/Italie/Finlande/Canada	TLC	16	13	traces - 4700 traces	15-25 nr	Scott and Kennedy, 1976
<b>Isofumigaclavine B</b>								
<b>MPA</b>	Bleu/Bleu à croûte fleurie	Danemark/France/Allemagne/Royaume-Uni/Italie	TLC	32	4	250 - 5000	75	Engel et al. 1982
	Bleu/Filsitt	France/Italie/Allemagne/Royaume-Uni	TLC	100	38	nr - 14300	20	Lafont et al. 1979a
	Valdèon	Espagne	TLC	10	0	-	20	Lopez-Diaz et al. 1996
	Bleu/Bleu à croûte fleurie	Danemark/Finlande/Allemagne/France	LC-MS/MS	21	1	300	0,3	Kokkonen et al. 2005
	Bleu	Danemark/France/Italie/Allemagne/Royaume-Uni/Espagne	EIA	53	51	<10 - 11000	0,5	Usleber et al. 2008
	Bleu/Bleu à croûte fleurie	15 pays	LC-MS/MS	86	44	15 - 6190	3	Fontaine et al. 2015
	Valdèon	Espagne	TLC	10	1	nr	30	Lopez-Diaz et al. 1996
	Bleu	Danemark/France/ Allemagne/Royaume-Uni/Italie/Finlande/Canada	TLC	16	16	50 - 6800	30-50	Scott and Kennedy, 1976
	Bleu		HPLC	12	12	160 - 650	16	Ware et al. 1980
				13	13	20 - 2290	5	Schoch et al. 1983
<b>ROQC</b>	Bleu/Gouda	Danemark/France/Italie	LC-UV	6	5	705 - 2290	10	Noroozian et al. 1998
	Bleu	Danemark/Italie/Islande/Grèce/Allemagne/Autriche/Royaume-Uni/Irlande	HPLC	30	30	50 - 1470	nr	Finoli et al. 2001
	Bleu/Bleu à croûte fleurie/ Croûte fleurie	Danemark/Finlande/Allemagne/France	LC-MS/MS	21	11	800 - 12000	0,4	Kokkonen et al. 2005
	Bleu/Bleu à croûte fleurie	15 pays	LC-MS/MS	86	86	11 - 14125	11**	Fontaine et al. 2015

nr: non-reportée

\*\* : LQ (Limite de quantification)

Outre dans les fromages à pâte persillée, *P. roqueforti* est également connu pour être un contaminant majeur des ensilages mal conduits (Auerbach et al., 1998; O'Brien et al., 2008; Sumarah et al., 2005). Un certain nombre d'études ont donc également quantifié les différentes mycotoxines produites directement au niveau de ces substrats (Auerbach et al., 1998; Driehuis et al., 2008; Mansfield et al., 2008; Rasmussen et al., 2010; Schneweis et al., 2000) (**Tableau 10**).

**Tableau 10 : Exemples de mycotoxines détectées dans les ensilages**

Mycotoxine	Type d'ensilage	Origine	Technique analytique	Nombre d'échantillons analysés	Nombre d'échantillons positifs	Niveau de concentration (µg.kg <sup>-1</sup> )	LD/LQ (µg.kg <sup>-1</sup> )	Référence
<b>Roquefortine C</b>	Maïs/herbe	Allemagne	HPLC	24	21	200 - 36000	100	1
	Maïs/herbe	Pays-Bas	LC-MS/MS	47	9	NR - 3160	50	2
	Maïs	Danemark	LC-MS/MS	10	3	51 - 33662	158	3
	Maïs	Etats-Unis	HPLC-MS	120	72	10 - 5710	10	4
<b>Acide mycophénolique</b>	Maïs	Etats-Unis	HPLC-MS	120	50	20 - 1300	10	4
	Maïs	Danemark	LC-MS/MS	10	6	10 - 1646	7	3
	Maïs/herbe	Allemagne	LC-MS	233	74	20 - 35000	20	5
	Maïs/herbe	Pays-Bas	LC-MS/MS	47	6	NR - 2630	25	2
<b>Andrastine A</b>	Maïs	Danemark	LC-MS/MS	10	6	8 - 8811	1	3

**Références :** (Auerbach et al., 1998) (1) ; (Driehuis et al., 2008) (2) ; (Rasmussen et al., 2010) (3) ; (Mansfield et al., 2008) (4) ; (Schneweis et al., 2000) (5).

En plus des valeurs listées dans le **Tableau 10**, l'étude de Driehuis et al. (2008) a permis de détecter des concentrations extrêmement élevées en roquefortine C (jusqu'à 45000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) et en acide mycophénolique (jusqu'à 25000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) au niveau de parties moisies (visibles à l'œil nu) d'ensilage de maïs. Egalement, O'Brien et al. (2006) ont analysé cinq échantillons d'ensilages d'herbe dont deux visiblement contaminés qui contenait jusqu'à 20  $\text{mg.kg}^{-1}$  de roquefortine C, d'acide mycophénolique, d'andrastine A mais également des quantités plus faibles (de 0,1 à 5  $\text{mg.kg}^{-1}$ ) en roquefortines A, B, et D, festuclavine, marcfortine A et agroclavine.

Cependant, de par l'existence d'écosystèmes microbiens souvent complexes au niveau des matrices concernées (plusieurs espèces pouvant produire le même métabolite), de nombreuses études se sont plutôt intéressées à isoler les souches de *P. roqueforti* avant d'en évaluer le potentiel de production de métabolites secondaires sur différents milieux de culture (Engel et al., 1982; Fernández-Bodega et al., 2009; Fontaine et al., 2015a; Lafont et al., 1979a; López-Díaz et al., 1996; Nielsen et al., 2006; O'Brien et al., 2006; Ohmomo et al., 1994; Sumarah et al., 2005), le milieu de culture le plus communément utilisé étant le milieu YES (Yeast Extract Sucrose). En effet, ce milieu de culture riche en saccharose (généralement 150 g/L) présente un rapport C/N élevé supposé favoriser la production de mycotoxines. De manière intéressante, l'étude d'O'Brien et al. (2006), réalisée à partir de 79 isolats de *P. roqueforti* provenant d'ensilages d'herbe et cultivés 7 jours à 25°C sur milieu YES et CYA, a permis de mettre en évidence la production d'une gamme étendue de métabolites secondaires (e.g. isofumigaclavine A, roquefortine C, citreoisocoumarine, andrastine A, éremofortine C, acide mycophénolique, PR toxine). De manière surprenante, une étude récente (Cakmakci et al., 2015), réalisée à partir de 140 isolats de *P. roqueforti* provenant de 41 fromages traditionnels turcs, a établi que tous les isolats étaient capables de produire l'acide pénicillique et de la patuline en plus des habituels roquefortine C et acide mycophénolique. Ces résultats vont à l'encontre de ceux publiés depuis que la section *Roquefortorum* (comprenant aujourd'hui *P. carneum*, *P. paneum*, *P. roqueforti* et *P. psychrosexualis*) est mieux délimitée (Boysen et al., 1996; Houbraeken et al., 2010). Cette production de patuline et/ou d'acide pénicillique pourtant établi dans d'autres publications de la même équipe de recherche (Cakmakci et al., 2012; Erdogan et al., 2003) pourrait être associée à une mauvaise identification des souches étudiées comme le suggérait déjà Frisvad et al. en 2004 à propos de publications antérieures (Frisvad et al., 2004).

Très peu de données toxicologiques étant disponibles pour les métabolites secondaires produits par *P. roqueforti* à l'exception des trois mycotoxines, seules les données concernant la PR toxine, la roquefortine C et l'acide mycophénolique seront présentées ci-après.

### 3.7.2. Données toxicologiques

Les données toxicologiques obtenues pour l'acide mycophénolique, la roquefortine C et la PR toxine sont synthétisées dans le **Tableau 11**.

On constate aisément que l'on peut classer la PR toxine, la roquefortine C puis l'acide mycophénolique par ordre décroissant de toxicité en se basant sur les LD50 obtenus.

**Tableau 11 : Données toxicologiques de l'acide mycophénolique, la roquefortine C et la PR toxine (adapté de Hymery et al., 2014).**

Mycotoxine	Effet	Modèle	Référence
Acide mycophénolique	LD50 (Létal Dose) rats 2500 mg.kg <sup>-1</sup> O	In vivo rats and mice	Wilson 1971
	LD50 rats 500 mg.kg <sup>-1</sup> IV		
	LD50 mice 700 mg.kg <sup>-1</sup> IV		
	LD50 mice 450 mg.kg <sup>-1</sup> IV		
	Cytocidal, growth and attachment inhibitory	In vivo human Detroit 98 and Girardi Heart	Engel et al., 1982
	Mutagenic : chromosomes aberrations, Ames test – Immunosuppressive IC 50 (Inhibitory Concentration) > 100 µg.mL <sup>-1</sup>	Mammalian cells  In vitro Salmonella sp. In vitro human macrophage In vitro Caco cells	Umeda et al., 1977  Wehner et al., 1978 Bentley 2000 Rasmussen et al., 2011
	≥780 µM ≥780 µM	In vitro Caco cells In vitro THP-1/CD4 <sup>+</sup> monocytes	Fontaine et al., 2015
Roquefortine C	LD50 rats 1520 mg.kg <sup>-1</sup> IP	In vivo rats and mice	Ueno et al., 1978
	LD50 mice 169 mg.kg <sup>-1</sup> M IP		Arnold et al., 1978
	LD50 mice 184 mg.kg <sup>-1</sup> F IP		
	Intoxications	In vivo dogs	Puls and Ladyman 1988
	Ames test - Neurotoxic	In vitro Salmonella sp. In vivo day-old cockerel	Schoch et al., 1984 Wagener et al., 1980
	IC50 48 µg.mL <sup>-1</sup>	In vitro Caco cells	Rasmussen et al., 2011
	IC50 ≥ 100 µM IC50 55µM IC50 45µM	In vitro Caco cells In vitro THP-1 monocytes In vitro CD4 <sup>+</sup> monocytes	Fontaine et al., 2015
PR toxine	LD50 mice 5.8 mg.kg <sup>-1</sup> IP	In vivo rats and mice	Chen et al., 1982
	LD50 rat 11.6 mg.kg <sup>-1</sup> IP		
	LD50 rat 8.2 mg.kg <sup>-1</sup> IV		
	Target organs: ʘcapillary permeability (heart, liver, lungs, kidneys damages) inhibits RNA and protein synthesis		
	Inhibits DNA Polymerase Mitochondrial respiration	In vitro E.coli In vitro rat liver mitochondria	Moule et al., 1978 Wei et al., 1984
	Mutagenic (Ames test +), carcinogenic	In vitro Salmonella sp. In vitro S. cerevisiae	Ueno et al., 1978 Wei et al., 1979

Des expériences de co-exposition ont également été réalisées au cours de l'étude de Fontaine et al. (2015). Cette expérience a comme intérêt de se rapprocher au maximum des conditions réelles d'exposition aux mycotoxines sachant que plusieurs d'entre elles peuvent être présentes en même temps dans un substrat et avoir potentiellement un effet synergique. De cette façon, Fontaine et al. (2015) ont mis en évidence que la viabilité des cellules intestinales Caco-2 était significativement réduite après 48h d'exposition à de fortes concentrations en roquefortine C et acide mycophénolique. Un effet synergique a même été observé à des concentrations de 10/78, 25/780 et 50/780  $\mu\text{M}$  en roquefortine C/acide mycophénolique, tandis qu'un effet additif a été mis en évidence à 100/780  $\mu\text{M}$ . Egalement, le taux d'apoptose des cellules THP-1 augmente après 3 et/ou 6 h d'exposition à la roquefortine C (de 10 à 100  $\mu\text{M}$ ) ou à l'acide mycophénolique (780  $\mu\text{M}$ ) de manière dose-dépendante. Enfin, la co-exposition de roquefortine C et d'acide mycophénolique (100/780  $\mu\text{M}$ ) a permis de mettre en évidence l'augmentation des cellules THP-1 en apoptose alors qu'aucun mécanisme d'apoptose n'a pu être observé sur les cellules Caco-2.

Concernant les autres métabolites secondaires produits par *P. roqueforti*, comme indiqué précédemment peu de données toxicologiques sont disponibles (Hymery et al., 2014). Seuls Starec et al. (2001) ont montré que l'agroclavine augmenterait l'activité cellulaire des lymphocytes NK que ce soit in vivo (pour des animaux en conditions non stressées) ou in vitro, démontrant ainsi un effet immunostimulateur.

En ce qui concerne le potentiel mycotoxinogène de *P. roqueforti*, des travaux concernant l'élucidation de voies de biosynthèse sont engagés depuis plusieurs années. Ainsi, que ce soit chez *P. roqueforti* ou d'autres espèces du genre *Penicillium*, plusieurs études ont déjà été publiées concernant la PR toxine (Chalmers et al., 1981; Hidalgo et al., 2014; Moreau et al., 1980), la roquefortine C (Ali et al., 2013; García-Estrada et al., 2011; Kosalková et al., 2015; Ries et al., 2013a) ou l'acide mycophénolique (Hansen et al., 2012; Ragueira et al., 2011; Zhang et al., 2015).

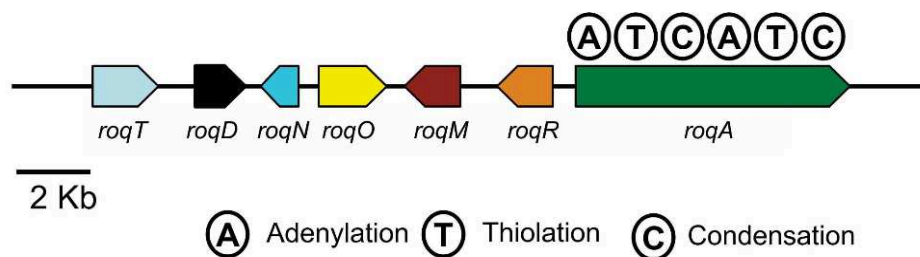
Les paragraphes qui suivent feront état des connaissances actuelles concernant les voies de biosynthèses des trois mycotoxines (PR toxine, roquefortine C, acide mycophénolique).

### **3.7.3. Voie de biosynthèse de la roquefortine C**

Plusieurs études ont tout d'abord décrit la roquefortine C comme étant un intermédiaire métabolique menant à la formation de l'oxaline et de l'épi-neoxaline chez *P. glandicola*

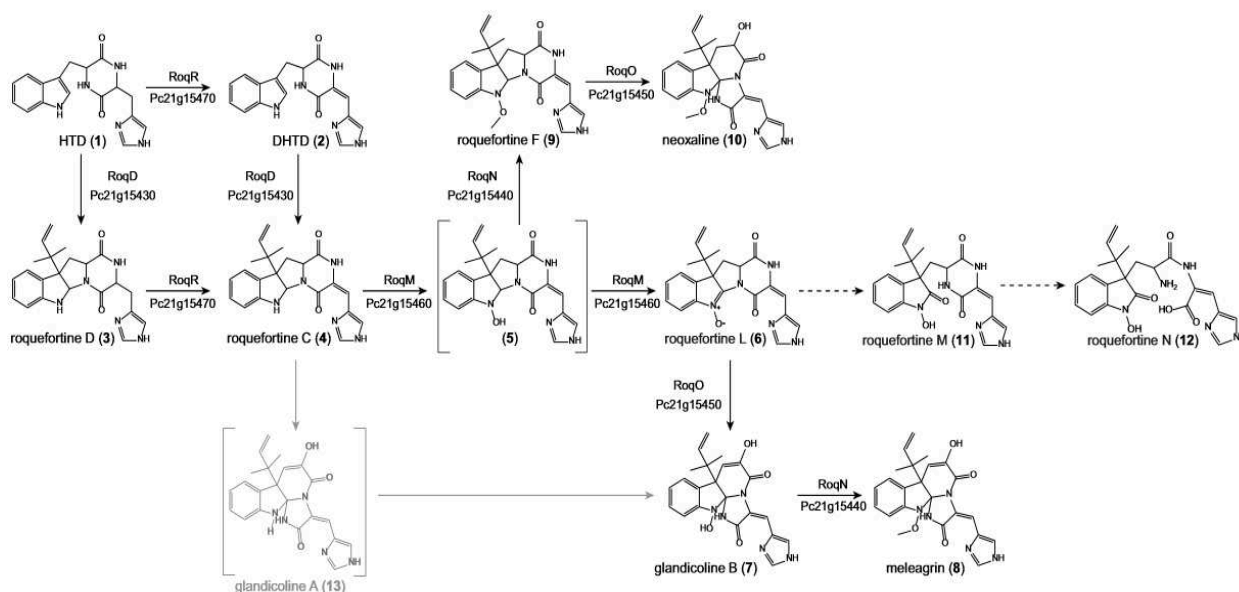
(Reshetilova et al., 1995) et *P. tulipae* (Overy et al., 2005). Différents groupes de recherche se sont depuis intéressés à la voie de biosynthèse de la roquefortine C chez *P. chrysogenum*. En 2011, une voie impliquant potentiellement 7 gènes et menant à la production de deux métabolites, la roquefortine C et la méléagrine, a été proposée (García-Estrada et al., 2011) alors qu'un cluster de 4 gènes a été récemment décrit chez *P. roqueforti* (Kosalková et al., 2015).

Chez *P. chrysogenum*, Ali et al. (2013) ont caractérisé plus précisément la voie de biosynthèse de la roquefortine C menant à la méléagrine et mis en évidence l'implication possible de plusieurs précurseurs menant à la synthèse de la roquefortine C avant que Ries et al. (2013b) ne poursuive la description jusqu'à la production de néoxaline et d'autres roquefortines à partir de roquefortine C. Ces travaux ont mis en évidence l'implication de 3 gènes (*roqA*, *roqR* et *roqD*) dans la synthèse de roquefortine C (**Figure 21**).



**Figure 21 : Cluster de gène impliqué dans la biosynthèse de la roquefortine C menant à la méléagrine chez *P. chrysogenum* (d'après Ali et al. 2013).**

Si l'étude de Ries et al. (2013b) a permis de confirmer l'implication des 3 gènes (*roqA*, *roqR* et *roqD*) dans la synthèse de roquefortine C, elle propose également l'implication d'autres intermédiaires métaboliques venant compléter ceux proposés par Ali et al. (2013) dans la synthèse de méléagrine à partir de la roquefortine C. En effet, même si l'implication de 3 autres gènes (*roqM*, *roqO* et *roqN*) fait consensus au sein des deux études, plusieurs études (Hymery et al., 2014) montrent l'implication de la glandicoline A comme intermédiaire métabolique à la synthèse de méléagrine. Il faut cependant noter que cette structure n'a pu être mise en évidence dans l'étude de Ries et al. (2013b). Enfin, cette étude met en évidence l'implication de composés jamais recensés jusqu'alors dans la synthèse de méléagrine ou de néoxaline comme la néoxaline et les roquefortines F et L (**Figure 22**).



**Figure 22 :** Voie de biosynthèse de la roquefortine C menant à la méléagrine, la néoxaline et d'autres roquefortines (d'après Ries et al. 2013). Les flèches pleines indiquent les réactions enzymatiques observées tandis que les flèches en pointillés représentent les réactions chimiques. Les structures entre parenthèses n'ont pas été détectées chez Ries et al. (2013b). Les structures grisées (composés et flèches) ont été proposées dans plusieurs autres études (García-Estrada et al., 2011; Overy et al., 2005; Vinokurova et al., 2003).

Selon Ali et al. (2013), la première étape de la voie de biosynthèse de la roquefortine C implique le gène *roqA* qui code une NRPS (Non Ribosomal Peptide Synthetase), responsable de la production d'histidinyltryptophanyldicétopipérazine (HTD) en condensant une molécule de L-histidine et une molécule de L-tryptophane.

La molécule d'HTD produite est ensuite transformée par l'action des produits des gènes de *roqR* (cytochrome p450 oxydoréductase) puis *roqD* (diméthylallyl tryptophane synthase), ou au contraire par l'action de *RoqR* et ensuite de *RoqD*, menant dans les deux cas à la production de roquefortine C mais ayant deux intermédiaires métaboliques différents, la roquefortine D, dans le premier cas, et le déhydrohistidyltryptophanyldicétopipérazine (DHTD), dans le deuxième.

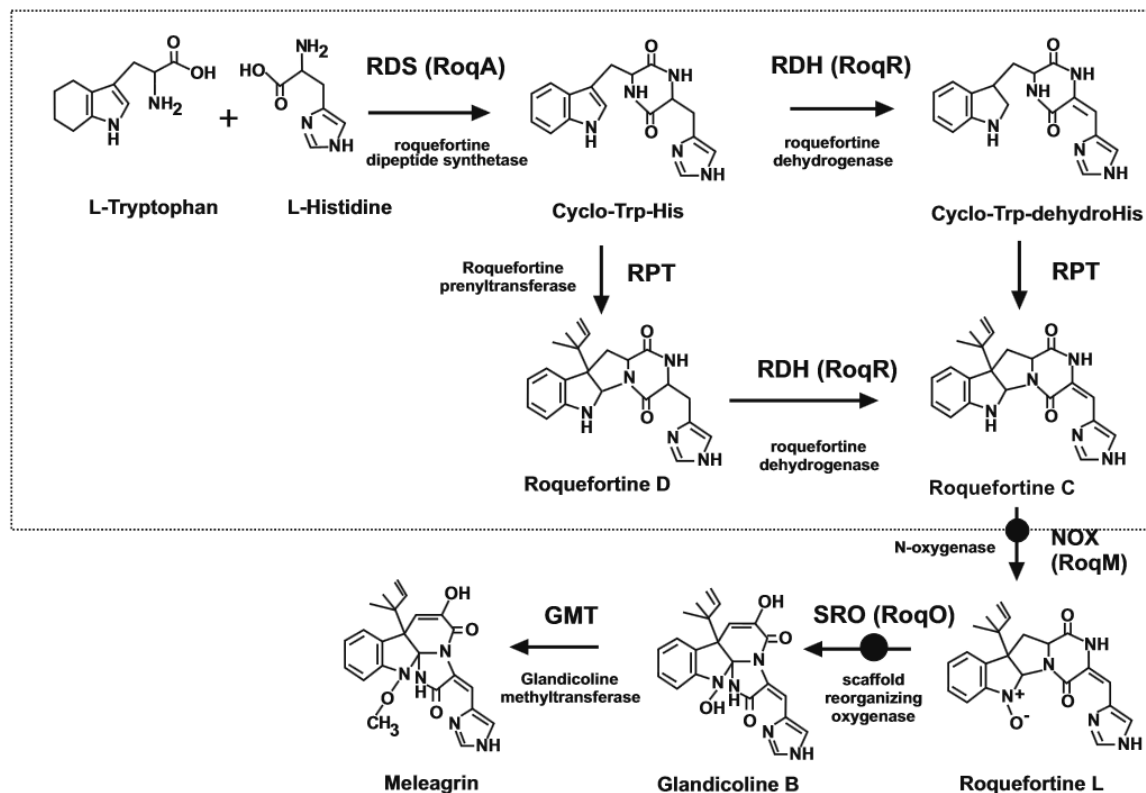
A partir de là, Ries et al. (2013b) ont mis en évidence le prolongement de cette voie métabolique menant à la synthèse de méléagrine, néoxaline ou d'autres roquefortines impliquant trois autres gènes (*roqM*, *roqN* et *roqO*) codant respectivement deux monooxygénases (MAK-1 et cytochrome P450) et une méthyltransférase.

Cependant, le caractère branché de la voie menant à la synthèse de glandicoline B nécessite d'être confirmé.

En ce qui concerne *P. roqueforti*, le cluster de gènes permettant la production de roquefortine C a récemment été étudié (Kosalková et al., 2015). Cette étude a permis de mettre en évidence



que le cluster présent chez *P. roqueforti* comportait seulement 4 gènes sur les 7 décrits chez *P. chrysogenum*. Cela se traduirait par l'absence de conversion de la roquefortine C en roquefortine L, glandicoline B et méléagrine comme c'est le cas chez *P. chrysogenum* (**Figure 23**).



**Figure 23 :** Voie de biosynthèse de la roquefortine C chez *P. roqueforti* (encadré) comparée à celle de la roquefortine/méléagrine décrite précédemment chez *P. chrysogenum* (d'après Kosalková et al., 2015).

Les étapes indiquées avec un point noir sont manquantes chez *P. roqueforti*. Les noms de gènes utilisés sont ceux proposés par García-Estrada et al. (2011). Ceux proposés par Ali et al. (2013) sont indiqués entre parenthèses. Noter que seules trois étapes catalysées par RDS, RPT et RDH sont nécessaires pour la biosynthèse de la roquefortine C chez *P. roqueforti* bien que la RDS possède plusieurs activités enzymatiques (activation d'acides aminés, formation de dipeptides et cyclisation). Il faut également noter que la roquefortine L a été décrite comme étant le premier intermédiaire intervenant dans la conversion de la roquefortine C en méléagrine chez *P. chrysogenum* contrairement à d'autres études où il s'agit de la glandicoline A.

Ces résultats concordent avec les données bibliographiques concernant la caractérisation biochimique des métabolites secondaires de *P. roqueforti*. En effet, cette espèce produit la roquefortine C et la roquefortine D (Nielsen et al., 2006; Ohmomo et al., 1994). A l'opposé, la production de méléagrine ou de néoxaline n'a jamais été décrite (Frisvad et al., 2004).

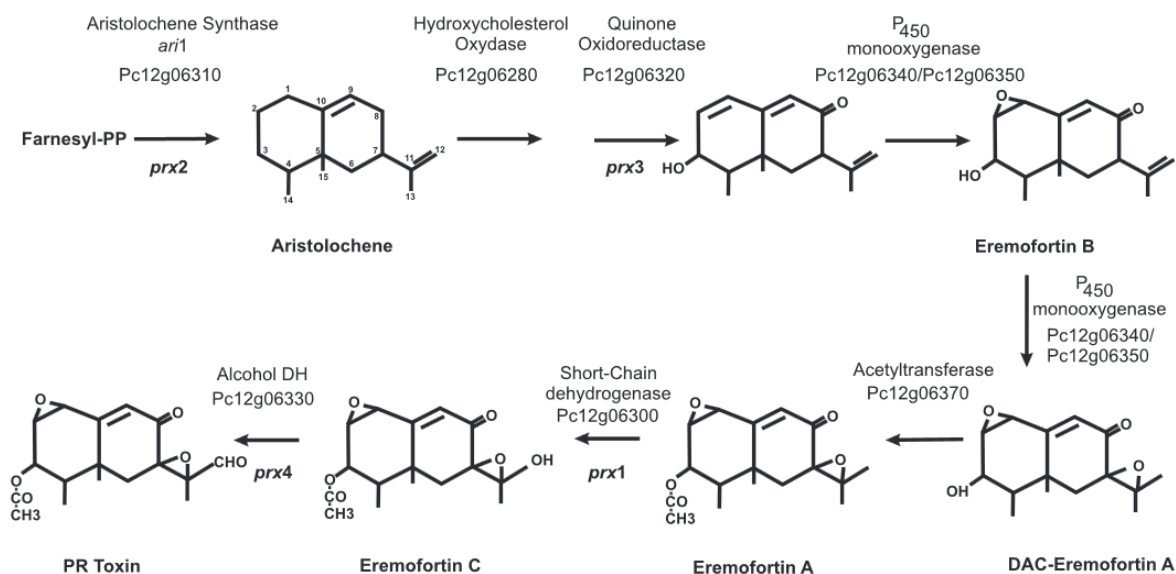
### 3.7.4. Voie de biosynthèse de la PR toxine

Dès le début des années 1980, des voies de biosynthèses de la PR toxine ont été proposées chez *P. roqueforti* (Chalmers et al., 1981; Hidalgo et al., 2014; Jeleń, 2002; Moreau et al., 1980). En 1981, Chalmers et al. (1981) ont proposé une première voie en définissant le précurseur de la voie comme l'acétate. Ce dernier serait successivement transformé en mévalonate, diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP) et farnesyl-pyrophosphate (FPP). L'action de l'aristolochène synthase sur le FPP mènerait à l'aristolochène, considéré par Calvert et al. (2002) comme un précurseur de sesquiterpènes de type érémosphilane. La PR toxine résulterait donc de la transformation de l'aristolochène via une voie métabolique comprenant les érémofofortines A, B et C. L'érémofofortine C serait finalement transformée en PR toxine tandis que sa forme acétique mènerait à l'érémofofortine D (Moreau, 1980). Il faut noter que la PR toxine peut être dégradée en PR imine, PR amide (érémofofortine E) (Chang et al., 1993) ou PR acide (Chang et al., 1996) selon les conditions. Cette dégradation potentielle explique sa non-détection au niveau des matrices fromagères. En effet, instable dans les fromages, la PR toxine est soit transformée en PR imine après réaction avec l'ammoniac, soit en PR amide en présence d'acides aminés neutres et basiques (Fontaine, 2015).

De manière intéressante, Brock et Dickschat (2013) ont utilisé, dans le but de définir encore plus finement les intermédiaires métaboliques de la voie, une combinaison de CLSA/GC-MS et de RMN et ont décrit plusieurs sesquiterpènes inconnus provenant de FPP, d'aristolochène ainsi que des produits secondaires.

En ce qui concerne les gènes et les enzymes associées à cette voie, jusque récemment par Hidalgo et al. (2014), les gènes impliqués dans cette voie n'avait pas été décrits, à l'exception de l'aristolochène synthase (gène *ari1*) impliquée, comme expliqué précédemment, au tout début de la biosynthèse de la PR toxine chez *P. roqueforti* dans la transformation du FPP en aristolochène (Proctor and Hohn, 1993).

Ainsi, Hidalgo et al. (2014) ont cloné et séquencé un cluster comportant 4 gènes chez *P. roqueforti*. Le cluster possède le gène *ari1* et les expériences d'extinction des autres gènes codant des oxydoréductases et une alcool déshydrogénase ont mis en évidence leur implication dans la voie de biosynthèse de la PR toxine (**Figure 24**). Plus récemment encore, le cluster complet de la voie de biosynthèse de la PR toxine a été identifié chez *P. roqueforti* FM164 et de nouvelles expériences de réduction d'expression de gènes ont d'ailleurs été réalisées et ont permis de confirmer l'implication de 3 gènes supplémentaires dans cette voie de biosynthèse (Hidalgo et al., données non publiées).



**Figure 24 : Voie de biosynthèse de la PR toxine (d'après Hidalgo et al. 2014)**

De manière intéressante, les expériences d'extinction de gènes réalisées par Hidalgo et al. (2014) ont causé une augmentation significative de la synthèse de l'acide mycophénolique suggérant un lien entre ces 2 voies de biosynthèses.

### 3.7.5. Voie de biosynthèse de l'acide mycophénolique

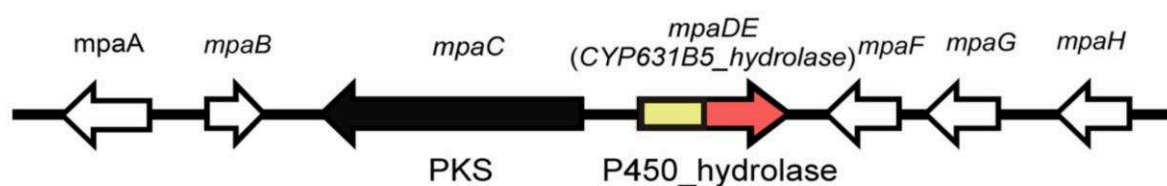
Comme décrit par Birch et al. (1957), l'acide mycophénolique, est composé d'un noyau phthalide dérivé de l'acétate et d'une chaîne latérale terpénique indiquant l'implication à la fois des voies de biosynthèse des polycétides et des terpénoïdes (Hymery et al., 2014).

Il fut décrit et caractérisé pour la première fois en 1893 par Bartolomeo Gosio comme ayant des propriétés antibiotiques contre *Bacillus anthracis* (voir (Bentley, 2000) pour plus de détails). Depuis 1893, des activités antivirales (Borroto-Esoda et al., 2004; Diamond et al., 2002), antifongiques (Nicoletti et al., 2004), antibactériennes (Kavanagh, 1947; Torrenegra et al., 2005), antitumorales (Tressler et al., 1994) ou encore antipsoriasis (Epinette et al., 1987) lui ont été attribuées même si ce dernier est particulièrement connu pour son utilisation comme immunosuppresseur pour les patients ayant subi des greffes de rein, de cœur et de foie afin d'éviter le rejet des organes transplantés. En effet, en inhibant l'IMP déshydrogénase (IMPDH), il permet de réduire la production de lymphocytes B et T (Bentley, 2000).

De très nombreuses études se sont intéressées à la biosynthèse d'acide mycophénolique au niveau chimique (Birch et al., 1958, 1957; Birkinshaw et al., 1948; Canonica et al., 1972; Colombo et al., 1982; Muth and Nash, 1975) mais ce n'est que récemment que Regueira et al.

(2011) ont identifié et caractérisé, chez *P. brevicompactum*, un cluster de gènes d'une taille de 25 kb incluant 8 gènes.

En procédant à une délétion du gène *mpaC* codant une polycétide synthase, la production d'acide mycophénolique ainsi que d'autres métabolites appartenant à la voie de biosynthèse a été abolie. Par la suite, Hansen et al. (2012) ont mis en évidence que l'étape suivant la production d'acide 5-méthylorsellinique (5-MOA) était réalisée grâce à une enzyme de fusion naturelle (MpaDE) résultant de l'expression du gène *mpaDE* précédemment décrit par Regueira et al. (2011) comme deux gènes distincts (*mpaD* et *mpaE*) (**Figure 25**).



**Figure 25** : Cluster de gènes impliqués dans la biosynthèse de l'acide mycophénolique chez *P. brevicompactum* (d'après Hansen et al., 2012).

Enfin, Zhang et al. (2015) ont identifié chez une autre souche de *P. brevicompactum* un cluster très similaire à celui décrit par Regueira et al. (2011). Ce cluster possède une organisation identique et une homologie de séquences de 96,4% (Zhang et al., 2015) avec celui de Regueira et al. (2011). En prenant en compte les résultats de Hansen et al. (2012), les deux clusters sont caractérisés par 7 cadres ouverts de lectures qui codent 7 enzymes : une prényltransférase (MpaA), une protéine sans fonction connue (MpaB), une polycétide synthase (MpaC), une enzyme de fusion naturelle comprenant un domaine cytochrome P450 et un domaine hydrolase (MpaDE), une inosine-5'-monophosphate déshydrogénase (IMPDH, MpaF), une O-méthyltransférase (MpaG) et une enzyme de clivage oxydatif (MpaH).

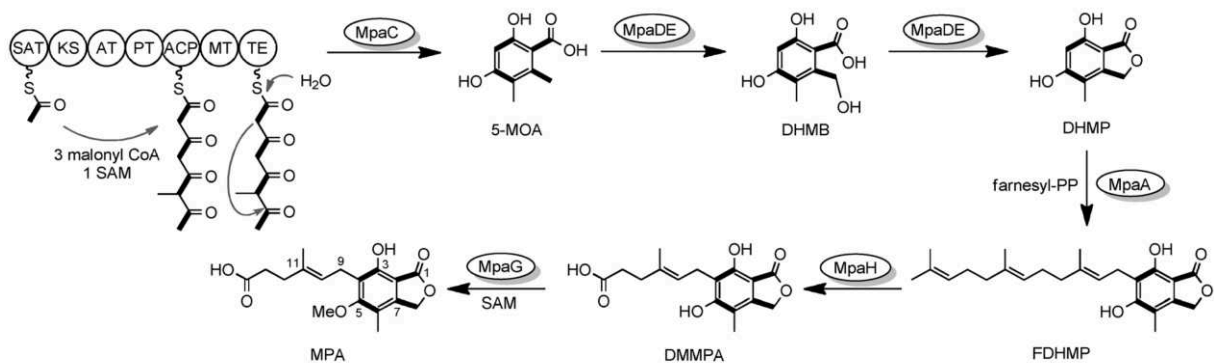
Au cours de la même étude, Zhang et al. (2015) ont également confirmé que l'enzyme MpaG était responsable de l'étape finale de la voie de biosynthèse de l'acide mycophénolique, c'est-à-dire de la conversion, par méthylation du groupe 5-hydroxy, de l'acide deméthylmycophénolique (DMMPA) en acide mycophénolique.

Ainsi, de très nombreuses étapes de la voie de biosynthèse d'acide mycophénolique ont maintenant été confirmées et permettent d'avoir une idée plus précise des différentes étapes réalisées.

MpaC catalyse donc la production de 5-MOA (Regueira et al., 2011). Ensuite, le 5-MOA serait successivement convertie en acide 4,6-dihydroxy-2-(hydroxyméthyl)-3-méthylbenzoïque

(DHMB) en 5,7-dihydroxy-4-méthylphthalide (DHMP) par MpaDE (Hansen et al., 2012). La prényltransférase MpaA catalyserait par la suite la farnésylation du DHMP pour produire du 6-farnésyl-5,7-dihydroxy-4-méthylphthalide (FDHMP) qui serait suivi par un clivage oxydatif réalisé par MpaH qui produirait le DMMPA (Regueira et al., 2011). Enfin, par la méthylation du groupe 5-hydroxy DMMPA, MpaG convertit le DMMPA en acide mycophénolique (Zhang et al., 2015).

La **Figure 26** illustre les différentes étapes de la voie de biosynthèse présentées précédemment.



**Figure 26 : Proposition de voie de biosynthèse de l'acide mycophénolique chez *P. brevicompactum* (adapté de Zhang et al., 2015)**

Concernant la protéine MpaF, elle conférerait un pouvoir d'auto-résistance vis-à-vis de l'acide mycophénolique (Hansen et al., 2011) tandis que la fonction de MpaB reste à ce jour toujours inconnue.

## **RESULTATS**



# Chapitre 1

Aperçu de la diversité morphologique et génétique au sein de l'espèce *Penicillium roqueforti*

-

Insights into *Penicillium roqueforti* morphological and genetic diversity

Guillaume Gillot, Jean-Luc Jany, Monika Coton, Gaétan Le Floch, Stella Debaets, Jeanne Ropars, Manuela López-Villavicencio, Joëlle Dupont, Antoine Branca, Tatiana Giraud, Emmanuel Coton. (2015). Insights into *Penicillium roqueforti* morphological and genetic diversity. PloS one, 10(6), e0129849.





Comme présenté précédemment, les fromages à pâte persillée constituent une famille diversifiée de fromages élaborés à partir de laits de vache, de chèvre, de brebis et/ou de bufflonne dont le cœur est généralement veiné de spores et de mycélium du champignon filamentueux *P. roqueforti*.

D'un point de vue taxonomique, *P. roqueforti* est actuellement reconnu comme une espèce à part entière même si des différences morphologiques ont été rapportées entre souches. Cette diversité a en particulier donné lieu à l'apparition au cours du temps de nombreuses dénominations « technologiques » distinctes comme *P. glaucum*, *P. stilton*, *P. gorgonzolae* ou *P. aromaticum* qui se sont révélées être en réalité des synonymes de l'espèce *P. roqueforti*. Dans ce contexte, la première question qui s'est posée était celle de l'existence de plusieurs espèces au sein de l'espèce actuelle *P. roqueforti*. Afin de vérifier cette éventualité, une vaste collection d'isolats de *P. roqueforti* issus principalement de fromages à pâte persillée du monde entier (Argentine, Brésil, Canada, République Tchèque, Danemark, Finlande, France, Allemagne, Irlande, Italie, Lettonie, Pays-Bas, Nouvelle-Zélande, Pologne, Espagne, Suisse, Royaume-Uni et Etats-Unis) a tout d'abord été mise en place. De manière intéressante, six isolements par fromage étant réalisés, plusieurs types morphologiques pouvaient être observés. Des souches de *P. roqueforti* isolées en particulier d'environnements non-fromagers (ensilage, fruit, pain, viande, etc.) ont également été intégrées à cette collection de travail afin d'améliorer sa représentativité. Enfin, 14 souches de *Penicillium* spp. autre que *P. roqueforti* appartenant à la section *Roquefortorum* ont été ajoutées à l'étude afin d'évaluer les relations existantes entre les différentes espèces (*P. paneum*, *P. carneum*, *P. psychrosexualis* et *P. roqueforti*) de cette section longtemps mal délimitée. Au total, 164 isolats de *P. roqueforti* ont ainsi été utilisés lors de cette étude. Il s'agit, à notre connaissance, de la plus vaste collection de *P. roqueforti* jamais étudiée à ce jour.

Consécutivement, une étude morphologique a été menée en se basant sur l'emploi de différents milieux de culture habituellement utilisés dans le but de différencier les représentants du genre *Penicillium*. Celle-ci a permis de mettre en évidence une importante diversité morphologique au sein des isolats de la collection et a soulevé une nouvelle fois la question de l'existence de plusieurs espèces voire d'espèces cryptiques au sein de l'espèce actuelle *P. roqueforti*. Pour tenter de répondre à cette question, la méthode GC-PSR (Genealogical Concordance - Phylogenetic Species Recognition) (Taylor et al., 2000). Cette méthode se base sur la comparaison de phylogénies construites d'après l'analyse de séquences de plusieurs gènes et permet généralement de fixer les limites d'espèces.

Une fois les limites de l'espèce *P. roqueforti* délimitée, une étude de la diversité intraspécifique de cette espèce a été menée. Pour cela, des marqueurs microsatellites ont été développés puis utilisés afin d'évaluer cette diversité ainsi que la structure de population éventuelle.

RESEARCH ARTICLE

# Insights into *Penicillium roqueforti* Morphological and Genetic Diversity

Guillaume Gillot<sup>1</sup>, Jean-Luc Jany<sup>1</sup>, Monika Coton<sup>1</sup>, Gaéтан Le Floch<sup>1</sup>, Stella Debaets<sup>1</sup>, Jeanne Ropars<sup>2,3,4</sup>, Manuela López-Villavicencio<sup>2</sup>, Joëlle Dupont<sup>2</sup>, Antoine Branca<sup>3,4</sup>, Tatiana Giraud<sup>3,4</sup>, Emmanuel Coton<sup>1\*</sup>

**1** Université de Brest, EA 3882 Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne, ESIAB, Technopôle Brest-Iroise, Plouzané, France, **2** Origine, Structure, Evolution de la Biodiversité, UMR 7205 CNRS-MNH, Muséum National d'Histoire Naturelle, CP39, Paris Cedex 05, France, **3** Ecologie, Systématique et Evolution, Université Paris-Sud, Orsay cedex, France, **4** CNRS, Orsay cedex, France

\* Current address: Canadian Institute for Advanced Research, Department of Biology, University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada

\* [emmanuel.coton@univ-brest.fr](mailto:emmanuel.coton@univ-brest.fr)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Gillot G, Jany J-L, Coton M, Le Floch G, Debaets S, Ropars J, et al. (2015) Insights into *Penicillium roqueforti* Morphological and Genetic Diversity. PLoS ONE 10(6): e0129849. doi:10.1371/journal.pone.0129849

**Academic Editor:** Helge Thorsten Lumbsch, Field Museum of Natural History, UNITED STATES

**Received:** March 9, 2015

**Accepted:** May 12, 2015

**Published:** June 19, 2015

**Copyright:** © 2015 Gillot et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** GG is funded by the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France) & the French Dairy Interbranch Organization (CNIEL, France). The authors acknowledge an ERC starting grant, GenomeFun 309403, awarded to TG, an ANR Fromagen grant to AB and an ATM Microorganisms-MNH 2013 grant to MLV. The funders had no role in study design, data collection and analysis, or preparation of the manuscript.

## Abstract

Fungi exhibit substantial morphological and genetic diversity, often associated with cryptic species differing in ecological niches. *Penicillium roqueforti* is used as a starter culture for blue-veined cheeses, being responsible for their flavor and color, but is also a common spoilage organism in various foods. Different types of blue-veined cheeses are manufactured and consumed worldwide, displaying specific organoleptic properties. These features may be due to the different manufacturing methods and/or to the specific *P. roqueforti* strains used. Substantial morphological diversity exists within *P. roqueforti* and, although not taxonomically valid, several technological names have been used for strains on different cheeses (e.g., *P. gorgonzolae*, *P. stilton*). A worldwide *P. roqueforti* collection from 120 individual blue-veined cheeses and 21 other substrates was analyzed here to determine (i) whether *P. roqueforti* is a complex of cryptic species, by applying the Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition criterion (GC-PSR), (ii) whether the population structure assessed using microsatellite markers correspond to blue cheese types, and (iii) whether the genetic clusters display different morphologies. GC-PSR multi-locus sequence analyses showed no evidence of cryptic species. The population structure analysis using microsatellites revealed the existence of highly differentiated populations, corresponding to blue cheese types and with contrasted morphologies. This suggests that the population structure has been shaped by different cheese-making processes or that different populations were recruited for different cheese types. Cheese-making fungi thus constitute good models for studying fungal diversification under recent selection.

## Introduction

Fungi display huge diversity with a widely accepted estimation of 1.62 M species [1]. However, as recognized by Hawksworth himself, this number is underestimated [2], mainly due to the

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

inconspicuousness and simple morphologies of these organisms. Many unrecognized cryptic species exist, often differing in their ecological niches, and are therefore important to delimit [3]. Fungi used for cheese-making are particularly interesting to study under these aspects, as they may have recently diversified and specialized under human selection [4].

Cheese-making is an ancient process that has led to more than 1000 varieties of cheese known to date [5]. Earliest cheese-making evidence goes back to the sixth millennium BC, *i.e.*, during the Neolithic era when organic residues preserved in pottery vessels were identified [6,7]. If, at that time, milk coagulation via lactic acid production was probably accidental, the use of rennet to coagulate milk was intentional. Cheese-making provided numerous advantages, including milk stabilization and storage, ease of transport, improvement of milk digestibility and was presumably a means to diversify the human diet [8]. Within the huge cheese diversity, blue-veined cheeses are manufactured from different milks and consumed in numerous countries. Each blue cheese type originates from a specific manufacturing process and exhibits distinctive characteristics. The best-known blue cheeses worldwide are, in the order of their first recorded date in the literature, Italian Gorgonzola (879), French Roquefort (1070), English Stilton (1785) [8] and Danish Danablu (1870s) [9], but their production is thought to be much older [10]. Specific cheese manufacturing recipes have often been secretly passed on to succeeding generations within limited geographical regions, hence explaining the localized production of certain varieties. Some blue cheeses have obtained a Protected Designation of Origin (PDO) or Protected Geographical Indication (PGI) status. For example, Roquefort cheese, the oldest cheese type with a Designation of Origin (1925), has the distinctive feature to be ripened at least 3 months, including 2 weeks in natural cellars located in Roquefort-sur-Soulzon. From an economic point of view, 18,812 tons of Roquefort cheese were produced in 2013 for a total of 56,847 tons of blue cheese, representing one third of France's total blue cheese production [11].

Various manufacturing methods exist, but all of them involve the use of the well-known mold *P. roqueforti*, whose presence and growth largely contribute to the typical aspect and flavor of blue cheeses. During cheese-making, *P. roqueforti* conidia may be directly added to milk, sprayed on curd or naturally colonize cheese. *P. roqueforti* is not exclusively found in dairy environments but also occurs in natural environments (forest soil and wood), as well as in silage, and is a common spoilage agent in refrigerated stored foods, meats or wheat products [12,13]. This is due to its ability to grow under harsh conditions such as low temperatures, low oxygen levels, high carbon dioxide concentrations and/or its resistance to organic acids and weak acid preservatives [14]. Taxonomically, *P. roqueforti*, genus *Penicillium* Link, subgenus *Penicillium* and species *roqueforti* Thom [12], is currently recognized as a single species, although substantial morphological differences have been reported among strains. This diversity has led to numerous distinct "technological" species names such as *P. glaucum*, *P. stilton*, *P. gorgonzolae* or *P. aromaticum*. The valid species name is currently *P. roqueforti* [15], but the great diversity in morphology as well as in ecological niches raises the question of the existence of cryptic species. Indeed, a previous study using 11 microsatellite markers identified genetically differentiated populations [16], with reduced gene flow between genetic clusters despite recombination footprints within populations, thus possibly constituting distinct species. Noteworthy, one of the genetic clusters included all strains isolated from other environments than dairy as well as some cheese strains, while all other clusters only encompassed cheese strains [16].

In the present study, a large *P. roqueforti* collection containing 164 isolates from various cheeses worldwide, as well as from other substrates, was used in order to test whether cryptic species can be detected within *P. roqueforti* using the gold standard of species criterion in fungi, the Genealogical Concordance—Phylogenetic Species Recognition criterion (GC-PSR) [3,17–19]. Distinct species are recognized by the congruence between multiple gene

genealogies, because recombination leads to their incongruence. The GC-PSR criterion thus only applies to sexual species. *P. roqueforti* has recently been shown to be able to undergo sex and recombination footprints and indirect evidence of recent sex in populations have been observed [16,20]. The GC-PSR criterion is however conservative: it will not distinguish recently derived species in which coalescence of alleles is not achieved yet [17,21–23]. Therefore, more rapidly evolving markers (microsatellites) were also developed, using the recently published genome sequence of *P. roqueforti* FM164 [4]. Furthermore, the morphological variability in our *P. roqueforti* collection was assessed. The goal of this study was to assess whether different cheese-making processes have used or generated different genotypes or cryptic species within *P. roqueforti*.

## Materials and Methods

### *Penicillium roqueforti* collection

A *P. roqueforti* collection was established by isolating strains from 120 individual blue-veined cheeses (of either artisanal or commercial origin), collected from 18 different countries worldwide (Argentina, Brazil, Canada, Czech Republic, Denmark, Finland, France, Germany, Ireland, Italy, Latvia, The Netherlands, New Zealand, Poland, Spain, Switzerland, United-Kingdom and the USA). Information about the cheeses sampled is given in [S1 Table](#). For each cheese, six samples were plated in order to obtain six distinct isolates per cheese. The characterization of each isolate was performed using morphological and  $\beta$ -tubulin partial gene sequence as described below. For each sampled cheese, a single isolate representative of each morphological type observed was eventually kept in the working collection. In total, 164 *P. roqueforti* isolates were available for this study including 27 *P. roqueforti* isolates from 21 different non-cheese substrates (silage, fruit, bread, meat, human sputum and cork) obtained from culture collections. In addition, 14 strains belonging to other terverticillate *Penicillium* species were used in order to assess relationships within the section *Roquefortorum* ([S2 Table](#)).

### Morphological observations and statistical analyses

Macroscopic colony morphology (color obverse; texture; diameter and margin) of the 164 isolates were observed on PDA medium (Potato Dextrose Agar, Difco, Becton Dickinson and Company) after 7 days incubation at 25°C. Color obverses were assigned to each isolate using the *Munsell Soil Color Charts* [24]. Three sub-cultures on Potato Dextrose Agar (PDA) (25°C) and also on Czapek Yeast Extract Agar (CYA) (5°C, 25°C & 37°C), Glycerol Nitrate Agar (G25N) (25°C) and Malt Extract Agar (MEA) (25°C) media for 7 days as described by Pitt [25], were done for the most distinguishable morphological types. Regarding macroscopic morphology, reproducibility was checked using three sub-cultures of a subset of 36 isolates. Statistical tests on morphologies were performed using JMP version 7 [26]. Microscopic morphology was also investigated by observing specimens sampled from the subcultures on MEA medium.

### DNA extraction, amplification and sequencing

Genomic DNA was extracted from fresh mycelium for each isolate after 5–7 days growth on M<sub>2</sub>Lev (20 g.L<sup>-1</sup> malt extract, 3 g.L<sup>-1</sup> yeast extract and 15 g.L<sup>-1</sup> agar) using the FastDNA SPIN Kit (MP Biomedicals, Illkirch, France) according to the manufacturer's instructions. Stock solutions (100 ng.μL<sup>-1</sup>) were prepared for PCR experiments and all DNA samples were conserved at -20°C.

Partial amplification of the  $\beta$ -tubulin gene, using the Bt2a and Bt2b primers [27], was performed on all 164 isolates to ensure that they belonged to the *P. roqueforti* species [28]. In addition to partial  $\beta$ -tubulin gene sequences, ten other DNA fragments were sequenced for 24 selected isolates based on multiple criteria (geographical origin, morphotype and random amplified polymorphism DNA (RAPD) analysis), in order to detect the most polymorphic loci. These regions corresponded to the rDNA ITS (including 5.8S rDNA gene) [29], partial 18S [30,31] and 28S [32,33] nuclear ribosomal DNA genes, partial *rpb1* gene encoding the largest subunit of the RNA polymerase II (RPB1) [34], partial *rpb2* gene encoding the second largest subunit of RNA polymerase II (RPB2) [35], partial translation elongation factor 1 alpha gene (*EF-1 $\alpha$* ) [36], partial *mcm7* gene encoding a mini-chromosome maintenance complex component 7 (MCM7) protein required for DNA replication, initiation and cell proliferation [37], partial *tsr1* gene encoding for 20S pre-rRNA accumulation during ribosome biogenesis [38,39], partial *cct8* gene encoding a subunit of the cytosolic chaperonin Cct ring complex, related to Tcp1p and required for the assembly of actin and tubulins *in vivo* [40,41] and partial calmodulin gene [42]. After this preliminary study, five fragments were chosen as the most polymorphic ( *$\beta$ -tub*, *cmd*, *cct8*, *tsr1* and *mcm7*) for further analyses. Information about the loci and primers used are summarized in (Table 1).

The five chosen fragments were amplified by PCR from total DNA extracts of 145 *P. roqueforti* isolates (the remaining 19 *P. roqueforti* isolates were obtained too late to be used for GC-PSR) as well as 14 strains belonging to other *Penicillium* species in order to assess relationships within the section *Roquefortorum*. *Penicillium paneum* isolate CBS 303.97 was used to root the trees. The PCR mixture included molecular biology grade water, PCR buffer (1X), 200 mM dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each primer, 0.5 U of GoTaq DNA polymerase (Promega, Madison, USA), and 100 ng of genomic DNA template. Amplifications were performed using a peqSTAR 2X Gradient Thermocycler (PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Germany) using the programs detailed in S3 Table.

Further genomic regions with high levels of DNA polymorphism were searched for by comparing the genome sequences of four *P. roqueforti* strains (unpublished data, courtesy of the ANR FoodMicrobiome Project), as well as the FM164 genome sequence [4]. Three genomic regions (ca. 1000 bp, *Proq845*, *Proq235*, *Proq631*) located on three different scaffolds were selected using DnaSP version 5.10.01 [45]. *Proq845* included a putative partial gene sequence region encoding a hypothetical protein. *Proq235* was composed of two putative gene regions including conserved domains for a peptidase M24 enzyme and an endonuclease/exonuclease/phosphatase. *Proq631* was found within a putative gene encoding a cytochrome P450 conserved domain. For each genomic region, primers were designed using Primer3web version 4.0.0 [46,47] (<http://primer3.ut.ee/>). Information about the primers used is shown in Table 1. Thirty isolates were used to amplify by PCR the *Proq845*, *Proq235* and *Proq631* loci using the same PCR mixture as described above. These 30 isolates included: (i) isolates representative of the diversity according to five gene sequences ( *$\beta$ -tub*, *cmd*, *cct8*, *tsr1* and *mcm7*) and microsatellite markers, as well as (ii) isolates belonging to each of the six observed clusters in the previous study [16]. The PCR program used is detailed in S3 Table.

PCR products were sequenced using both their forward and reverse primers at the 'Plateforme Biogenouest' (Roscoff, France) using the dye-terminator technology. Sequence assembly was carried out with Bionumerics version 6.6 (Applied Maths, Belgium) and contigs were manually edited using Mesquite version 2.75 [48]. Sequences corresponding to the eight loci chosen for multilocus analysis ( *$\beta$ -tub*, *cmd*, *cct8*, *tsr1*, *mcm7*, *Proq845*, *Proq235* and *Proq631*) were deposited in GenBank (see accession numbers in S4 Table). Sequence alignments were deposited in TreeBase (<http://purl.org/phylo/treebase/phyloids/study/TB2:S16359>).

### Phylogenetic analysis

The nucleotide sequences for the eight selected loci (*β-tub*, *cmd*, *cct8*, *tsr1* and *mcm7*, *Proq845*, *Proq235* and *Proq631*) were aligned using MAFFT online version 7 (G-INS-I strategy) [49] (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>).

For both Maximum Likelihood (ML) and Bayesian analyses, Jmodeltest version 2.1.4 [50,51] was used to determine the best-fit model of evolution for each dataset, namely: TIM2ef model for *β-tub*, TrN+G model for *cct8*, TIM1ef+G model for *cmd* the, K80 model for *mcm7*, TrN model for *tsr1*, TrN model for *Proq235* locus, TPM3+I model for *Proq631* locus and TIM1 model for *Proq845* locus.

Maximum parsimony (MP), ML and Bayesian analyses were performed excluding redundant sequences shared by several isolates, using PAUP version 4.0b10 [52] for MP and ML and MrBayes version 3.2.2 [53,54] for Bayesian analyses. Branch supports for all MP analyses were estimated by performing 1000 bootstrap replicates with a heuristic search consisting of 100 stepwise random addition replicates and tree bisection-reconnection (TBR) branch-swapping for each bootstrap replicate. Because *P. paneum* has been previously shown to form a phylogenetically close, well-supported clade, distinct from *P. roqueforti* [28], sequences obtained from *P. paneum* CBS 303.97 were used to root the *β-tub*, *cmd*, *cct8*, *tsr1* and *mcm7* phylogenies.

ML analyses were performed with 100 stepwise random addition replicates and TBR branch-swapping using the best-fit model. Constant characters were included and ambiguously aligned characters were excluded from all analyses. Bayesian analyses employing a Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method were performed using MrBayes version 3.2.2 [53,54] on constant characters. Four MCMC chains were run simultaneously for 10,000,000 generations with trees saved every 100th generation resulting in 100,000 total trees. The first 25,000 trees, which extended well beyond the burn-in phase of each analysis, were discarded. Posterior probabilities were determined from a consensus tree generated with the remaining 75,000 trees. MCMC convergence of our analyses was checked by using the Cumulative, Slide, and Compare analyses as implemented in AWTY [55].

**Table 1. Information about loci and primers used in the present study for Genealogical Concordance—Phylogenetic Species Recognition (GC-PSR) analysis.**

Locus	Primer	Sequence (5'– 3')	Tm (°C)	Fragment size (bp)	Reference
<i>β-tubulin</i>	Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	70.0	440–50	[27]
	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	70.3		
<i>cmd</i>	Cmd5	CCGAGTACAAGGAGGCCTTC	64.9	510–520	[42]
	Cmd6	CCGATAGAGGTCATAACGTGG	63.2		
	CF4	TTTTYGCATCATRAGYTGGAC	57.0	720–730	[36]
	CF1D	CAGGTCTCCGAGTACAAG	55.6		
<i>mcm7</i>	Mcm7-709for	ACIMGIGTITCVGAYGTHAARCC	70.2	610–620	[43]
	Mcm7-1348rev	GAYTTDGCACICCCIGGRTCWCCAT	69.1		
<i>tsr1</i>	Tsr1-F1526	GARTAYCCBCARTCNGAIATGT	55.1	810–820	[44]
	Tsr1-R2434	ASAGYTGVARDCCTTRAACCA	55.0		
<i>cct8</i>	Cct8-F94	CGCAACAAGATYGTBATYAACCA	49.5	1300–1310	[44]
	Cct8-R1595	RTCMACRCCNGTGTCCAGTA	54.2		
<i>Proq845</i>	<i>Proq845for</i>	AACCTTGCTTACCACTCGGCG	66.3	980–990	This study
	<i>Proq845rev</i>	CTCGTTGGCAATACTGCTGG	65.6		
<i>Proq235</i>	<i>Proq235for</i>	CAACAACCTCGGGTGCTTTG	67.7	940–950	This study
	<i>Proq235rev</i>	TTGTGTGTCAAGACCCGGAC	66.2		
<i>Proq631</i>	<i>Proq631for</i>	GGGGATGTCAGGTGGGTTTT	67.0	1060–1070	This study
	<i>Proq631rev</i>	GGGCTCAAAGATGCGAAACG	68.9		

doi:10.1371/journal.pone.0129849.t001



Incongruence Length Difference tests were performed (ILD, [56] as implemented in PAUP version 4.0b10 (hompert option)).

Phylogenetic trees were visualized and edited with FigTree version 1.4.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). A cluster network consensus tree was obtained using Dendroscope version 3.2.10 [57,58] from the three Bayesian trees generated for *Proq845*, *Proq235* and *Proq631* loci in order to visualize incongruences among these trees.

## Microsatellite markers development and analyses

Microsatellite motifs were searched within the *P. roqueforti* FM164 strain genome sequence [4] using SciRoKo version 3.4 [59] using the “Perfect (Total length)” search mode. Based on recommendations by Sweet *et al.* [60], search parameters included a minimum repeat number of microsatellite motifs of 3 (trinucleotide) and a minimum total length of 24 per microsatellite. For each detected microsatellite region ( $n = 24$ ), flanking sequences were extracted with SciRoKo version 3.4, primers were designed with QDD 2.1 [61] from PIPE3 (Table 2) and tested on 8 isolates (F15-3, F20-1, F33-1, F41-4, F51, F53, F61-6 and CBS 221.30<sup>T</sup>) selected on the basis of their morphotypes and/or geographical origin. Microsatellite regions were amplified by PCR on the 164 isolates of the working collection using the same PCR mixture as described above. The PCR program used is detailed in S3 Table. Each PCR product was sequenced as previously described. For population analyses, four markers were selected (Proq16, Proq17, Proq01\_3, Proq02\_2). The microsatellite markers were designed independently and concomitantly from those used in the study by Ropars *et al.* [16] which explains why they do not overlap and why they were not used here.

## Population analyses

Linkage disequilibria among the four markers were computed using Genepop on the Web version 4.2 [62,63] (<http://genepop.curtin.edu.au/>). For inferring population structure, individual-based Bayesian clustering methods implemented in STRUCTURE version 2.3.4 were used [64]. Ten independent analyses were carried out for each number of clusters from  $K = 2$  to  $K = 10$ , using admixture models, 500,000 MCMC iterations after a burn-in time of 50,000 steps. Outputs were processed using CLUMPP version 1.1.2 [65] to identify clustering solutions in replicated runs of each  $K$ . Graphical displays of population structure were performed using DISTRUCT version 1.1 [66]. The Evanno method [67] was implemented using STRUCTURE HARVESTER on the web ([68], <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>) in order to detect the  $K$  value corresponding to the strongest structure. The extent of population subdivision was evaluated by calculating  $F_{ST}$  indexes for all pairs of populations and by performing a hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) [69] using Genodive 2.0b25 [70]. A Principal Component Analysis (PCA) and Factorial Correspondence Analyses (FCA) were performed using R [71].

## Results

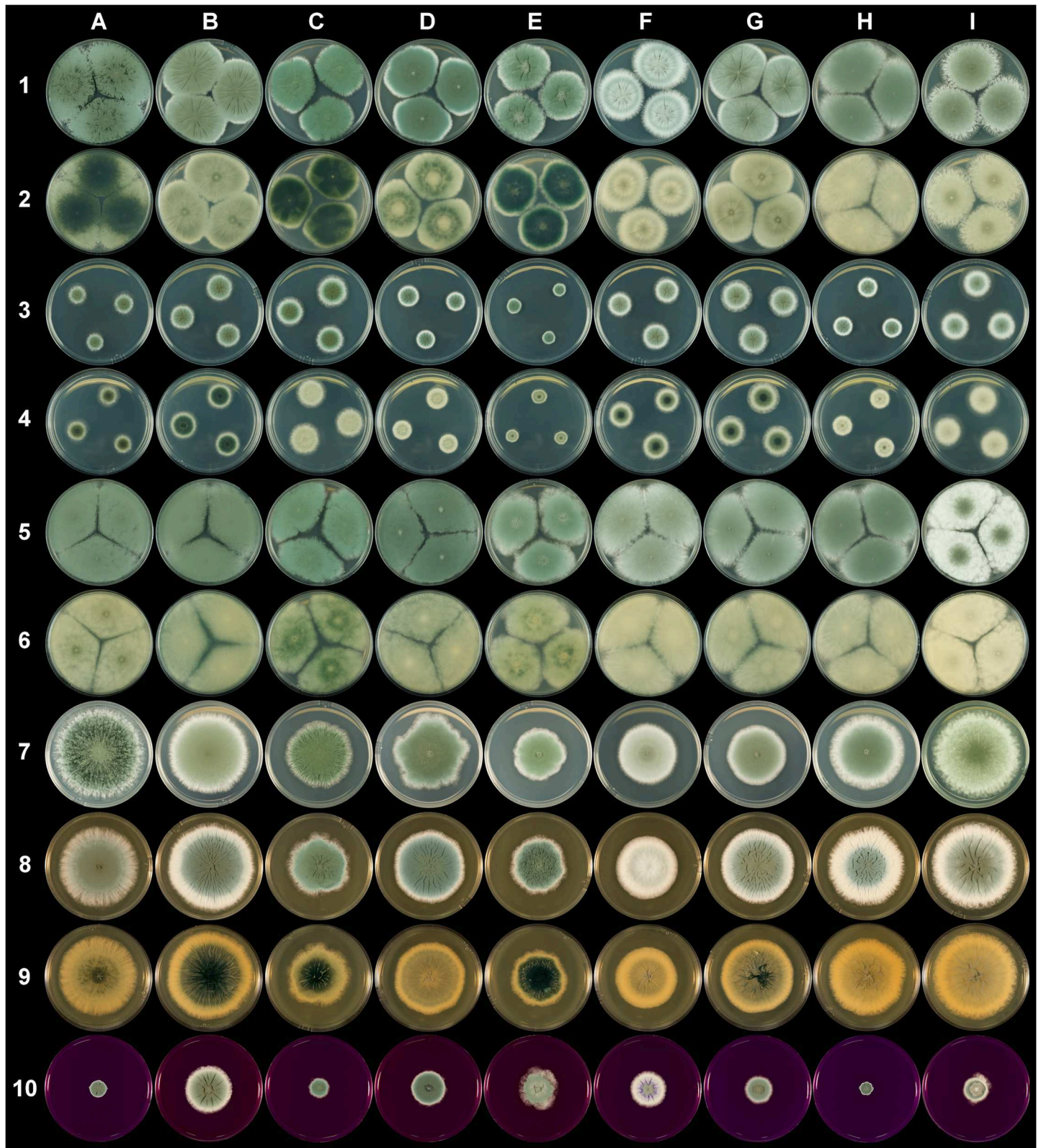
### Morphology

A high level of macroscopic morphological diversity was observed (Fig 1). On PDA (the most discriminative medium), colony color varied from light to dark greenish gray including grayish, pale, pale yellowish and olive green whereas colony texture varied from velvety to fasciculate including weakly floccose (S5 Table). While margins were mainly regular (S5 Table), their size varied considerably, with some isolates exhibiting a very thin margin whereas others had a thick margin representing up to one third of colony diameter (Fig 1). The recorded

**Table 2. Primers used in the present study for microsatellite markers amplification and sequencing.**

Locus	Primer	Sequence (5'– 3')	Tm(°C)
Proq01	Proq01_Fwd	AAGCGTCGCAGATCTAATGC	64.3
	Proq01_Rev	GACAGACCCTCGATGTTTGC	64.7
Proq01_2	Proq01_2_Fwd	ACTGTGAAACGAGCCTCCTG	64.4
	Proq01_2_Rev	ACACCATTGCCATCCATACC	64.4
Proq01_3	Proq01_3_Fwd	TGTGTACTCCACAGCGGCTA	64.5
	Proq01_3_Rev	TTGTCTTTGCGGTGTCCAAT	64.3
Proq02	Proq02_Fwd	GCCGAAGAAGGAGCTGATCT	64.8
	Proq02_Rev	GAGGACGGAACGATTCTCAA	64.1
Proq02_2	Proq02_2_Fwd	CCACTGTTAGAATCGCTGGG	64.5
	Proq02_2_Rev	CGTGAACGTGGAGTTGACTG	64.5
Proq03	Proq03_Fwd	AACCAGTCGATCTGTTCCCA	64.5
	Proq03_Rev	ATTTGCAATATGCTGGGTCG	64.6
Proq03_2	Proq03_2_Fwd	TAGAACACAAGGCATTGGCA	64.2
	Proq03_2_Rev	TCCAAATGAAGCGGGAAGTA	64.3
Proq03_3	Proq03_3_Fwd	GGGACTTCCTTGCGTATCT	64.2
	Proq03_3_Rev	ATGGATGATTCTACGCCTCG	63.9
Proq04	Proq04_Fwd	TGAAGGTTATTGAAGAAAGACCG	63.0
	Proq04_Rev	CAAATCTCGCCACCAAAC	65.4
Proq04_2	Proq04_2_Fwd	CGTTGGATAACCACTACGCA	63.5
	Proq04_2_Rev	CGATCGAATCCCATTTCACT	63.7
Proq04_3	Proq04_3_Fwd	ATGGTGGGTGCAGGGATT	65.4
	Proq04_3_Rev	CACCGTCAGCACTACCATTG	64.2
Proq05	Proq05_Fwd	TCCCTGCCGTCTGATAGTTC	64.2
	Proq05_Rev	AAGGTGCTGTGGACTGGTTC	64.2
Proq07	Proq07_Fwd	AAAGTCTGGATGTGAGGGCA	64.7
	Proq07_Rev	GATCTCTTGGTTGGAATGCG	64.5
Proq07_2	Proq07_2_Fwd	CCATGAACTGCCTTACGCTT	64.0
	Proq07_2_Rev	ATCGCGGTTGCTCTATTTGA	64.5
Proq07_3	Proq07_3_Fwd	CCATGAACTGCCTTACGCTT	64.0
	Proq07_3_Rev	ATCGCGGTTGCTCTATTTGA	64.5
Proq09	Proq09_Fwd	TCCGTTTCAGGAAGTGTGAT	64.7
	Proq09_Rev	TCCATGGCAGTTGCTTCTTT	64.6
Proq10	Proq10_Fwd	GCCTTGAGTTGTAACCAATCCTTT	65.1
	Proq10_Rev	TCCTAGATGTTCCCGATTGGT	64.4
Proq10_2	Proq10_2_Fwd	GCCTCCCAGTTCATGACAAC	64.6
	Proq10_2_Rev	CTGCCGAAACTGCTTGCTAT	64.3
Proq11	Proq11_Fwd	ACACCCAATCACTACGACGG	64.8
	Proq11_Rev	TGAAGTGAGGACCTTTGGGA	64.6
Proq14	Proq14_Fwd	TCTTCGCATAGGGAGTTGGA	64.6
	Proq14_Rev	TGGTAGAATACCGTCCCGA	64.1
Proq16	Proq16_Fwd	TTGAGGATTTCCGGAGACAA	64.5
	Proq16_Rev	ATGCGCAATAAGACCCAAGA	64.4
Proq17	Proq17_Fwd	TATCGTCCGCACTAAGGGAA	64.3
	Proq17_Rev	TGCTTCATTTCCGAAGGTGT	64.5
Proq17_2	Proq17_2_Fwd	GATCGGAAACCCAGGAATTT	63.8
	Proq17_2_Rev	GGGCCATATCCCATTCTTGA	65.7
Proq18	Proq18_Fwd	TCAGCACAAATCAGTTCACGC	65.2
	Proq18_Rev	TCAGCATTGCTGCTGTTGT	64.7

doi:10.1371/journal.pone.0129849.t002



**Fig 1. *Penicillium roqueforti*.** (Column A to I respectively correspond to PTX.PR.26.1 (A), F75-6 (B), UBOCC-A-109090 (C), UBOCC-A-111170 (D), MUCL 18048 (E), FM164 (F), F61-6 (G), UBOCC-A-110052 (H), F84 (I) isolates grown respectively for 7 days at 25°C on Czapek Yeast Extract Agar (CYA) (lines 1 & 2: obverse & reverse), Glycerol Nitrate Agar (G25N) (lines 3 & 4: obverse & reverse), Malt Extract Agar (MEA) (lines 5 & 6: obverse & reverse), Potato Dextrose Agar (PDA) (line 7), Yeast Extract Sucrose agar (YES) (lines 8 & 9: obverse & reverse) and Creatine sucrose agar (CREA) (line 10) media.

doi:10.1371/journal.pone.0129849.g001



macroscopic morphological traits were reproducible: the correlations between the first diameter measure and the two replicate measures were indeed highly significant (S5 Table;  $r = 0.88$ ,  $P < 0.001$  for second replicate and  $r = 0.84$ ,  $P < 0.001$  for third replicate) and the same colors, texture and margins were recorded on the different subcultures of the same isolate. Microscopic morphological variations were also observed on MEA medium: conidiophore roughness was more or less pronounced and penicilli were more or less appressed depending on the specimen observed. However, these differences were subtle and were therefore not recorded. No substantial spore size variation was noticed among isolates. Noteworthy, only rudimentary penicilli were observed for isolate MUCL 18048.

## Phylogenetic reconstruction

Out of the eleven tested DNA fragments, six were not kept for further analyses (18S, 28S, ITS, *EF-1 $\alpha$* , *rpb1*, *rpb2*) due to their lack of genetic variability on the 24 selected isolates. The five fragments chosen for further sequencing ( *$\beta$ -tub*, *cmd*, *cct8*, *tsr1* and *mcm7*) were successfully amplified by PCR from total DNA extracts of 143 to 145 *P. roqueforti* isolates, depending on the fragments, as well as of 14 strains belonging to other *Penicillium* species. Overall, the partial  *$\beta$ -tub* locus (443 bp), *cct8* locus (1224 bp), *cmd* locus (465 bp), *mcm7* locus (565 bp) and *tsr1* locus (809 bp) were used to construct five gene genealogies (Fig 2; Table 3).

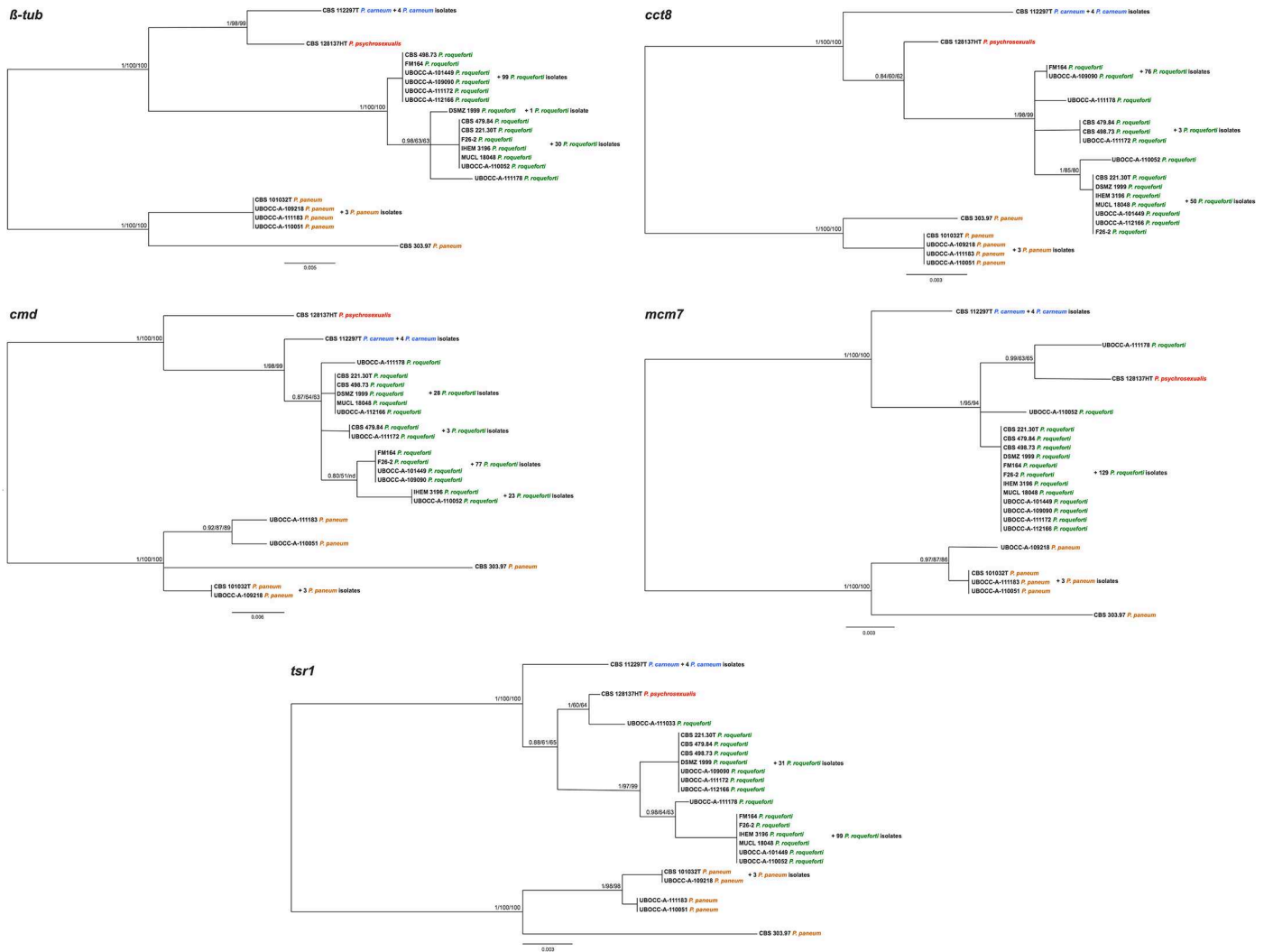
Due to the weak phylogenetic signal of the first five genes (Table 4), three more polymorphic DNA fragments (*Proq235*, 930 bp; *Proq631*, 1029 bp; *Proq845*, 988 bp) were identified by comparing five *P. roqueforti* strains genome sequences and sequenced on the 30 isolates chosen for further phylogenetic reconstructions (S1 Fig; Table 3).

Because the ILD tests indicated significant incongruence between the studied gene trees in both datasets ( *$\beta$ -tub*, *cmd*, *cct8*, *tsr1*, *mcm7* on the one hand and *Proq235*, *Proq631*, *Proq845* on the other hand) ( $P < 0.05$ ), no phylogenetic analyses were performed using concatenated datasets.

## Species delimitation

Considering the five individual gene trees for  *$\beta$ tub*, *cct8*, *cmd*, *mcm7* and *tsr1*, isolates identified as *P. paneum*, *P. carneum* and *P. roqueforti* were systematically assigned to three distinct clades regardless of the method used (ML, MP or Bayesian inference). In contrast, *P. psychrosexualis* isolate CBS 128137<sup>HT</sup> appeared as a sister clade of *P. roqueforti* in the *cct8* tree, as a sister clade of *P. carneum* in the  *$\beta$ tub* tree and basal to *P. carneum* and *P. roqueforti* according to the *cmd* tree and even within the *P. roqueforti* clade in the case of the *mcm7* and *tsr1* trees. In each of the five gene genealogies, multiple subclades appeared within the *P. roqueforti* clade. Some of these subclades were well supported (e.g., in the  *$\beta$ tub* and *tsr1* trees) but not others (e.g., in the *cmd* tree). When considering the well-supported subclades, they did not consistently include the same isolates across the different gene trees. For example, the FM164 and CBS 498.73 isolates were nested in the same subclade in the  *$\beta$ tub* genealogy while placed in two different subclades in the *tsr1* genealogy.

Regarding the individual gene trees obtained for the *Proq235*, *Proq631* and *Proq845* variable regions using only *P. roqueforti* isolates ( $n = 30$ ), all subclades were well supported but again conflicts were observed between the different gene genealogies with regards to *P. roqueforti* subclades relationships and content. Incongruences among the nodes between the different gene genealogies in *P. roqueforti* were observed, as illustrated on the cluster network consensus tree (Fig 3), indicating relatively recent recombination among these groups. No cryptic species could therefore be recognized according to the GC-PSR method.



**Fig 2. Rooted Bayesian trees based on analysis of the separated sequence data ( $\beta$ -tub, cmd, cct8, mcm7, tsr1).** Posterior probabilities followed by bootstrap values of Maximum Likelihood and Maximum Parsimony analyses are indicated next to nodes. The tree was rooted with *Penicillium paneum* isolate CBS 303.97.

doi:10.1371/journal.pone.0129849.g002

### Penicillium roqueforti genetic diversity and population structure

Preliminary tests were performed for the 24 identified microsatellite primer pairs on eight selected isolates. The number of alleles ( $n_a$ ) detected varied from 1 to 4 and Polymorphism Information Content (PIC) values ranged from 0 to 0.72. The four most polymorphic microsatellite markers ( $n_a \geq 3$ ;  $PIC \geq 0.56$ ) were used to genotype the whole collection of *P. roqueforti* isolates ( $n = 164$ ) and allowed to detect 28 haplotypes. Interestingly, only 13 haplotypes were detected among the 140 blue-cheese isolates whereas 15 haplotypes were identified among the other isolates ( $n = 24$ ).

Significant linkage disequilibrium was detected between 5 locus pairs (out of 6) when the dataset was considered as a single population. This may result from a Wahlund effect if differentiated populations exist in the sample. The *P. roqueforti* population structure was further investigated with the STRUCTURE program. It yielded well-defined clusters at K values up to 3 (Fig 4), indicating the existence of three genetically differentiated populations. For K

**Table 3. Information regarding individual Maximum Parsimony trees (*β-tub*, *cct8*, *cmd*, *mcm7*, *tsr1*, *Proq235*, *Proq845* and *Proq631* loci).**

	<i>β-tub</i>	<i>cct8</i>	<i>cmd</i>	<i>mcm7</i>	<i>tsr1</i>	<i>Proq235</i>	<i>Proq845</i>	<i>Proq631</i>
No of isolates analyzed	158	157	159	157	159	30	30	30
Alignable characters	443	1224	465	565	809	930	988	1029
Variable characters	45	52	42	36	49	50	16	15
Informative characters <sup>a</sup>	27	30	22	21	31	50	16	14
Tree length	47	55	49	36	50	50	19	16
Consistency index (CI) <sup>b</sup>	0.979	0.945	0.898	1	0.980	1	0.789	1
Retention index (RI) <sup>c</sup>	0.979	0.932	0.918	1	0.983	1	0.867	1

<sup>a</sup> An informative character is a character for which there are at least two different states in the set of sequences, and each of these states occurs in at least two of the sequences.

<sup>b</sup> The CI is the sum over all characters of the per-character CI defined as  $ms-1$ , where  $m$  is the minimum possible number of character changes (steps) on any tree, and  $s$  is the actual number of steps on the current tree. This index varies from one (no homoplasy) and down towards zero (a lot of homoplasy).

<sup>c</sup> The RI is the sum over all characters of the per-character RI defined as  $(g-s)/(g-m)$ , where  $m$  and  $s$  are as for the per-character CI, while  $g$  is the maximal number of steps for the character on any cladogram. The RI measures the amount of synapomorphy on the tree, and varies from 0 to 1.

doi:10.1371/journal.pone.0129849.t003

values  $\geq 4$ , each new cluster included only admixed genotypes indicating a lack of further supported structure (S2 Fig). The deltaK value confirmed that this split ( $K = 3$ ) was the strongest structure in the data set (Fig 5). Due to the lack of polymorphism in two clusters, linkage disequilibrium could only be assessed in one of the clusters (population 2), being non-significant. The existence of three genetically differentiated populations was further confirmed by fixation index  $F_{ST}$  values, systematically greater than 0.633 (population 2 vs 3: 0.633; population 1 vs 2: 0.7240; population 1 vs 3: 0.8194). Moreover, the AMOVA analysis indicated that most of the genetic variance ( $> 72\%$ ) was located at the among-population level.

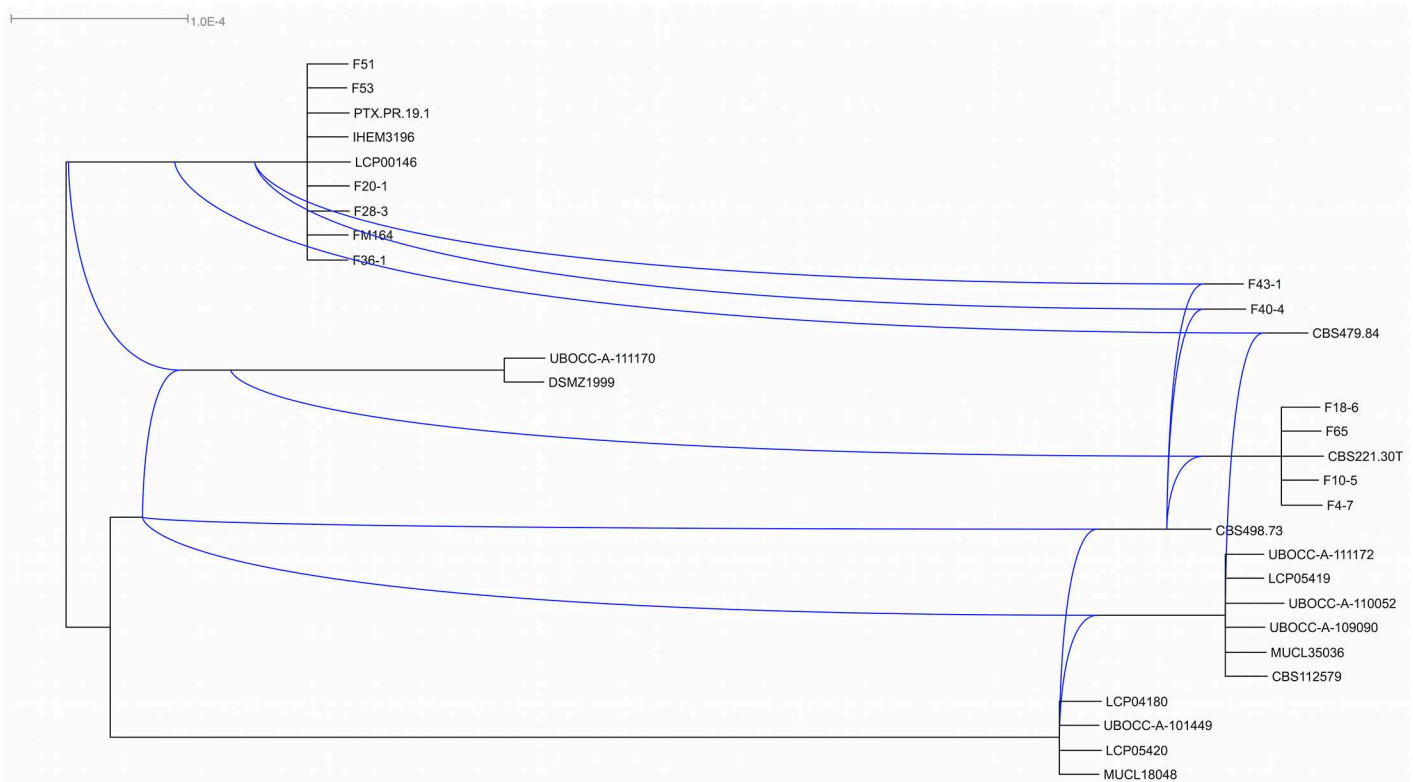
PCA results were also in agreement with the existence of three genetic clusters; the analysis, including all 164 isolates genotyped with four microsatellites, confirmed the differentiation of the three populations, as they did not overlap (Fig 6, with 65.69% and 20.89% of the variance explained by axes 1 and 2, respectively) except for the UBOCC-A-101449 isolate belonging to population 3 and clustering within population 1. Interestingly, the FCA analysis indicated a strong contrast between the three populations in terms of cheese isolate origin (Fig 7). Indeed, strains isolated from a given Protected Designation of Origin (PDO) or Protected Geographical Indication (PGI) cheese type were systematically associated to the same population. For example, most isolates sampled from Roquefort (16 out of 17), from Bleu d’Auvergne (5 out of 7) and all isolates from Bleu des Causses (3 out of 3) were assigned to population 2, while most isolates from Gorgonzola (6 out of 7) and Bleu du Vercors-Sassenage (1 out of 1) were assigned to population 3 and all isolates from Blue Stilton (4 out of 4), Cabrales (2 out of 2), Fourme

**Table 4. Genetic information regarding *β-tub*, *cct8*, *cmd*, *mcm7* and *tsr1* sequence alignments of *Penicillium roqueforti* isolates.**

	<i>β-tub</i>	<i>cct8</i>	<i>cmd</i>	<i>mcm7</i>	<i>tsr1</i>
No of isolates analyzed	144	143	145	143	145
Alignable characters	443	1224	465	565	809
Variable characters	3	6	4	4	10
Informative characters <sup>a</sup>	2	4	3	0	4

<sup>a</sup> An informative character is a character for which there are at least two different states in the set of sequences, and each of these states occurs in at least two of the sequences.

doi:10.1371/journal.pone.0129849.t004



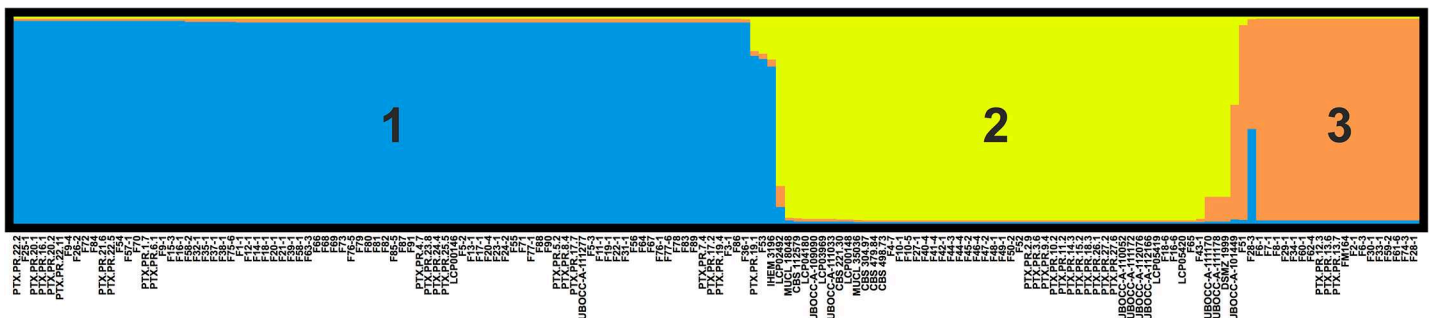
**Fig 3. Cluster network consensus of the three bayesian trees (*Proq235*, *Proq845* and *Proq631*) using Dendroscope.** Hardwire network shows incongruences between clades.

doi:10.1371/journal.pone.0129849.g003

d’Ambert (5 out of 5) and Danish Blue (2 out of 2) were assigned to population 1 (Fig 7, with 53.13% and 46.87% of the variance explained by the 1 and 2 axes, respectively). Noteworthy, a large majority of the non-blue-cheese isolates (21 out of 24) were found in population 2.

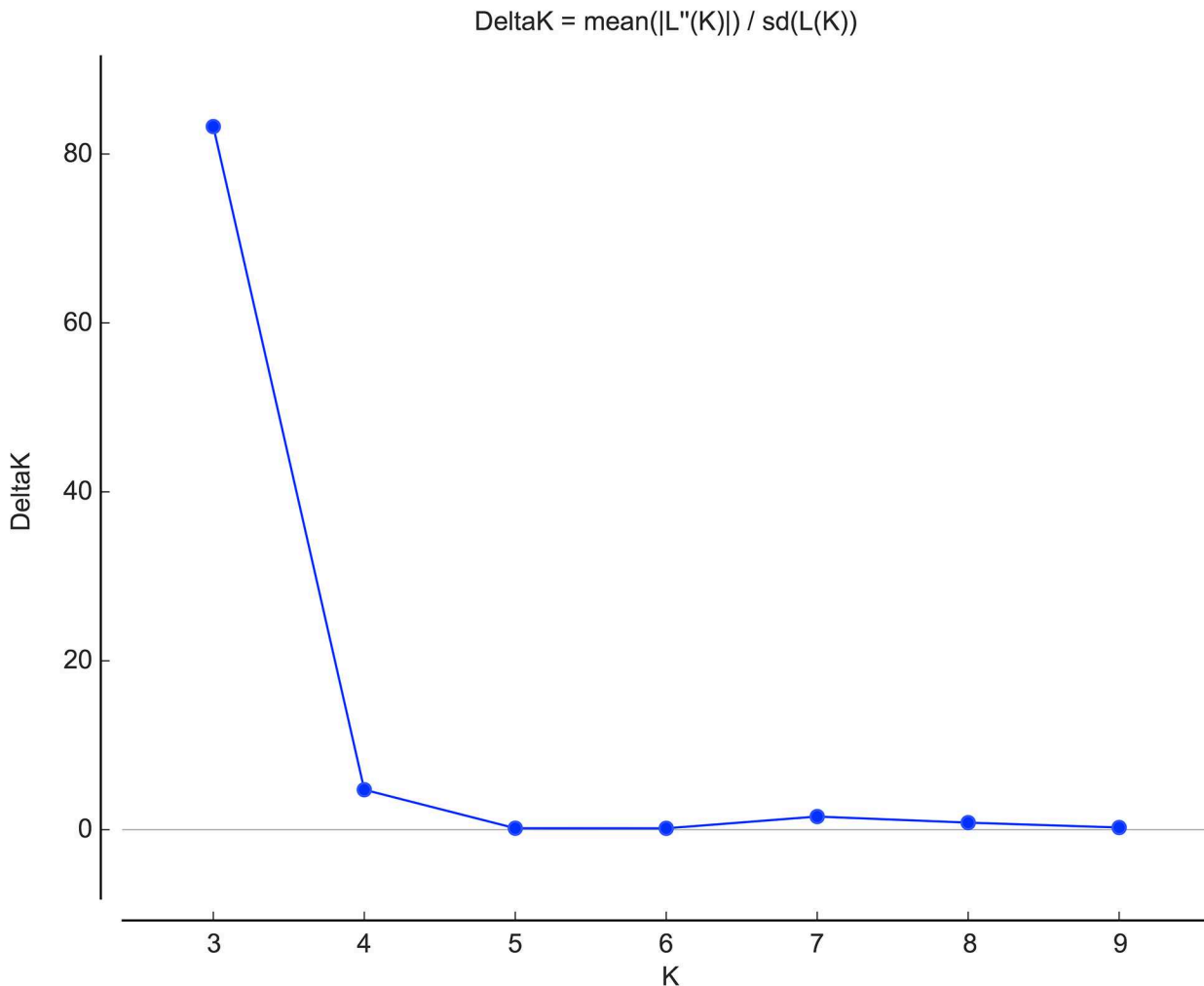
Colony diameters were significantly different between all pairs of populations (Student t-tests,  $P < 0.001$  between populations 2 and 3 and 1 and 3,  $P = 0.01$  between populations 1 and 2). Chi2 tests showed that the colony margin and color obverse were significantly different between populations (Chi2 = 5.4; d.f. = 1;  $P = 0.02$  and Chi2 = 125.3; d.f. = 21;  $P < 0.0001$ , respectively), and the colony texture marginally significantly different (Chi2 = 7.3; d.f. = 3;  $P = 0.06$ ).

In particular, population 3 was almost exclusively composed of isolates with both a velvety to weakly floccose texture and a light greenish gray (5GY—8/1) to pale green (5G<sub>2</sub>/2–6/2)



**Fig 4. Population structure of *Penicillium roqueforti*.** The structure has been inferred by STRUCTURE for K = 3 (see S2 Fig for the barplots corresponding to other K values).

doi:10.1371/journal.pone.0129849.g004



**Fig 5. Detection of the uppermost level of structure assuming nulls as missing data.** Delta K estimated following the Evanno method using Structure Harvester on the web.

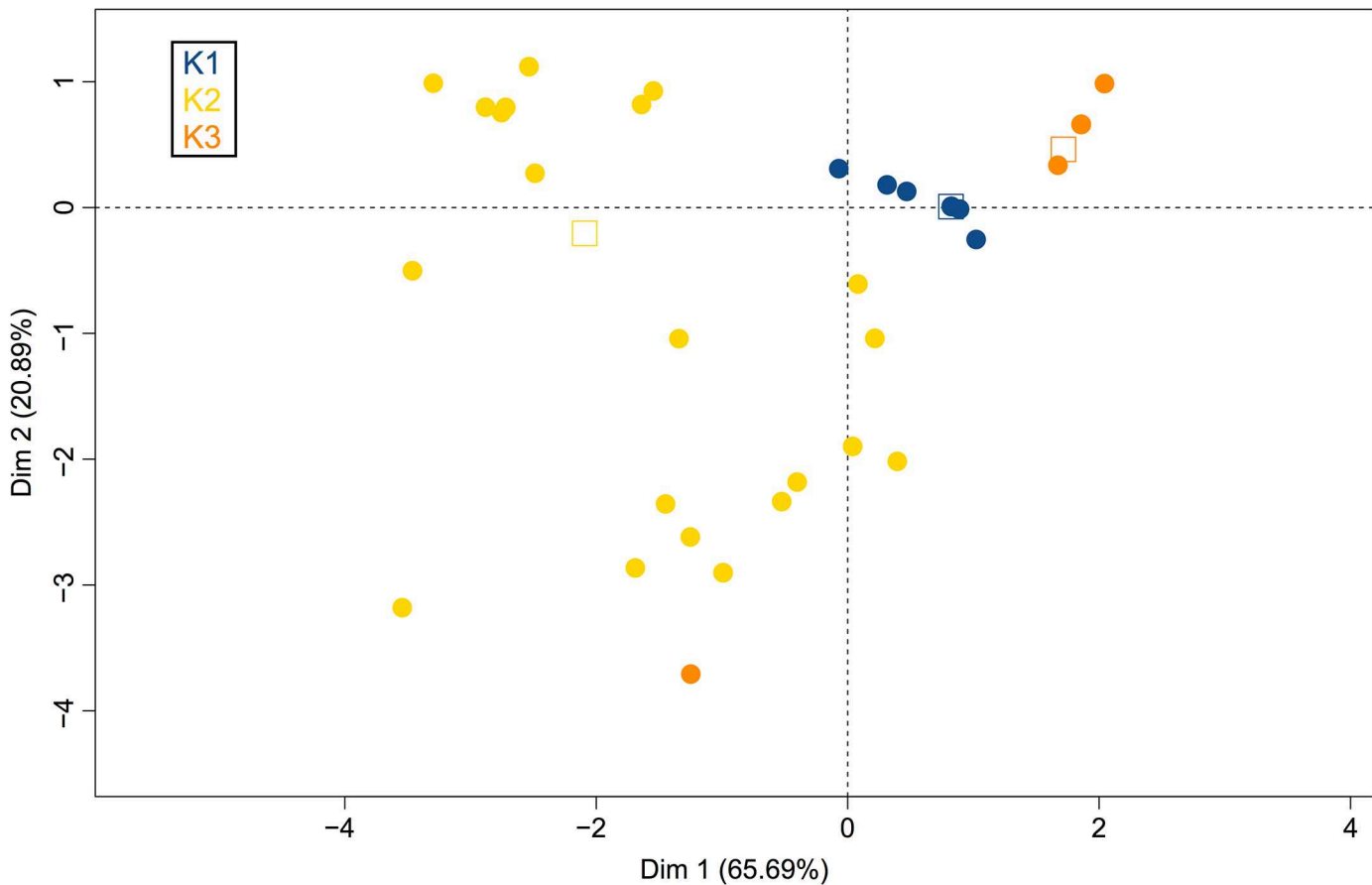
doi:10.1371/journal.pone.0129849.g005

color (20 out of 21). This texture/color combination was not observed in other populations. In addition, population 3 isolates grew much slower than other population isolates (mean diameter of  $51.9 \pm 4.8$  mm vs  $63.7 \pm 9.7$  mm in population 2 and  $66.6 \pm 3.6$  mm in population 1; [S3 Fig](#)).

## Discussion

In this study, we analyzed a large collection of *P. roqueforti* isolates, mainly sampled from different blue cheese types collected worldwide. Substantial morphological diversity was observed. In this context, in order to address whether *P. roqueforti* encompassed different species, eleven loci among the most commonly used for the GC-PSR species delimitation criterion [17,72–77] were tested for polymorphism. The five most polymorphic genes (*βtub*, *cct8*, *cmd*, *mcm7* and *tsr1*) were sequenced in most of the collection. The weak phylogenetic signal of these genes, however, prevented obtaining strong support for nodes within *P. roqueforti*, therefore limiting their utility for applying this method. Nevertheless, incongruence among the different supported nodes indicated that the GC-PSR criterion does not support the existence of cryptic





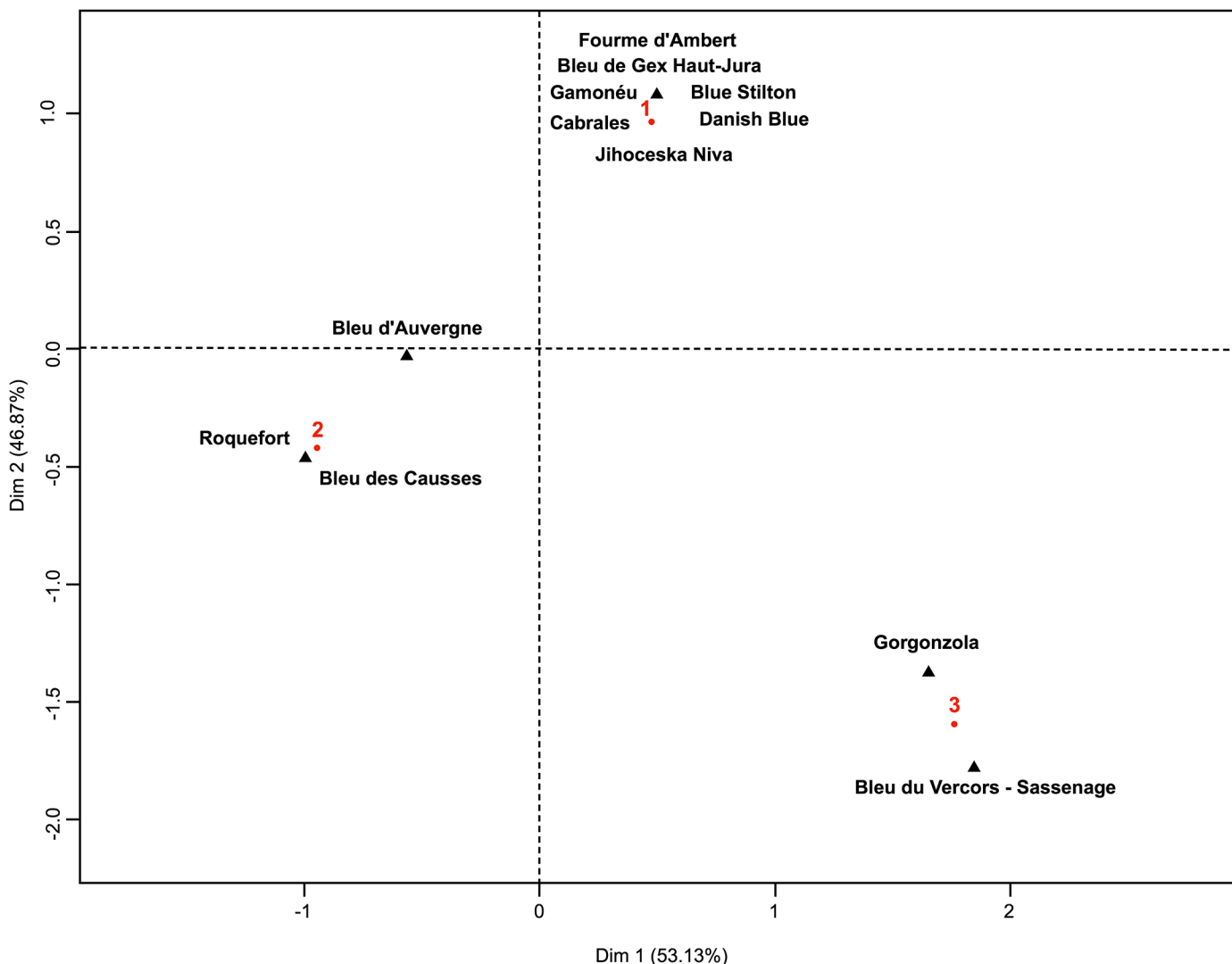
**Fig 6. Principal Correspondence Analysis performed using R from 164 isolates.** Blue, yellow and orange dots correspond respectively to isolates of populations 1, 2 and 3 as defined on Fig 4.

doi:10.1371/journal.pone.0129849.g006

species in *P. roqueforti*. Three additional, more polymorphic fragments were sequenced on a subset of the collection and the supported nodes again appeared incongruent between the gene genealogies. Overall, our results therefore did not show evidence in favor of the existence of different species within *P. roqueforti*. However, the GC-PSR criterion would not detect recently derived species, especially if differentiated at human time scales, as this method requires that DNA fragments had time to coalesce [17,21–23].

The use of four microsatellite markers revealed genetic diversity in the collection, with 28 haplotypes detected. Despite the low number of isolates sampled from other substrates than cheeses, they displayed higher genetic diversity than cheese isolates. This indicates that blue-cheese making does not exploit the entire *P. roqueforti* diversity but instead relies on a limited pool of strains.

Population structure analyses based on the four microsatellite markers confirmed the existence of highly differentiated populations. Using a higher number of microsatellite markers ( $n = 11$ ), Ropars *et al.* [16] identified up to six highly differentiated populations within a collection of 114 *P. roqueforti* isolates. As the present work and the study by Ropars *et al.* [16] shared 53 isolates, a comparison can be performed between the clusters identified in the two studies. The population 2 of the present study corresponded to the cluster B described by Ropars *et al.* [16], that was further subdivided into three populations. Our populations 1 and 3 corresponded to the cluster A detected by Ropars *et al.* [16], that was also further subdivided into



**Fig 7. Factorial Correspondence Analysis individual factor map.** (Protected Designation of Origin/Protected Geographical Indication cheeses & populations as obtained by STRUCTURE). Red numbers (1, 2 & 3) refer to the corresponding populations as defined on Fig 4.

doi:10.1371/journal.pone.0129849.g007

three populations. As in this previous study [16], we found that one cluster included almost all non-blue-cheese isolates.

Importantly, we revealed in this study that the clustering of cheese isolates mainly corresponded to different cheese types. This might suggest that the different cheese-making processes domesticated their own *P. roqueforti* population from a common pool, leading to their genetic differentiation. Noteworthy, a phenotypic differentiation could also be observed. In particular, population 3, which included mainly isolates from Gorgonzola-type cheeses, displayed colony morphologies which were absent from other populations and grew much slower. A strong selection for some desired phenotypic traits may indeed differentiate populations through selective sweeps [78,79], especially in organisms like fungi with infrequent sex events compared to cycles of asexual reproduction.

However, this interpretation seems difficult to reconcile with the high diversity within clusters and the strong divergence between populations, given the human time-scale for

domestication. According to historians, blue-cheese was rarely mentioned before the fifteenth century and was thought to have already been made in France since the chalcolithic [10]. Different blue-cheese technologies may have coexisted for at least 1000 years (e.g., Gorgonzola was first described in the literature in 879 whereas Roquefort was first cited in 1070) [8]. These dates seem too recent to account for the observed genetic differentiation at neutral markers by mere genetic drift, and selective sweeps would have drastically reduced genetic diversity [80,81].

Alternatively, it may be that different cheese producers domesticated distinct, already differentiated, *P. roqueforti* populations, with contrasted metabolic features and morphological traits. The reason for the lack of non-cheese isolates in the cheese clusters may be that these have been domesticated from unsampled ecological niches. In fact, *P. roqueforti* is difficult to isolate from natural habitats (i.e., other than human-made environments); all the strains available in public collections have been found by chance, without searching specifically for them, and usually from human-associated habitats (fruits, wood for wine casks, silage). Like yeasts for a long time [82], the fact that the wild ecological reservoirs for *P. roqueforti* have not been identified probably leads to under-sampling. The genetic structure in *P. roqueforti* reminds that of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in which differentiation has been found according to different food processes (bread, beer, wine or sake) [83–85]. Two scenarios have been proposed, either the domestication of different genetic groups with further selection for improved fermentation properties, or differentiation arising from human activities. Again as in *S. cerevisiae* [86], domestication footprints have been found in *P. roqueforti* and *P. camemberti* cheese fungi genomes, in the form of horizontal gene transfers carrying genes putatively involved in competition against other micro-organisms in cheeses [4]. Multiple genome sequence comparisons of wild strains vs cheese strains originating from the different populations detected in the present study would allow addressing the question of whether cheese strain genomes display footprints of adaptation that have led to metabolic specialization. Such footprints have been found for instance in *Aspergillus oryzae* [87], where an atoxigenic lineage of the pathogen *Aspergillus flavus* gradually evolved into a “cell factory” for enzymes and metabolites involved in the saccharification process. Evidence of genomic adaptation have also been reported in several other domesticated fungi [88].

In conclusion, while morphological differences were observed in *P. roqueforti*, they are not linked with the existence of different species as suggested by the GC-PSR analysis, although this method has some limitations. Interestingly, at the intraspecific level, the use of microsatellites revealed the existence of highly differentiated populations, corresponding to blue cheese types. This suggests that different populations, either ecotypes or allopatric populations, were recruited for different cheese types. Further physiological and metabolic studies are also needed to test for a link between *P. roqueforti* diversity and structure described in the present study and putative functional diversity.

## Supporting Information

**S1 Fig. Unrooted Bayesian trees based on analysis of the separated sequence data (*Proq235*, *Proq845* and *Proq631*).** Posterior probabilities followed by bootstrap values of Maximum Likelihood and Maximum Parsimony analyses are indicated next to nodes.

(TIFF)

**S2 Fig. Population structure of *Penicillium roqueforti*.** Barplots corresponding to K values from 2 to 6.

(TIFF)

**S3 Fig. Diameter measurements of *Penicillium roqueforti* isolates according to population.** Each isolate associated to a population is indicated by a cross (x). Error bars show the standard deviation for mean diameters ( ) of each population.

(TIFF)

**S1 Table. Information about cheeses collected to establish the *Penicillium roqueforti* collection.**

(DOCX)

**S2 Table. *Penicillium* spp. isolates included in the present study and their origin.**

(DOCX)

**S3 Table. Cycling conditions/PCR programs used for partial gene and microsatellites region amplifications.**

(DOCX)

**S4 Table. GenBank accession numbers for all loci studied among *Penicillium* spp. isolates.**

(DOCX)

**S5 Table. Colony morphology of the 157 isolates on Potato Dextrose Agar medium.**

(DOCX)

## Acknowledgments

We thank all the people worldwide who kindly provided cheese samples and therefore allowed us to create the working collection: Tim Cogan, Raphaël Coton, Anne-Marie Coton, Andrew Dabrowski, Laurent Esclade, Maria Fernandez, Kévin Fontaine, Gareth Griffith, Alexis Guerin-Laguette, Frida Hassler, Jussi Heinonsalo, Ieva Jakobija, Annavera Laminolara, Vanesa Ludemann, Marie-Christine Montel, Marie-Pierre Murray, Jérôme Mounier, Patrice Nodet, Martina Peter and Hein Trip. We are grateful to Jos Houbraken for providing the *P. psychrosexualis* CBS 128137<sup>HT</sup> isolate, to J.I. Pitt for helpful discussions on *P. roqueforti* macromorphology, to Patrice Nodet for his expertise on *P. roqueforti* micromorphology and to Emese Meglecz for help with QDD. We also thank Florian Thomas for technical assistance and Nicolas Ollier and Julie Hutchinson for the photographs in [Fig 1](#).

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EC JLJ MC GG TG. Performed the experiments: GG SD MC JLJ. Analyzed the data: GG JLJ MC GLF JR MLV JD AB TG EC. Contributed reagents/materials/analysis tools: GG JLJ MC GLF JR MLV JD AB TG EC. Wrote the paper: GG JLJ MC JR TG EC.

## References

1. Hawksworth DL. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol Res.* 1991; 95: 641–655. doi: [10.1016/S0953-7562\(09\)80810-1](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80810-1)
2. Bass D, Richards TA. Three reasons to re-evaluate fungal diversity “on Earth and in the ocean.” *Fungal Biol Rev.* 2011; 25: 159–164. doi: [10.1016/j.fbr.2011.10.003](https://doi.org/10.1016/j.fbr.2011.10.003)
3. Giraud T, Refrégier G, Le Gac M, de Vienne DM, Hood ME. Speciation in fungi. *Fungal Genet Biol.* 2008; 45: 791–802. doi: [10.1016/j.fgb.2008.02.001](https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.02.001) PMID: [18346919](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18346919/)
4. Cheeseman K, Ropars J, Renault P, Dupont J, Gouzy J, Branca A, et al. Multiple recent horizontal transfers of a large genomic region in cheese making fungi. *Nat Commun.* 2014; 5. doi: [10.1038/ncomms3876](https://doi.org/10.1038/ncomms3876)
5. Sandine WE, Elliker PR. Microbially induced flavors and fermented foods. Flavor in fermented dairy products. *J Agric Food Chem.* 1970; 18: 557–562. doi: [10.1021/jf60170a023](https://doi.org/10.1021/jf60170a023)

6. Beresford TP, Fitzsimons NA, Brennan NL, Cogan TM. Recent advances in cheese microbiology. *Int Dairy J.* 2001; 11: 259–274. doi: [10.1016/S0958-6946\(01\)00056-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00056-5)
7. Salque M, Bogucki PI, Pyzel J, Sobkowiak-Tabaka I, Grygiel R, Szmyt M, et al. Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium bc in northern Europe. *Nature.* 2013; 493: 522–525. doi: [10.1038/nature11698](https://doi.org/10.1038/nature11698) PMID: [23235824](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23235824/)
8. Fox PF, McSweeney PLH. Cheese: An Overview. In: Fox PF, McSweeney PLH, Cogan TM, Guinee TP, editors. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology.* 3rd ed. London: Elsevier Academic Press; 2004. pp. 1–18.
9. Cantor MD, van den Tempel T, Hansen TK, Ardö Y. Blue cheese. In: Fox PF, McSweeney PLH, Cogan TM, Guinee TP, editors. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology.* 3rd ed. London: Elsevier Academic Press; 2004. pp. 175–198.
10. Dumay R. *Le Roquefort.* Rodez/Paris: Perspectives Aveyronnaises/Montalba; 1982.
11. CNIEL, editor. *L'économie laitière en chiffres,* Edition 2014, CNIEL. 2014.
12. Pitt JI, Hocking AD. *Fungi and Food Spoilage.* 3rd ed. New-York: Springer; 2009.
13. Samson RA, Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B. *Food and Indoor Fungi.* Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre; 2010.
14. Abbas A, Dobson ADW. Yeasts and Molds: *Penicillium roqueforti.* In: Fuquay JW, editor. *Encyclopedia of Dairy Sciences ( Second Edition).* San Diego: Academic Press; 2011. pp. 772–775. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123744074003630>
15. Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, Hong S-B, Klaassen CHW, Perrone G, et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium.* *Stud Mycol.* 2014; 78: 343–371. doi: [10.1016/j.simyco.2014.09.001](https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001) PMID: [25505353](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25505353/)
16. Ropars J, López-Villavicencio M, Dupont J, Snirc A, Gillot G, Coton M, et al. Induction of sexual reproduction and genetic diversity in the cheese fungus *Penicillium roqueforti.* *Evol Appl.* 2014; 7: 433–441. doi: [10.1111/eva.12140](https://doi.org/10.1111/eva.12140) PMID: [24822078](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24822078/)
17. Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet Biol.* 2000; 31: 21–32. doi: [10.1006/fgbi.2000.1228](https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1228) PMID: [11118132](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11118132/)
18. Le Gac M, Hood ME, Fournier E, Giraud T. Phylogenetic evidence of host-specific cryptic species in the anther smut fungus. *Evol Int J Org Evol.* 2007; 61: 15–26. doi: [10.1111/j.1558-5646.2007.00002.x](https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00002.x)
19. Dettman JR, Sirjusingh C, Kohn LM, Anderson JB. Incipient speciation by divergent adaptation and antagonistic epistasis in yeast. *Nature.* 2007; 447: 585–588. doi: [10.1038/nature05856](https://doi.org/10.1038/nature05856) PMID: [17538619](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17538619/)
20. Ropars J, Dupont J, Fontanillas E, Rodríguez de la Vega RC, Malagnac F, Coton M, et al. Sex in cheese: evidence for sexuality in the fungus *Penicillium roqueforti.* *PLoS ONE.* 2012; 7: e49665. doi: [10.1371/journal.pone.0049665](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049665) PMID: [23185400](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23185400/)
21. Degnan JH, Rosenberg NA. Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. *Trends Ecol Evol.* 2009; 24: 332–340. doi: [10.1016/j.tree.2009.01.009](https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.01.009) PMID: [19307040](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19307040/)
22. Knowles LL. Estimating species trees: methods of phylogenetic analysis when there is incongruence across genes. *Syst Biol.* 2009; 58: 463–467. doi: [10.1093/sysbio/syp061](https://doi.org/10.1093/sysbio/syp061) PMID: [20525600](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20525600/)
23. Chung Y. Inference of gene tree discordance and recombination [Internet]. M.Sc. Thesis, University of Wisconsin-Madison. 2012. Available: <http://gradworks.umi.com/35/47/3547821.html>
24. Munsell Color Company. *Munsell Soil Color Charts 2009 Revised Edition.* Grand Rapids, Michigan: X-Rite America; 2009.
25. Pitt JI. *A Laboratory Guide to Common Penicillium Species.* 2nd ed. CSIRO Food Research Laboratory, P.O. Box 52, North Ryde, N.S.W. 2113, Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing; 1988.
26. Institute SAS. *JMP. Version 7.* SAS Institute Inc. Cary, North Carolina; 2007.
27. Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61: 1323–1330. PMID: [7747954](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7747954/)
28. Samson RA, Seifert KA, Kuijpers AFA, Houbraken JAMP, Frisvad JC. Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial  $\beta$ -tubulin sequences. *Stud Mycol.* 2004; 49: 175–200.
29. White T, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M, Gelfand D, Shinsky J, White T, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* New-York: Academic Press; 1990. pp. 315–322.
30. Gargas A, Taylor JW. Polymerase Chain Reaction (PCR) primers for amplifying and sequencing nuclear 18s rDNA from lichenized fungi. *Mycologia.* 1992; 84: 589. doi: [10.2307/3760327](https://doi.org/10.2307/3760327)

31. Kauff F, Lutzoni F. Phylogeny of the Gyalectales and Ostropales (Ascomycota, Fungi): among and within order relationships based on nuclear ribosomal RNA small and large subunits. *Mol Phylogenet Evol.* 2002; 25: 138–156. doi: [10.1016/S1055-7903\(02\)00214-2](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00214-2) PMID: [12383757](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12383757/)
32. Vilgalys R, Hester M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J Bacteriol.* 1990; 172: 4238–4246. PMID: [2376561](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2376561/)
33. Rehner SA, Samuels GJ. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycol Res.* 1994; 98: 625–634. doi: [10.1016/S0953-7562\(09\)80409-7](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80409-7)
34. Houbraken J, Samson RA. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Stud Mycol.* 2011; 70: 1–51. doi: [10.3114/sim.2011.70.01](https://doi.org/10.3114/sim.2011.70.01) PMID: [22308045](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22308045/)
35. Liu YJ, Whelen S, Hall BD. Phylogenetic relationships among Ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol Biol Evol.* 1999; 16: 1799–1808. PMID: [10605121](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10605121/)
36. Peterson SW. Multilocus DNA sequence analysis shows that *Penicillium biourgeianum* is a distinct species closely related to *P. brevicompactum* and *P. olsonii*. *Mycol Res.* 2004; 108: 434–440. doi: [10.1017/S0953756204009761](https://doi.org/10.1017/S0953756204009761) PMID: [15209283](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15209283/)
37. Kearsey SE, Labib K. MCM proteins: evolution, properties, and role in DNA replication. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1398: 113–136. PMID: [9689912](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9689912/)
38. Gelperin D, Horton L, Beckman J, Hensold J, Lemmon SK. Bms1p, a novel GTP-binding protein, and the related Tsr1p are required for distinct steps of 40S ribosome biogenesis in yeast. *RNA.* 2001; 7: 1268–1283. PMID: [11565749](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11565749/)
39. Léger-Silvestre I, Milkereit P, Ferreira-Cerca S, Saveanu C, Rousselle J-C, Choismel V, et al. The ribosomal protein Rps15p is required for nuclear exit of the 40S subunit precursors in yeast. *EMBO J.* 2004; 23: 2336–2347. doi: [10.1038/sj.emboj.7600252](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600252) PMID: [15167894](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15167894/)
40. Kim S, Willison KR, Horwich AL. Cytosolic chaperonin subunits have a conserved ATPase domain but diverged polypeptide-binding domains. *Trends Biochem Sci.* 1994; 19: 543–548. doi: [10.1016/0968-0004\(94\)90058-2](https://doi.org/10.1016/0968-0004(94)90058-2) PMID: [7846767](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7846767/)
41. Stoldt V, Rademacher F, Kehren V, Ernst JF, Pearce DA, Sherman F. Review: The Cct eukaryotic chaperonin subunits of *Saccharomyces cerevisiae* and other yeasts. *Yeast.* 1996; 12: 523–529. doi: [10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199605\)12:6<523::AID-YEA962>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199605)12:6<523::AID-YEA962>3.0.CO;2-C) PMID: [8771707](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8771707/)
42. Hong S-B, Go S-J, Shin H-D, Frisvad JC, Samson RA. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia.* 2005; 97: 1316–1329. doi: [10.3852/mycologia.97.6.1316](https://doi.org/10.3852/mycologia.97.6.1316) PMID: [16722222](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16722222/)
43. Schmitt I, Crespo A, Divakar PK, Fankhauser JD, Herman-Sackett E, Kalb K, et al. New primers for promising single-copy genes in fungal phylogenetics and systematics. *Persoonia.* 2009; 23: 35–40. doi: [10.3767/003158509X470602](https://doi.org/10.3767/003158509X470602) PMID: [20198159](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20198159/)
44. Houbraken J, Spierenburg H, Frisvad JC. *Rasamsonia*, a new genus comprising thermotolerant and thermophilic *Talaromyces* and *Geosmithia* species. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2012; 101: 403–421. doi: [10.1007/s10482-011-9647-1](https://doi.org/10.1007/s10482-011-9647-1) PMID: [21965082](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21965082/)
45. Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 2009; 25: 1451–1452. doi: [10.1093/bioinformatics/btp187](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187) PMID: [19346325](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19346325/)
46. Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics.* 2007; 23: 1289–1291. doi: [10.1093/bioinformatics/btm091](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm091) PMID: [17379693](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17379693/)
47. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40: e115–e115. doi: [10.1093/nar/gks596](https://doi.org/10.1093/nar/gks596) PMID: [22730293](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22730293/)
48. Maddison W, Maddison D. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. 2011; Available: <http://mesquiteproject.org>
49. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol.* 2013; 30: 772–780. doi: [10.1093/molbev/ms010](https://doi.org/10.1093/molbev/ms010) PMID: [23329690](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23329690/)
50. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol.* 2003; 52: 696–704. doi: [10.1080/10635150390235520](https://doi.org/10.1080/10635150390235520) PMID: [14530136](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14530136/)
51. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods.* 2012; 9: 772–772. doi: [10.1038/nmeth.2109](https://doi.org/10.1038/nmeth.2109) PMID: [22847109](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22847109/)
52. Swofford DL. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates; 2003.
53. Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics.* 2001; 17: 754–755. doi: [10.1093/bioinformatics/17.8.754](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754) PMID: [11524383](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11524383/)

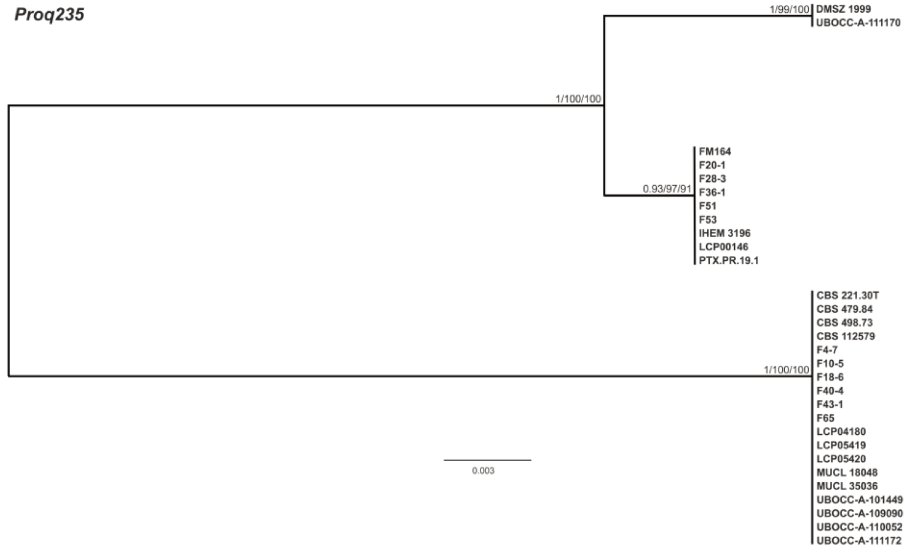


54. Ronquist F, Huelsenbeck JP. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 2003; 19: 1572–1574. doi: [10.1093/bioinformatics/btg180](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180) PMID: [12912839](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12912839/)
55. Nylander JAA, Wilgenbusch JC, Warren DL, Swofford DL. AWTY (are we there yet?): a system for graphical exploration of MCMC convergence in Bayesian phylogenetics. *Bioinformatics*. 2008; 24: 581–583. doi: [10.1093/bioinformatics/btm388](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm388) PMID: [17766271](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17766271/)
56. Farris JS, Källersjö M, Kluge AG, Bult C. Testing significance of incongruence. *Cladistics*. 1994; 10: 315–319. doi: [10.1111/j.1096-0031.1994.tb00181.x](https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.1994.tb00181.x)
57. Huson DH, Richter DC, Rausch C, DeZulian T, Franz M, Rupp R. Dendroscope: an interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics*. 2007; 8: 460. doi: [10.1186/1471-2105-8-460](https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-460) PMID: [18034891](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18034891/)
58. Huson DH, Scornavacca C. Dendroscope 3: an interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks. *Syst Biol*. 2012;0: 1–7. doi: [10.1093/sysbio/sys062](https://doi.org/10.1093/sysbio/sys062)
59. Kofler R, Schlötterer C, Lelley T. SciRoKo: a new tool for whole genome microsatellite search and investigation. *Bioinformatics*. 2007; 23: 1683–1685. doi: [10.1093/bioinformatics/btm157](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm157) PMID: [17463017](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17463017/)
60. Sweet MJ, Scriven LA, Singleton I. Microsatellites for microbiologists. *Adv Appl Microbiol*. 2012; 81: 169–207. doi: [10.1016/B978-0-12-394382-8.00005-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394382-8.00005-8) PMID: [22958530](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22958530/)
61. Megléc E, Costedoat C, Dubut V, Gilles A, Malausa T, Pech N, et al. QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinforma Oxf Engl*. 2010; 26: 403–404. doi: [10.1093/bioinformatics/btp670](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp670)
62. Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered*. 1995; 86: 248–249.
63. Rousset F. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour*. 2008; 8: 103–106. doi: [10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x) PMID: [21585727](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21585727/)
64. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000; 155: 945–959. PMID: [10835412](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10835412/)
65. Jakobsson M, Rosenberg NA. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*. 2007; 23: 1801–1806. doi: [10.1093/bioinformatics/btm233](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm233) PMID: [17485429](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17485429/)
66. Rosenberg NA. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Mol Ecol Notes*. 2004; 4: 137–138. doi: [10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x](https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x)
67. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol*. 2005; 14: 2611–2620. doi: [10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x) PMID: [15969739](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15969739/)
68. Earl DA, vonHoldt BM. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour*. 2012; 4: 359–361. doi: [10.1007/s12686-011-9548-7](https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7)
69. Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 1992; 131: 479–491. PMID: [1644282](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1644282/)
70. Meirmans PG, Van Tienderen PH. GENOTYPE and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Mol Ecol Notes*. 2004; 4: 792–794. doi: [10.1111/j.1471-8286.2004.00770.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00770.x)
71. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2014. Available: <http://www.R-project.org>
72. Miller AN, Huhndorf SM. Using phylogenetic species recognition to delimit species boundaries within *Lasiosphaeria*. *Mycologia*. 2004; 96: 1106–1127. PMID: [21148930](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21148930/)
73. Grünig CR, Brunner PC, Duò A, Sieber TN. Suitability of methods for species recognition in the *Phialocephala fortinii*–*Acephala applanata* species complex using DNA analysis. *Fungal Genet Biol*. 2007; 44: 773–788. doi: [10.1016/j.fgb.2006.12.008](https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.12.008) PMID: [17289408](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17289408/)
74. Pavlic D, Slippers B, Coutinho TA, Wingfield MJ. Multiple gene genealogies and phenotypic data reveal cryptic species of the Botryosphaeriaceae: a case study on the *Neofusicoccum parvum*/*N. ribis* complex. *Mol Phylogenet Evol*. 2009; 51: 259–268. doi: [10.1016/j.ympev.2008.12.017](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.12.017) PMID: [19152837](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19152837/)
75. Peterson SW, Orchard SS, Menon S. *Penicillium menonorum*, a new species related to *P. pimi-teouiense*. *IMA Fungus*. 2011; 2: 121–125. doi: [10.5598/imafungus.2011.02.02.02](https://doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.02.02) PMID: [22679596](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22679596/)
76. Hermet A, Méheust D, Mounier J, Barbier G, Jany J-L. Molecular systematics in the genus *Mucor* with special regards to species encountered in cheese. *Fungal Biol*. 2012; 116: 692–705. doi: [10.1016/j.funbio.2012.04.002](https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.04.002) PMID: [22658314](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22658314/)

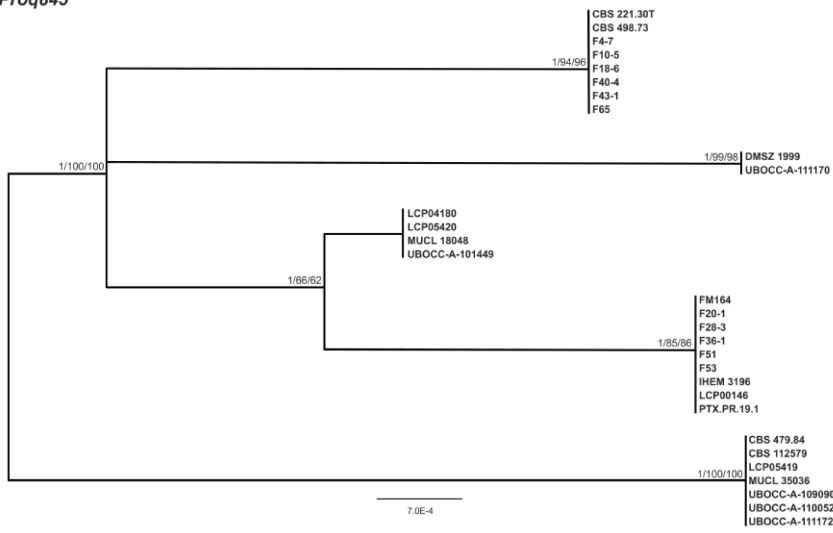
77. Vialle A, Feau N, Frey P, Bernier L, Hamelin RC. Phylogenetic species recognition reveals host-specific lineages among poplar rust fungi. *Mol Phylogenet Evol.* 2013; 66: 628–644. doi: [10.1016/j.ympev.2012.10.021](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.10.021) PMID: [23147268](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23147268/)
78. Smith JM, Haigh J. The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genet Res.* 1974; 23: 23–35. doi: [10.1017/S0016672300014634](https://doi.org/10.1017/S0016672300014634) PMID: [4407212](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4407212/)
79. Chen H, Patterson N, Reich D. Population differentiation as a test for selective sweeps. *Genome Res.* 2010; 20: 393–402. doi: [10.1101/gr.100545.109](https://doi.org/10.1101/gr.100545.109) PMID: [20086244](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20086244/)
80. Kaplan NL, Hudson RR, Langley CH. The “hitchhiking effect” revisited. *Genetics.* 1989; 123: 887–899. PMID: [2612899](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2612899/)
81. Sabeti PC, Schaffner SF, Fry B, Lohmueller J, Varilly P, Shamovsky O, et al. Positive natural selection in the human lineage. *Science.* 2006; 312: 1614–1620. doi: [10.1126/science.1124309](https://doi.org/10.1126/science.1124309) PMID: [16778047](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16778047/)
82. Liti G, Carter DM, Moses AM, Warringer J, Parts L, James SA, et al. Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature.* 2009; 458: 337–341. doi: [10.1038/nature07743](https://doi.org/10.1038/nature07743) PMID: [19212322](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19212322/)
83. Fay JC, Benavides JA. Evidence for Domesticated and Wild Populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 2005; 1: e5. doi: [10.1371/journal.pgen.0010005](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0010005)
84. Legras J-L, Merdinoglu D, Cornuet J-M, Karst F. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Mol Ecol.* 2007; 16: 2091–2102. doi: [10.1111/j.1365-294X.2007.03266.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03266.x) PMID: [17498234](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17498234/)
85. Sicard D, Legras J-L. Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *C R Biol.* 2011; 334: 229–236. doi: [10.1016/j.crv.2010.12.016](https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.12.016) PMID: [21377618](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21377618/)
86. Novo M, Bigey F, Beyne E, Galeote V, Gavory F, Mallet S, et al. Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *Proc Natl Acad Sci.* 2009; 106: 16333–16338. doi: [10.1073/pnas.0904673106](https://doi.org/10.1073/pnas.0904673106) PMID: [19805302](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19805302/)
87. Gibbons JG, Salichos L, Slot JC, Rinker DC, McGary KL, King JG, et al. The evolutionary imprint of domestication on genome variation and function of the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Curr Biol.* 2012; 22: 1403–1409. doi: [10.1016/j.cub.2012.05.033](https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.033) PMID: [22795693](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22795693/)
88. Gladioux P, Ropars J, Badouin H, Branca A, Aguilera G, de Vienne DM, et al. Fungal evolutionary genomics provides insight into the mechanisms of adaptive divergence in eukaryotes. *Mol Ecol.* 2014; 23: 753–773. doi: [10.1111/mec.12631](https://doi.org/10.1111/mec.12631) PMID: [24341913](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24341913/)



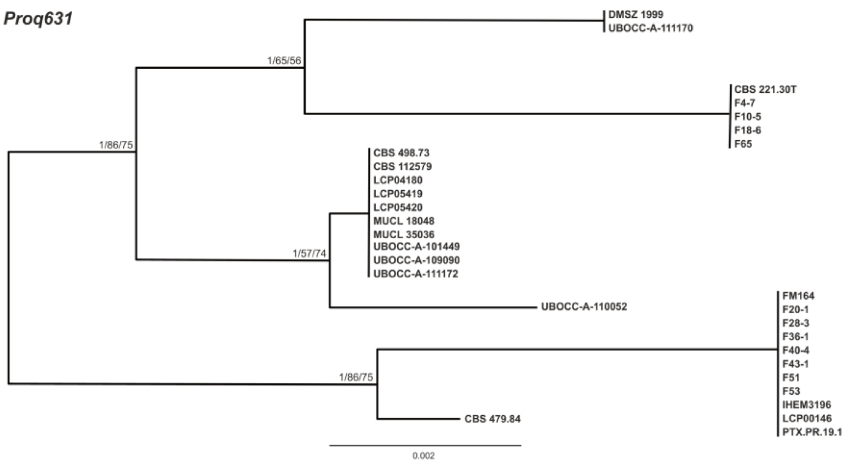
**Proq235**



**Proq845**

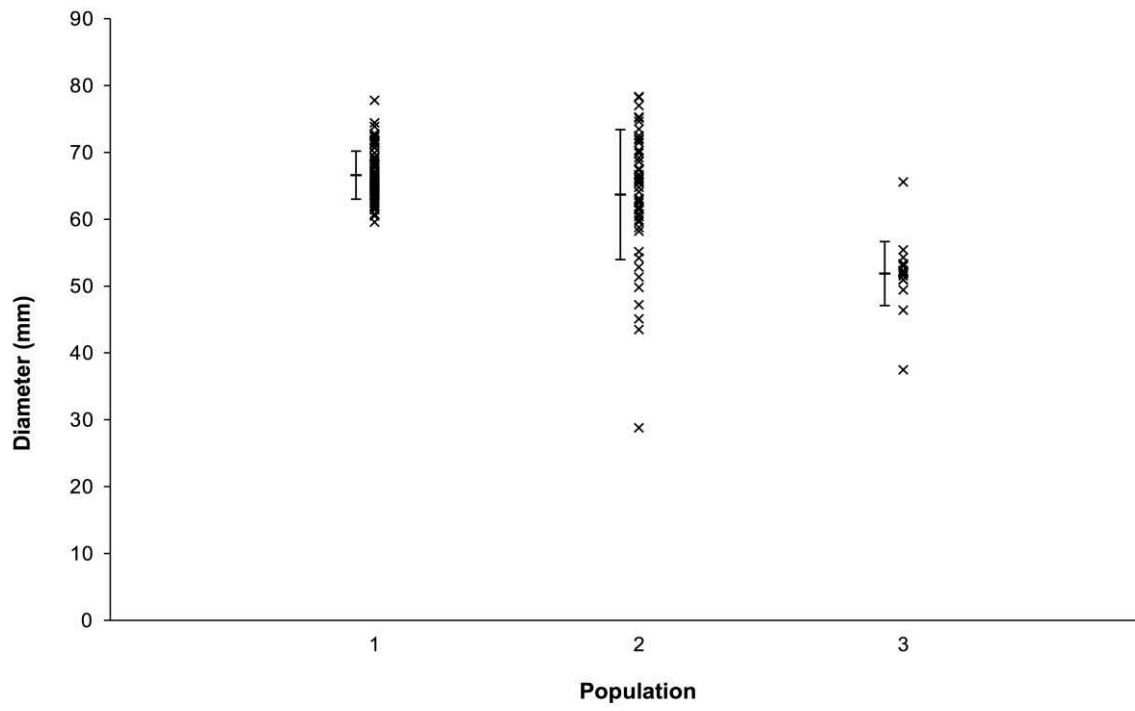


**Proq631**



**S1 Fig.**





S3 Fig.

**Supporting Information Table S1. Information about cheeses collected to establish the *Penicillium roqueforti* collection.**

Cheese code	Corresponding isolates	Cheese designation <sup>a</sup> (if PDO or PGI <sup>b</sup> )	Product detail	Lot number	Purchase location	Purchase date	Best-before date	Origin
F1	F1-1	Blue cheese			Ontario, Canada	10/21/11		Canada
F2	F2-1	Blue cheese	Cow milk, <i>Penicillium roqueforti</i> , certified organic farmstead cheese by OCQV		Ontario, Canada	10/21/11		Canada
F3	F3-1	Blue cheese	Cow milk		Ontario, Canada	10/21/11		Canada
F4	F4-7	Blue cheese	Certified organic farmstead cheese by OCQV, raw cow milk		Ontario, Canada	10/21/11		Canada
F5	F5-2, F5-3	Fourme d'Ambert	Cow milk		Plouzané, France	10/21/11		France
F6	F6-1, F6-3	Gorgonzola	Whole cow milk		Milan, Italy	10/25/11		Italy
F7	F7-1	Gorgonzola	Whole cow milk		Milan, Italy	10/25/11		Italy
F8	F8-1	Gorgonzola	Whole cow milk		Milan, Italy	10/25/11		Italy
F9	F9-1, F9-4	Fourme d'Ambert	Cow milk		INRA, Aurillac, France	11/03/11		France
F10	F10-1, F10-5	Bleu d'Auvergne	Cow milk		INRA, Aurillac, France	11/03/11		France
F11	F11-1	Blue cheese	Pasteurized cow milk, salt, Lactic Acid Bacteria		INRA, Aurillac, France	11/03/11		France
F12	F12-1	Blue cheese			INRA, Aurillac, France	11/03/11		France
F13	F13-1	Blue cheese			INRA, Aurillac, France	11/03/11		France
F14	F14-1	Blue cheese			Rio de Janiero, Brazil	11/04/11		Argentina
F15	F15-3	Blue cheese	Pasteurized milk, <i>Penicillium roqueforti</i>	E1275204	Rio de Janiero, Brazil	11/04/11	11/29/11	Brazil
F16	F16-1, F16-6	Blue cheese	Cow and sheep milk		IPLA, Oviedo, Spain	11/07/11		Spain
F17	F17-1	Blue cheese	Cow and sheep milk		IPLA, Oviedo, Spain	11/07/11		Spain
F18	F18-1, F18-6	Blue cheese	Cow, goat and sheep milk (whole and raw)		IPLA, Oviedo, Spain	11/07/11		Spain
F19	F19-1	Blue cheese	Cow milk		IPLA, Oviedo, Spain	11/07/11		Spain
F20	F20-1, F20-4	Cabrales	Cow, goat and/or sheep milk (whole and raw)		IPLA, Oviedo, Spain	11/07/11		Spain
F21	F21-1	Gamonéu	Cow, goat and/or sheep milk (whole and raw)		IPLA, Oviedo, Spain	11/07/11		Spain
F22	F22-1	Blue cheese	Raw goat milk, organic		Kaashandel van der Ley, Oosterstraat 61-63, Groningen, Netherlands	11/08/11		Netherlands
F23	F23-1	Blue cheese	Cow milk, organic		Kaashandel van der Ley, Oosterstraat 61-63, Groningen, Netherlands	11/08/11		Netherlands
F24	F24-2	Blue cheese	Pasteurized cow milk		Kaashandel van der Ley, Oosterstraat 61-63, Groningen, Netherlands	11/08/11		Netherlands
F25	F25-1	Blue cheese	Pasteurized cow milk, organic		Kaashandel van der Ley, Oosterstraat 61-63, Groningen, Netherlands	11/08/11		Netherlands
F26	F26-2	Blue cheese	Pasteurized goat milk		Kaashandel van der Ley, Oosterstraat 61-63, Groningen, Netherlands	11/08/11		Netherlands
F27	F27-1	Blue cheese	Cow milk		Chicago, USA	11/21/11		USA
F28	F28-1, F28-3	Blue cheese	Cow milk, <i>Penicillium roqueforti</i>		Riga, Latvia	11/25/11	12/19/11	Latvia
F29	F29-1	Blue cheese	Pasteurized milk, <i>Penicillium roqueforti</i>	L:1411	Riga, Latvia	11/25/11	12/21/11	Denmark

F30	F30-1	Blue cheese	Pasteurized milk, Penicillium roqueforti		Riga, Latvia	11/25/11		Poland
F31	F31-1	Blue cheese	Pasteurized milk		Riga, Latvia	11/25/11		Latvia
F32	F32-1	Blue cheese	Creamy blue, pasteurized milk, Penicillium roqueforti	L 2318	Riga, Latvia	11/25/11	12/14/11	Denmark
F33	F33-1	Blue cheese	Pasteurized cow milk		Riga, Latvia	11/25/11	12/26/11	Germany
F34	F34-1	Blue cheese	Penicillium roqueforti		Riga, Latvia	11/25/11	01/29/12	Germany
F35	F35-1	Blue cheese	Pasteurized milk		Riga, Latvia	11/25/11	01/12/12	Germany
F36	F36-1	Blue cheese	Cow milk	19:03/L3	Nettersheim, Germany	12/01/12	12/12/11	Germany
F37	F37-1	Blue cheese	Cow milk	27709	Nettersheim, Germany	12/01/12	01/24/12	Germany
F38	F38-1	Blue cheese			Nettersheim, Germany	12/01/12	12/17/11	Germany
F39	F39-1	Blue cheese		L3/1284/15 23:22	Nettersheim, Germany	12/01/12	12/10/11	Germany
F40	F40-4	Bleu des Causses	Whole cow milk		Les Halles de l'Aveyron, Rodez, France	01/04/12		France
F41	F41-4	Bleu d'Auvergne	Cow milk		Les Halles de l'Aveyron, Rodez, France	01/04/12		France
F42	F42-1	Bleu d'Auvergne	Cow milk		Les Halles de l'Aveyron, Rodez, France	01/04/12		France
F43	F43-1	Roquefort	Sheep milk (whole and raw)		Les Halles de l'Aveyron, Rodez, France	01/04/12		France
F44	F44-3, F44-4	Roquefort	Sheep milk (whole and raw)		Les Halles de l'Aveyron, Rodez, France	01/04/12		France
F45	F45-2	Roquefort	Sheep milk (whole and raw)		Les Halles de l'Aveyron, Rodez, France	01/04/12		France
F46	F46-4	Roquefort	Sheep milk (whole and raw)		Les Halles de l'Aveyron, Rodez, France	01/04/12		France
F47	F47-2	Roquefort	Sheep milk (whole and raw)		Les Halles de l'Aveyron, Rodez, France	01/04/12		France
F48	F48-1	Roquefort	Sheep milk (whole and raw)		Les Halles de l'Aveyron, Rodez, France	01/04/12		France
F49	F49-1	Roquefort	Sheep milk (whole and raw)		Les Halles de l'Aveyron, Rodez, France	01/04/12		France
F50	F50-2	Roquefort	Sheep milk (whole and raw)		Les Halles de l'Aveyron, Rodez, France	01/04/12		France
F51	F51	Bleu du Vercors - Sassenage	Cow milk		Biocoop, Saint-Renan, France	02/14/12		France
F52	F52	Blue cheese	Cow milk		Private Bag, New Zealand	02/07/12		New-Zealand
F53	F53	Blue cheese	Pasteurized cow milk		Private Bag, New Zealand	02/07/12		New-Zealand
F54	F54	Blue cheese			Private Bag, New Zealand	02/07/12		New-Zealand
F55	F55	Blue cheese	Cow milk		Private Bag, New Zealand	02/07/12		New-Zealand
F56	F56	Blue cheese	Pasteurized milk		Private Bag, New Zealand	02/07/12		New-zealand
F57	F57-1	Blue cheese	Goat milk					France
F58	F58-1, F58-2	Blue cheese	Goat milk					France
F59	F59-2	Blue cheese	Cow milk		Birmensdorf, Switzerland			Switzerland
F60	F60-1	Blue cheese	Cow milk		Birmensdorf, Switzerland			Switzerland
F61	F61-6	Blue cheese	Cow milk,		Birmensdorf, Switzerland			Switzerland

F62	F62-4	Blue cheese	Raw cow milk		Birmensdorf, Switzerland				Switzerland
F63	F63-3	Blue cheese	Cow milk						Netherlands
F64	F64	Gorgonzola	Whole cow milk				02/01/12		Italy
F65	F65	Blue cheese			received in the form of suspension				Argentina
F66	F66	Blue cheese			received in the form of suspension				Argentina
F67	F67	Blue cheese			received in the form of suspension				Argentina
F68	F68	Blue cheese	Penicillium roqueforti		received in the form of suspension				Argentina
F69	F69	Blue cheese			received in the form of suspension				Argentina
F70	F70	Blue cheese			received in the form of suspension				Argentina
F71	F71	Blue cheese			received in the form of suspension				Argentina
F72	F72	Blue cheese			received in the form of suspension				Argentina
F73	F73	Blue cheese	Pasteurized milk		received in the form of suspension				Argentina
F74	F74-3	Blue cheese	Pasteurized cow milk		Super U, Plouzané, France				France
F75	F75-6	Blue cheese	Pasteurized cow milk						Finland
F76	F76-1, F76-5	Blue cheese	Cow milk						Finland
F77	F77-1, F77-6	Blue Stilton	Pasteurized cow milk		Aberystwith, Wales, UK		02/11/12		England
F78	F78	Blue cheese	Cow milk		Aberystwith, Wales, UK		02/23/12		England
F79	F79	Blue Stilton	Pasteurized cow milk		Aberystwith, Wales, UK		02/23/12		England
F80	F80	Blue cheese	Pasteurized cow milk		Aberystwith, Wales, UK		02/23/12		Scotland
F81	F81	Jihoceska Niva	Raw cow milk				12/01/12		Czech Republic
F82	F82	Blue cheese							England
F83	F83	Blue cheese	Cow milk						Germany
F84	F84	Jihoceska Niva	Raw cow milk				12/01/12		Czech Republic
F85	F85-5	Blue cheese					12/01/12		Czech Republic
F86	F86	Blue cheese	Raw cow milk						Wales
F87	F87	Blue cheese	Cow milk					02/25/12	England
F88	F88	Blue cheese	Pasteurized cow milk						England
F89	F89	Danablu	Unpasteurized cow milk	41020412184				11/22/13	Denmark
F90	F90	Blue Stilton	Pasteurized cow milk					02/17/12	England
F91	F91	Blue cheese	Goat milk						England
PTX.PR.1	PTX.PR.1.7	Blue cheese	Cow milk	26506180320	Super U, Plouzané, France		10/28/11	01/06/12	France
PTX.PR.2	PTX.PR.2.9	Roquefort	Sheep milk (whole and raw)	L220	Super U, Plouzané, France		10/28/11	12/02/11	France

PTX.PR.3	PTX.PR.3.6	Roquefort	Sheep milk (whole and raw)	LB286.0.8	Super U, Plouzané, France	10/28/11	12/12/11	France
PTX.PR.4	PTX.PR.4.7	Blue cheese	Pasteurized cow milk	272X	Super U, Plouzané, France	10/28/11	11/21/11	France
PTX.PR.5	PTX.PR.5.2	Blue cheese	Cow milk		On the Pigs Back, Cork, Ireland	10/14/11	11/22/11	Ireland
PTX.PR.6	PTX.PR.6.1	Blue cheese	Cow milk		On the Pigs Back, Cork, Ireland	10/14/11	11/22/11	Ireland
PTX.PR.7	PTX.PR.7.4	Blue cheese	Cow milk		On the Pigs Back, Cork, Ireland	10/14/11	11/22/11	Ireland
PTX.PR.8	PTX.PR.8.4	Blue cheese	Sheep milk	2	On the Pigs Back, Cork, Ireland	10/14/11	11/22/11	Ireland
PTX.PR.9	PTX.PR.9.4	Blue cheese	Sheep milk	1961	On the Pigs Back, Cork, Ireland	10/14/11	06/25/11	Ireland
PTX.PR.10	PTX.PR.10.2	Blue cheese	Cow milk		On the Pigs Back, Cork, Ireland	10/14/11		Ireland
PTX.PR.11	PTX.PR.11.2	Roquefort	Sheep milk (whole and raw)		E. Leclerc, Gouesnou, France	11/07/11		France
PTX.PR.12	PTX.PR.12.3	Gorgonzola	Whole cow milk, organic	L92279	E. Leclerc, Gouesnou, France	11/07/11	12/20/11	Italy
PTX.PR.13	PTX.PR.13.6 PTX.PR.13.7	Blue cheese	Pasteurized whole cow milk, Penicillium roqueforti	265.280	E. Leclerc, Gouesnou, France	11/07/11	12/11/11	France
PTX.PR.14	PTX.PR.14.3	Bleu d'Auvergne	Cow milk	252 A	E. Leclerc, Gouesnou, France	11/07/11	12/13/11	France
PTX.PR.15	PTX.PR.15.2	Bleu d'Auvergne	Sheep milk (whole and raw)		E. Leclerc, Gouesnou, France	11/07/11		France
PTX.PR.16	PTX.PR.16.1	Bleu d'Auvergne	Cow milk	291	E. Leclerc, Gouesnou, France	11/07/11	11/23/11	France
PTX.PR.17	PTX.PR.17.2 PTX.PR.17.7	Bleu d'Auvergne	Cow milk	34284	E. Leclerc, Gouesnou, France	11/07/11	11/23/11	France
PTX.PR.18	PTX.PR.18.3	Bleu d'Auvergne	Sheep milk (whole and raw) , organic	27603040340	E. Leclerc, Gouesnou, France	11/07/11	01/12/12	France
PTX.PR.19	PTX.PR.19.1 PTX.PR.19.4	Blue cheese	Sheep milk		Salon des Vins et de la Gastronomie, Brest, France	11/13/11		France
PTX.PR.20	PTX.PR.20.1 PTX.PR.20.2	Blue cheese	Sheep milk		Salon des Vins et de la Gastronomie, Brest, France	11/13/11		France
PTX.PR.21	PTX.PR.21.6	Blue cheese	Goat milk		Salon des Vins et de la Gastronomie, Brest, France	11/13/11		France
PTX.PR.22	PTX.PR.22.2 PTX.PR.22.5 PTX.PR.22.11	Bleu de Gex Haut-Jura	Cow milk		Salon des Vins et de la Gastronomie, Brest, France	11/13/11		France
PTX.PR.23	PTX.PR.23.8	Danablu	PGI, Danish Blue, unpasteurized cow milk	5341909/5095 5			01/16/12	Denmark
PTX.PR.24	PTX.PR.24.4	Blue cheese	Cow milk		IJ Mellis Cheesemonger, Edinburgh, Scotland			Scotland
PTX.PR.25	PTX.PR.25.5	Blue cheese	Raw sheep milk		IJ Mellis Cheesemonger, Edinburgh, Scotland			Scotland
PTX.PR.26	PTX.PR.26.1	Roquefort	Sheep milk (whole and raw)		Géant Casino, Brest, France	11/19/11		France
PTX.PR.27	PTX.PR.27.2 PTX.PR.27.6	Bleu des Causses	Pasteurized whole cow milk		Géant Casino, Brest, France	11/19/11		France
LCP00146	LCP00146	Roquefort	Sheep milk (whole and raw)					France
FM164	FM164	Gorgonzola	Whole cow milk					Italy

<sup>a</sup> Every cheese corresponds to a different brand name.

<sup>b</sup> Protected Designation of Origin (PDO) or Protected Geographical Indication (PGI)

**Supporting Information Table S2. *Penicillium* spp. isolates included in the present study and their origin.**

Species	Isolate number	Substrate	Cheese designation (if PDO or PGI*)	Origin	Other isolate number
<i>P. roqueforti</i>	F2-1	Cheese	Blue cheese	Canada	
<i>P. roqueforti</i>	F3-1	Cheese	Blue cheese	Canada	
<i>P. roqueforti</i>	F4-7	Cheese	Blue cheese	Canada	
<i>P. roqueforti</i>	F5-2	Cheese	Fourme d'Ambert	France	
<i>P. roqueforti</i>	F5-3	Cheese	Fourme d'Ambert	France	
<i>P. roqueforti</i>	F6-1	Cheese	Gorgonzola	Italy	
<i>P. roqueforti</i>	F6-3	Cheese	Gorgonzola	Italy	
<i>P. roqueforti</i>	F7-1	Cheese	Gorgonzola	Italy	
<i>P. roqueforti</i>	F8-1	Cheese	Gorgonzola	Italy	
<i>P. roqueforti</i>	F9-1	Cheese	Fourme d'Ambert	France	
<i>P. roqueforti</i>	F9-4	Cheese	Fourme d'Ambert	France	
<i>P. roqueforti</i>	F10-1	Cheese	Bleu d'Auvergne	France	
<i>P. roqueforti</i>	F10-5	Cheese	Bleu d'Auvergne	France	
<i>P. roqueforti</i>	F11-1	Cheese	Blue cheese	France	
<i>P. roqueforti</i>	F12-1	Cheese	Blue cheese	France	
<i>P. roqueforti</i>	F13-1	Cheese	Blue cheese	France	
<i>P. roqueforti</i>	F14-1	Cheese	Blue cheese	Argentina	UBOCC-A-113005
<i>P. roqueforti</i>	F15-3	Cheese	Blue cheese	Brazil	
<i>P. roqueforti</i>	F16-1	Cheese	Blue cheese	Spain	
<i>P. roqueforti</i>	F16-6	Cheese	Blue cheese	Spain	
<i>P. roqueforti</i>	F17-1	Cheese	Blue cheese	Spain	
<i>P. roqueforti</i>	F18-1	Cheese	Blue cheese	Spain	
<i>P. roqueforti</i>	F18-6	Cheese	Blue cheese	Spain	
<i>P. roqueforti</i>	F19-1	Cheese	Blue cheese	Spain	
<i>P. roqueforti</i>	F20-1	Cheese	Cabrales	Spain	UBOCC-A-113019
<i>P. roqueforti</i>	F20-4	Cheese	Cabrales	Spain	
<i>P. roqueforti</i>	F21-1	Cheese	Gamonéu	Spain	
<i>P. roqueforti</i>	F22-1	Cheese	Blue cheese	Netherlands	
<i>P. roqueforti</i>	F23-1	Cheese	Blue cheese	Netherlands	
<i>P. roqueforti</i>	F24-2	Cheese	Blue cheese	Netherlands	



P. roqueforti	F25-1	Cheese	Blue cheese	Netherlands	
P. roqueforti	F26-2	Cheese	Blue cheese	Netherlands	
P. roqueforti	F27-1	Cheese	Blue cheese	USA	UBOCC-A-113007
P. roqueforti	F28-1	Cheese	Blue cheese	Latvia	
P. roqueforti	F28-3	Cheese	Blue cheese	Latvia	UBOCC-A-113008
P. roqueforti	F29-1	Cheese	Soft ripened cheese with white and blue mold	Denmark	
P. roqueforti	F30-1	Cheese	Blue cheese	Poland	
P. roqueforti	F31-1	Cheese	Blue cheese	Latvia	
P. roqueforti	F32-1	Cheese	Blue cheese	Denmark	
P. roqueforti	F33-1	Cheese	Soft ripened cheese with white and blue mold	Germany	
P. roqueforti	F34-1	Cheese	Blue cheese	Germany	
P. roqueforti	F35-1	Cheese	Blue cheese	Germany	
P. roqueforti	F36-1	Cheese	Blue cheese	Germany	
P. roqueforti	F37-1	Cheese	Blue cheese	Germany	
P. roqueforti	F38-1	Cheese	Soft ripened cheese with white and blue mold	Germany	
P. roqueforti	F39-1	Cheese	Soft ripened cheese with white and blue mold	Germany	
P. roqueforti	F40-4	Cheese	Bleu des Causses	France	
P. roqueforti	F41-4	Cheese	Bleu d'Auvergne	France	
P. roqueforti	F42-1	Cheese	Bleu d'Auvergne	France	
P. roqueforti	F43-1	Cheese	Roquefort	France	UBOCC-A-113020
P. roqueforti	F44-3	Cheese	Roquefort	France	
P. roqueforti	F44-4	Cheese	Roquefort	France	
P. roqueforti	F45-2	Cheese	Roquefort	France	
P. roqueforti	F46-4	Cheese	Roquefort	France	
P. roqueforti	F47-2	Cheese	Roquefort	France	
P. roqueforti	F48-1	Cheese	Roquefort	France	
P. roqueforti	F49-1	Cheese	Roquefort	France	
P. roqueforti	F50-2	Cheese	Roquefort	France	
P. roqueforti	PTX.PR.1.7	Cheese	Blue cheese	France	
P. roqueforti	PTX.PR.2.9	Cheese	Roquefort	France	
P. roqueforti	PTX.PR.3.6	Cheese	Roquefort	France	
P. roqueforti	PTX.PR.4.7	Cheese	Blue cheese	France	

P. roqueforti	PTX.PR.5.2	Cheese	Blue cheese	Ireland	
P. roqueforti	PTX.PR.6.1	Cheese	Blue cheese	Ireland	
P. roqueforti	PTX.PR.7.4	Cheese	Blue cheese	Ireland	
P. roqueforti	PTX.PR.8.4	Cheese	Blue cheese	Ireland	
P. roqueforti	PTX.PR.9.4	Cheese	Blue cheese	Ireland	
P. roqueforti	PTX.PR.10.2	Cheese	Blue cheese	Ireland	
P. roqueforti	PTX.PR.11.2	Cheese	Roquefort	France	
P. roqueforti	PTX.PR.12.3	Cheese	Gorgonzola	Italy	
P. roqueforti	PTX.PR.13.6	Cheese	Blue cheese	France	
P. roqueforti	PTX.PR.13.7	Cheese	Blue cheese	France	
P. roqueforti	PTX.PR.14.3	Cheese	Bleu d'Auvergne	France	
P. roqueforti	PTX.PR.15.2	Cheese	Roquefort	France	
P. roqueforti	PTX.PR.16.1	Cheese	Fourme d'Ambert	France	
P. roqueforti	PTX.PR.17.2	Cheese	Bleu d'Auvergne	France	
P. roqueforti	PTX.PR.17.7	Cheese	Bleu d'Auvergne	France	
P. roqueforti	PTX.PR.18.3	Cheese	Roquefort	France	UBOCC-A-113021
P. roqueforti	PTX.PR.19.1	Cheese	Blue cheese	France	
P. roqueforti	PTX.PR.19.4	Cheese	Blue cheese	France	
P. roqueforti	PTX.PR.20.1	Cheese	Blue cheese	France	
P. roqueforti	PTX.PR.20.2	Cheese	Blue cheese	France	
P. roqueforti	PTX.PR.21.6	Cheese	Blue cheese	France	
P. roqueforti	PTX.PR.22.2	Cheese	Bleu de Gex Haut-Jura	France	
P. roqueforti	PTX.PR.22.5	Cheese	Bleu de Gex Haut-Jura	France	
P. roqueforti	PTX.PR.22.11	Cheese	Bleu de Gex Haut-Jura	France	
P. roqueforti	PTX.PR.23.8	Cheese	Danablu	Denmark	
P. roqueforti	PTX.PR.24.4	Cheese	Blue cheese	United-Kingdom	
P. roqueforti	PTX.PR.25.5	Cheese	Blue cheese	United-Kingdom	
P. roqueforti	PTX.PR.26.1	Cheese	Roquefort	France	UBOCC-A-115004
P. roqueforti	PTX.PR.27.2	Cheese	Bleu des Causses	France	
P. roqueforti	PTX.PR.27.6	Cheese	Bleu des Causses	France	UBOCC-A-113022
P. roqueforti	FM164	Cheese	Gorgonzola	Italy	UBOCC-A-113014
P. roqueforti	UBOCC-A-101449	Fruit (Preparation)		Unknown	

P. roqueforti	CBS 221.30 <sup>NT</sup>	Cheese	Roquefort	USA	ATCC 10110; ATCC 1129; CECT 2905; IBT 6754; IFO 5459; IMI 024313; LSHB; UBOCC-A-108110
P. roqueforti	UBOCC-A-109090	Apricot (Preparation)		Unknown	
P. roqueforti	UBOCC-A-110052	Olive brine		Unknown	
P. roqueforti	UBOCC-A-111033	Corn silage		France	
P. roqueforti	UBOCC-A-111170	Surface (Dairy industry)		France	
P. roqueforti	UBOCC-A-111172	Air (Dairy industry)		France	
P. roqueforti	UBOCC-A-111178	Air (Dairy industry)		France	
P. roqueforti	UBOCC-A-111277	Pitted prunes		France	
P. roqueforti	UBOCC-A-112076	Brioche		France	
P. roqueforti	IHEM 3196	Human sputum		Belgium	UBOCC-A-113004
P. roqueforti	MUCL 18048	Cork		Belgium	UBOCC-A-112178
P. roqueforti	CBS 498.73	Apple		Russia	ATCC 24720; FRR 1480; IMI 174718; IMI 291199; MUCL 34883; UBOCC-A-112176
P. roqueforti	MUCL 35036	Wood in process of drying in the open air (Quercus sp.)		France	UBOCC-A-112177
P. roqueforti	CBS 112579	Sulphite liquor		Canada	IBT 16407; NRRL 1165; UBOCC-A-113001
P. roqueforti	CBS 304.97	Cheese	Mozzarella	Denmark	IBT 12.093; UBOCC-A-113002
P. roqueforti	CBS 479.84	Mouldy baker's yeast		Denmark	IBT 21543; UBOCC-A-113003
P. roqueforti	DSMZ 1999	Beef meat		Switzerland	UBOCC-A-112179
P. roqueforti	UBOCC-A-112166	Mouldy rye bread		France	
P. roqueforti	F65	Cheese	Blue cheese	Argentina	
P. roqueforti	F66	Cheese	Blue cheese	Argentina	
P. roqueforti	F67	Cheese	Blue cheese	Argentina	
P. roqueforti	F68	Cheese	Blue cheese	Argentina	
P. roqueforti	F69	Cheese	Blue cheese	Argentina	
P. roqueforti	F70	Cheese	Blue cheese	Argentina	
P. roqueforti	F71	Cheese	Blue cheese	Argentina	
P. roqueforti	F72	Cheese	Blue cheese	Argentina	
P. roqueforti	F73	Cheese	Blue cheese	Argentina	
P. roqueforti	F51	Cheese	Bleu du Vercors - Sassenage	France	
P. roqueforti	F52	Cheese	Blue cheese	New-Zealand	
P. roqueforti	F53	Cheese	Blue cheese	New-Zealand	
P. roqueforti	F54	Cheese	Blue cheese	New-Zealand	

P. roqueforti	F55	Cheese	Blue cheese	New-Zealand	
P. roqueforti	F56	Cheese	Blue cheese	New-zealand	
P. roqueforti	F57-1	Cheese	Blue cheese	France	
P. roqueforti	F58-1	Cheese	Blue cheese	France	
P. roqueforti	F58-2	Cheese	Blue cheese	France	
P. roqueforti	F59-2	Cheese	Blue cheese	Switzerland	
P. roqueforti	F60-1	Cheese	Blue cheese	Switzerland	
P. roqueforti	F61-6	Cheese	Blue cheese	Switzerland	UBOCC-A-115001
P. roqueforti	F62-4	Cheese	Blue cheese	Switzerland	
P. roqueforti	F63-3	Cheese	Blue cheese	Netherlands	
P. roqueforti	F64	Cheese	Gorgonzola	Italy	
P. roqueforti	F74-3	Cheese	Soft ripened cheese with white and blue mold	France	
P. roqueforti	F75-6	Cheese	Blue cheese	Finland	UBOCC-A-115002
P. roqueforti	F76-1	Cheese	Blue cheese	Finland	
P. roqueforti	F77-1	Cheese	Blue Stilton	United-Kingdom	
P. roqueforti	F77-6	Cheese	Blue Stilton	United-Kingdom	
P. roqueforti	F78	Cheese	Blue cheese	United-Kingdom	
P. roqueforti	F79	Cheese	Blue Stilton	United-Kingdom	
P. roqueforti	F80	Cheese	Blue cheese	United-Kingdom	
P. roqueforti	F81	Cheese	Jihoceska Niva	Czech Republic	
P. roqueforti	F82	Cheese	Blue cheese	United-Kingdom	
P. roqueforti	F83	Cheese	Blue cheese	Germany	
P. roqueforti	F84	Cheese	Jihoceska Niva	Czech Republic	UBOCC-A-115003
P. roqueforti	F85-5	Cheese	Blue cheese	Czech Republic	
P. roqueforti	F86	Cheese	Blue cheese	United-Kingdom	
P. roqueforti	F87	Cheese	Blue cheese	United-Kingdom	
P. roqueforti	F88	Cheese	Blue cheese	United-Kingdom	
P. roqueforti	F89	Cheese	Danablu	Denmark	
P. roqueforti	F1-1	Cheese	Blue cheese	Canada	
P. roqueforti	F90	Cheese	Blue stilton	United-Kingdom	
P. roqueforti	F91	Cheese	Blue cheese	United-Kingdom	
P. roqueforti	F76-5	Cheese	Blue cheese	Finland	

P. roqueforti	LCP00148	Brewery atmosphere		Unknown	
P. roqueforti	LCP02492	Unknown		Unknown	
P. roqueforti	LCP05419	Fridge inner wall		France	
P. roqueforti	LCP03969	Fruit compote		France	
P. roqueforti	LCP04180	Strawberry sorbet		France	
P. roqueforti	LCP05420	Fridge inner wall		France	
P. roqueforti	LCP00146	Cheese	Roquefort	France	
P. carneum	CBS 112297 <sup>T</sup>	Mouldy rye bread		Denmark	IBT 6884; UBOCC-A-110167; UBOCC-A-111012
P. carneum	CBS 112489	Chilled food		Switzerland	IBT 15600; UBOCC-A-110168; UBOCC-A-111024
P. carneum	CBS 100539	Preserved chocolate sauce		Norway	IBT 12392; UBOCC-A-110218; UBOCC-A-111020
P. carneum	CBS 466.95	Cured meat		Germany	ATCC 46837; IBT 6885; UBOCC-A-110220; UBOCC-A-111018
P. carneum	CBS 468.95	Raw sausage		Germany	ATCC 46836; IBT 3474; IBT 6892; UBOCC-A-111006; UBOCC-A-111026
P. paneum	F21-4	Cheese	Gamonéu	Spain	
P. paneum	UBOCC-A-101448	Silage		Unknown	
P. paneum	UBOCC-A-109218	Rinse solution (Syrup)		France	
P. paneum	UBOCC-A-110051	Mint syrup		Unknown	
P. paneum	CBS 464.95	Rye bread		Denmark	IBT 11839; UBOCC-A-110248; UBOCC-A-111028
P. paneum	CBS 303.97	Soft drink		Denmark	IBT 13321; UBOCC-A-110257; UBOCC-A-111016
P. paneum	UBOCC-A-111183	Air (Dairy industry)		France	
P. paneum	CBS 101032 <sup>T</sup>	Mouldy rye bread		Denmark	IBT 12407; IBT 21541; LCP 5616
P. psychrosexualis	CBS 128137 <sup>HT</sup>	Wooden crate in cold-store of apples		Netherlands	IBT 29551; UBOCC-A-113009

\* Protected Designation of Origin (PDO) or Protected Geographical Indication (PGI)

**Supporting Information Table S3. Cycling conditions/PCR programs used for partial gene and microsatellites region amplifications.**

PCR step	Bt2a-Bt2b	cmd5-cmd6	CF4-CF1D	709for-1348rev	F1526-R2434 F94-R1595	Proq845for- Proq845rev Proq235for- Proq235rev Proq631for- Proq631rev	Microsatellite amplification s (all)
First denaturing	94 °C, 5 min	94 °C, 5 min	none	94 °C, 5 min	none	95 °C, 5 min	96 °C, 2 min
Denature	94 °C, 1 min	94 °C, 30 s	94 °C, 30 s	94 °C, 30 s	94 °C, 30 s	95 °C, 30 s	96 °C, 30 s
Annealing	61 °C, 1 min	55 °C, 30 s	51 °C, 30 s	51 °C, 30 s	51; 49; 47 °C, 30 s	55 °C, 30 s	59 °C, 25 s
Extend	72 °C, 1 min 30 s 34 cycles	72 °C, 1 min 35 cycles	72 °C, 1 min 30 s 42 cycles	72 °C, 30 s 39 cycles	72 °C, 1 min 5; 5; 30 cycles	72 °C, 45 s 28 cycles	72 °C, 25 s 35 cycles
Final extension	72 °C, 5 min	72 °C, 10 min	72 °C, 10 min	72 °C, 5 min	72 °C, 10 min	72 °C, 5 min	72 °C, 10 min

**Supporting Information Table S4. GenBank accession numbers for all loci studied among *Penicillium* spp. isolates.**

Isolate number	<i>β</i> -tub	cmd	cct8	mcm7	tsr1	Proq845	Proq235	Proq631
CBS 100539	KM503516	KM503917	KM503923	KM503352	KM503367	KM503732	KM503672	KM503702
CBS 101032 <sup>T</sup>	KM503670	KM503768	KM504076	KM503203	KM503361	-	-	-
CBS 112297 <sup>T</sup>	KM503514	KM503915	KM503921	KM503350	KM503365	-	-	-
CBS 112489	KM503515	KM503916	KM503922	KM503351	KM503366	-	-	-
CBS 112579	KM503656	KM503772	KM504009	KM503298	KM503401	-	-	-
CBS 128137 <sup>HT</sup>	KM503519	KM503920	KM503926	KM503348	KM503363	-	-	-
CBS 221.30 <sup>NT</sup>	KM503650	KM503799	KM504054	KM503289	KM503394	KM503733	KM503673	KM503703
CBS 303.97	KM503671	KM503769	KM504077	KM503205	KM503362	-	-	-
CBS 304.97	KM503657	KM503773	KM504010	KM503299	KM503402	-	-	-
CBS 464.95	KM503668	KM503767	KM504074	KM503201	KM503360	-	-	-
CBS 466.95	KM503517	KM503918	KM503924	KM503353	KM503368	-	-	-
CBS 468.95	KM503518	KM503919	KM503925	KM503354	KM503369	-	-	-
CBS 479.84	KM503658	KM503774	KM504011	KM503300	KM503403	KM503734	KM503674	KM503704
CBS 498.73	KM503587	KM503803	KM504007	KM503296	KM503399	KM503735	KM503675	KM503705
DSMZ 1999	KM503521	KM503804	KM504060	KM503301	KM503404	KM503736	KM503676	KM503706
F1-1	KM503663	KM503914	KM504068	KM503344	KM503511	-	-	-
F2-1	KM503522	KM503808	KM503927	KM503206	KM503409	-	-	-
F3-1	KM503523	KM503809	KM503928	KM503207	KM503410	-	-	-
F4-7	-	-	-	-	-	KM503744	KM503684	KM503714
F5-2	KM503628	KM503890	KM504012	KM503208	KM503411	-	-	-
F6-1	KM503524	KM503810	-	KM503209	KM503412	-	-	-
F7-1	KM503525	KM503811	KM503929	KM503210	KM503413	-	-	-
F8-1	KM503526	KM503812	KM503930	KM503211	KM503414	-	-	-
F9-1	KM503629	KM503891	KM504013	KM503212	KM503415	-	-	-
F10-1	KM503527	KM503775	KM504014	KM503213	KM503370	-	-	-
F10-5	-	-	-	-	-	KM503737	KM503677	KM503707
F11-1	KM503630	KM503892	KM504015	KM503214	KM503416	-	-	-
F12-1	KM503528	KM503813	KM503931	KM503215	KM503417	-	-	-
F13-1	KM503529	KM503814	KM503932	KM503216	KM503418	-	-	-
F14-1	KM503530	KM503815	KM503933	KM503217	KM503419	-	-	-
F15-3	KM503631	KM503893	KM504016	KM503218	KM503420	-	-	-
F16-1	KM503632	KM503894	KM504017	KM503219	KM503421	-	-	-
F17-1	KM503531	KM503816	KM503934	KM503220	KM503422	-	-	-
F18-1	KM503532	KM503817	KM503935	KM503221	KM503423	-	-	-
F18-6	-	-	-	-	-	KM503738	KM503678	KM503708
F19-1	KM503533	KM503818	KM503936	KM503222	KM503424	-	-	-
F20-1	KM503534	KM503819	KM503937	KM503223	KM503425	KM503739	KM503679	KM503709
F21-1	KM503535	KM503820	KM503938	KM503224	KM503426	-	-	-
F21-4	KM503664	KM503764	KM504070	KM503198	KM503357	-	-	-
F22-1	KM503536	KM503821	KM503950	KM503225	KM503427	-	-	-
F23-1	KM503537	KM503822	KM503939	KM503226	KM503428	-	-	-
F24-2	KM503538	KM503823	KM503940	KM503227	KM503429	-	-	-

F25-1	KM503633	KM503895	KM504018	KM503228	KM503430	-	-	-
F26-2	KM503634	KM503824	KM504019	KM503229	KM503431	-	-	-
F27-1	KM503539	KM503776	KM504020	KM503230	KM503371	-	-	-
F28-1	KM503540	KM503825	KM503941	KM503231	KM503432	-	-	-
F28-3	-	-	-	-	-	KM503740	KM503680	KM503710
F29-1	KM503541	KM503826	KM503942	KM503232	KM503433	-	-	-
F30-1	KM503542	KM503827	KM503943	KM503233	KM503434	-	-	-
F31-1	KM503543	KM503828	KM503944	KM503234	KM503435	-	-	-
F32-1	KM503544	KM503829	KM503945	KM503235	KM503436	-	-	-
F33-1	KM503545	KM503830	KM503946	KM503236	KM503437	-	-	-
F34-1	KM503546	KM503831	KM503947	KM503237	KM503438	-	-	-
F35-1	KM503547	KM503832	KM503948	KM503238	KM503439	-	-	-
F36-1	KM503548	KM503833	KM503949	KM503239	KM503440	KM503741	KM503681	KM503711
F37-1	KM503549	KM503834	KM503951	KM503240	KM503441	-	-	-
F38-1	KM503550	KM503835	KM503952	KM503241	KM503442	-	-	-
F39-1	KM503551	KM503836	KM503953	KM503242	KM503443	-	-	-
F40-4	KM503635	KM503777	KM504021	KM503243	KM503372	KM503742	KM503682	KM503712
F41-4	KM503552	KM503778	KM504040	KM503244	KM503373	-	-	-
F42-1	KM503553	KM503779	KM504022	KM503245	KM503374	-	-	-
F43-1	KM503636	KM503780	KM504023	KM503246	KM503375	KM503743	KM503683	KM503713
F44-3	KM503554	KM503781	KM504024	KM503247	KM503376	-	-	-
F45-2	KM503555	KM503782	KM504025	KM503248	KM503377	-	-	-
F46-4	KM503556	KM503783	KM504026	KM503249	KM503378	-	-	-
F47-2	KM503557	KM503784	KM504027	KM503250	KM503379	-	-	-
F48-1	KM503558	KM503785	KM504028	KM503251	KM503380	-	-	-
F49-1	KM503559	KM503786	KM504029	KM503252	KM503381	-	-	-
F50-2	KM503560	KM503787	KM504030	KM503253	KM503382	-	-	-
F51	-	KM503858	KM503974	KM503312	KM503480	KM503745	KM503685	KM503715
F52	KM503596	KM503807	KM504065	KM503313	KM503407	-	-	-
F53	KM503597	KM503859	KM503975	KM503314	KM503481	KM503746	KM503686	KM503716
F54	KM503661	KM503912	KM504066	KM503315	KM503482	-	-	-
F55	KM503598	KM503860	KM503976	KM503316	KM503483	-	-	-
F56	KM503599	KM503861	KM503977	KM503317	KM503484	-	-	-
F57-1	KM503600	KM503862	KM503978	KM503318	KM503485	-	-	-
F58-1	KM503601	KM503863	KM503979	KM503319	KM503486	-	-	-
F58-2	KM503602	KM503864	KM503980	KM503320	KM503487	-	-	-
F59-2	KM503603	KM503865	KM503981	KM503321	KM503488	-	-	-
F60-1	KM503604	KM503866	KM503982	KM503322	KM503489	-	-	-
F61-6	KM503605	KM503867	KM503983	KM503323	KM503490	-	-	-
F62-4	KM503606	KM503868	KM503984	KM503324	KM503491	-	-	-
F63-3	KM503607	KM503869	KM503985	KM503325	KM503492	-	-	-
F64	KM503608	KM503870	KM503986	KM503326	KM503493	-	-	-
F65	KM503589	KM503806	KM504062	KM503303	KM503406	KM503747	KM503687	KM503717
F66	KM503590	KM503852	KM503968	KM503304	KM503472	-	-	-
F67	KM503591	KM503853	KM503969	KM503305	KM503473	-	-	-
F68	KM503592	KM503854	KM503970	KM503306	KM503474	-	-	-



F69	KM503593	KM503855	KM503971	KM503307	KM503475	-	-	-
F70	KM503659	KM503910	KM504063	KM503308	KM503476	-	-	-
F71	KM503594	KM503856	KM503972	KM503309	KM503477	-	-	-
F72	KM503660	KM503911	KM504064	KM503310	KM503478	-	-	-
F73	KM503595	KM503857	KM503973	KM503311	KM503479	-	-	-
F74-3	KM503609	KM503871	KM503987	KM503327	KM503494	-	-	-
F75-6	KM503610	KM503872	KM503988	KM503328	KM503495	-	-	-
F76-1	KM503611	KM503873	KM503989	KM503329	KM503496	-	-	-
F77-1	KM503612	KM503874	KM503990	KM503330	KM503497	-	-	-
F77-6	KM503613	KM503875	KM503991	KM503331	KM503498	-	-	-
F78	KM503614	KM503876	KM503992	KM503332	KM503499	-	-	-
F79	KM503615	KM503877	KM503993	KM503333	KM503500	-	-	-
F80	KM503616	KM503878	KM503994	KM503334	KM503501	-	-	-
F81	KM503617	KM503879	KM503995	KM503335	KM503502	-	-	-
F82	KM503618	KM503880	KM503996	KM503336	KM503503	-	-	-
F83	KM503619	KM503881	KM503997	KM503337	KM503504	-	-	-
F84	KM503662	KM503913	KM504067	KM503338	KM503505	-	-	-
F85-5	KM503620	KM503882	KM503998	KM503339	KM503506	-	-	-
F86	KM503621	KM503883	KM503999	KM503340	KM503507	-	-	-
F87	KM503622	KM503884	KM504000	KM503341	KM503508	-	-	-
F88	KM503623	KM503885	KM504001	KM503342	KM503509	-	-	-
F89	KM503624	KM503886	KM504002	KM503343	KM503510	-	-	-
F90	KM503625	KM503887	KM504003	KM503345	KM503512	-	-	-
F91	KM503626	KM503888	KM504004	KM503346	KM503513	-	-	-
FM164	KM503581	KM503848	KM503965	KM503287	KM503466	KM503748	KM503688	KM503718
IHEM 3196	KM503653	KM503909	KM504058	KM503294	KM503470	KM503749	KM503689	KM503719
LCP00146	-	-	-	-	-	KM503750	KM503690	KM503720
LCP04180	-	-	-	-	-	KM503751	KM503691	KM503721
LCP05419	-	-	-	-	-	KM503752	KM503692	KM503722
LCP05420	-	-	-	-	-	KM503753	KM503693	KM503723
MUCL 18048	KM503654	KM503802	KM504059	KM503295	KM503471	KM503754	KM503694	KM503724
MUCL 35036	KM503655	KM503771	KM504008	KM503297	KM503400	KM503755	KM503695	KM503725
PTX.PR.1.7	KM503637	KM503896	KM504031	KM503254	KM503444	-	-	-
PTX.PR.3.6	KM503562	KM503789	KM504032	KM503256	KM503384	-	-	-
PTX.PR.4.7	KM503563	KM503837	KM503954	KM503257	KM503445	-	-	-
PTX.PR.5.2	KM503564	KM503838	KM503955	KM503258	KM503446	-	-	-
PTX.PR.6.1	KM503638	KM503897	KM504033	KM503259	KM503447	-	-	-
PTX.PR.7.4	KM503565	KM503839	KM503956	KM503260	KM503448	-	-	-
PTX.PR.8.4	KM503566	KM503840	KM503957	KM503261	KM503449	-	-	-
PTX.PR.9.4	KM503567	KM503790	KM504034	KM503262	KM503385	-	-	-
PTX.PR.10.2	KM503568	KM503791	KM504035	KM503263	KM503386	-	-	-
PTX.PR.11.2	KM503569	KM503792	KM504036	KM503264	KM503387	-	-	-
PTX.PR.12.3	KM503570	KM503841	KM503958	KM503265	KM503450	-	-	-
PTX.PR.13.6	KM503571	KM503842	KM503959	KM503266	KM503451	-	-	-
PTX.PR.13.7	KM503572	KM503843	KM503960	KM503267	KM503452	-	-	-
PTX.PR.14.3	KM503573	KM503793	KM504037	KM503268	KM503388	-	-	-

PTX.PR.15.2	KM503574	KM503794	KM504038	KM503269	KM503389	-	-	-
PTX.PR.16.1	KM503639	KM503898	KM504039	KM503270	KM503453	-	-	-
PTX.PR.17.2	KM503575	KM503844	KM503961	KM503271	KM503454	-	-	-
PTX.PR.18.3	KM503576	KM503795	KM504041	KM503272	KM503390	-	-	-
PTX.PR.19.1	KM503640	KM503899	KM504042	KM503273	KM503455	KM503756	KM503696	KM503726
PTX.PR.19.4	KM503641	KM503900	KM504043	KM503274	KM503456	-	-	-
PTX.PR.2.9	KM503561	KM503788	-	KM503255	KM503383	-	-	-
PTX.PR.20.1	KM503642	KM503901	KM504044	KM503275	KM503457	-	-	-
PTX.PR.20.2	KM503643	KM503902	KM504045	KM503276	KM503458	-	-	-
PTX.PR.21.6	KM503644	KM503903	KM504046	KM503277	KM503459	-	-	-
PTX.PR.22.2	KM503645	KM503904	KM504047	KM503278	KM503460	-	-	-
PTX.PR.22.5	KM503646	KM503905	KM504048	KM503279	KM503461	-	-	-
PTX.PR.22.11	KM503647	KM503906	KM504049	KM503280	KM503462	-	-	-
PTX.PR.23.8	KM503577	KM503845	KM503962	KM503281	KM503463	-	-	-
PTX.PR.24.4	KM503578	KM503846	KM503963	KM503282	KM503464	-	-	-
PTX.PR.25.5	KM503579	KM503847	KM503964	KM503283	KM503465	-	-	-
PTX.PR.26.1	KM503580	KM503796	KM504050	KM503284	KM503391	-	-	-
PTX.PR.27.2	KM503648	KM503797	KM504051	KM503285	KM503392	-	-	-
PTX.PR.27.6	KM503649	KM503798	KM504052	KM503286	KM503393	-	-	-
UBOCC-A-101448	KM503665	KM503765	KM504071	KM503199	KM503358	-	-	-
UBOCC-A-101449	KM503582	KM503849	KM504053	KM503288	KM503467	KM503757	KM503697	KM503727
UBOCC-A-109090	KM503583	KM503850	KM503966	KM503290	KM503395	KM503758	KM503698	KM503728
UBOCC-A-109218	KM503666	KM503766	KM504072	KM503204	KM503359	-	-	-
UBOCC-A-110051	KM503667	KM503762	KM504073	KM503200	KM503355	-	-	-
UBOCC-A-110052	KM503651	KM503907	KM504069	KM503347	KM503468	KM503759	KM503699	KM503729
UBOCC-A-111033	KM503584	KM503851	KM503967	-	KM503364	-	-	-
UBOCC-A-111170	KM503520	KM503800	KM504055	KM503291	KM503396	KM503760	KM503700	KM503730
UBOCC-A-111172	KM503585	KM503770	KM504006	KM503292	KM503397	KM503761	KM503701	KM503731
UBOCC-A-111178	KM503627	KM503889	KM504005	KM503349	KM503408	-	-	-
UBOCC-A-111183	KM503669	KM503763	KM504075	KM503202	KM503356	-	-	-
UBOCC-A-111277	KM503652	KM503908	KM504056	KM503293	KM503469	-	-	-
UBOCC-A-112076	KM503586	KM503801	KM504057	-	KM503398	-	-	-
UBOCC-A-112166	KM503588	KM503805	KM504061	KM503302	KM503405	-	-	-

**Supporting Information Table S5. Colony morphology of the 157 isolates on Potato Dextrose Agar medium.**

Isolate	Haplotype	Population	Diameter 1 (mm)	Diameter 2 (mm)	Diameter 3 (mm)	Colony texture	Margin	Color obverse
IHEM 3196	13	1	62.5	68.3	71.0	fasciculate	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F11-1	14	1	65.7			fasciculate	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F12-1	14	1	63.8			velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F13-1	14	1	62.5			velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F14-1	14	1	71.9	75.8	80.0	velvety	regular	grayish green 5GY - 5/2)
F17-1	14	1	66.1			velvety	regular	light greenish gray (10Y - 8/1)
F18-1	14	1	61.4			velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F19-1	14	1	63.7			velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F20-1	14	1	64.4			velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F20-4	14	1	64.1			velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F21-1	14	1	60.8			velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F23-1	14	1	66.7			velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F24-2	14	1	64.3			velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F3-1	14	1	69.3			velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F31-1	14	1	65.4			velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F32-1	14	1	71.2			velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F35-1	14	1	67.2	72.2	72.5	velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F37-1	14	1	70.8			velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F38-1	14	1	64.6			velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F39-1	14	1	60.5			velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F5-2	14	1	66.2	66.7	69.5	fasciculate	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F5-3	14	1	66.2			fasciculate	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F55	14	1	71.9			velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F56	14	1	68.0			velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F58-1	14	1	62.4			velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F58-2	14	1	62.1			velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F63-3	14	1	65.3			velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F64	14	1	64.9			velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F66	14	1	68.8			velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F67	14	1	63.5			velvety	regular	grayish green (5G <sub>/2</sub> - 5/2)

F68	14	1	61.8		velvety	regular	pale green (5G_/2 - 6/2)	
F69	14	1	63.2		velvety	regular	pale green (5G_/2 - 6/2)	
F71	14	1	64.3		velvety	regular	pale green (5G_/2 - 6/2)	
F75-6	14	1	68.4		velvety	regular	pale green (5G_/2 - 6/2)	
F76-1	14	1	72.8		velvety	regular	pale green (5G_/2 - 6/2)	
F76-5	14	1	72.3		velvety	regular	pale green (5G_/2 - 6/2)	
F77-1	14	1	73.9		velvety	regular	pale green (5G_/2 - 6/2)	
F77-6	14	1	72.4		velvety	regular	pale green (5G_/2 - 6/2)	
F78	14	1	64.8		velvety	regular	pale green (5G_/2 - 6/2)	
F79	14	1	69.3		velvety	regular	pale green (5G_/2 - 6/2)	
F80	14	1	59.6		velvety	regular	pale green (5G_/2 - 6/2)	
F81	14	1	71.4		velvety	regular	pale green (5G_/2 - 6/2)	
F82	14	1	71.8		velvety	regular	pale green (5G_/2 - 6/2)	
F83	14	1	69.1		velvety	regular	pale green (5G_/2 - 6/2)	
F85-5	14	1	66.4		velvety	regular	pale green (5G_/2 - 6/2)	
F86	14	1	64.6		velvety	regular	pale green (5G_/2 - 6/2)	
F87	14	1	72.7		velvety	regular	pale green (5G_/2 - 6/2)	
F88	14	1	68.3		velvety	regular	pale green (5G_/2 - 6/2)	
F89	14	1	68.7		velvety	regular	pale green (5G_/2 - 6/2)	
F90	14	1	68.0		velvety	regular	pale green (5G_/2 - 6/2)	
F91	14	1	70.7		velvety	regular	pale green (5G_/2 - 6/2)	
LCP00146	14	1	77.8		velvety	regular	greenish gray (10GY - 6/1)	
PTX.PR.17.2	14	1	64.8		velvety	regular	pale green (5G_/2 - 6/2)	
PTX.PR.17.7	14	1	65.3		velvety	regular	pale green (5G_/2 - 6/2)	
PTX.PR.19.4	14	1	66.7		fasciculate	regular	dark greenish gray (5G_/1 - 5/1)	
PTX.PR.23.8	14	1	65.4		velvety	regular	grayish green (5G_/2 - 5/2)	
PTX.PR.24.4	14	1	65.6		velvety	regular	grayish green (5G_/2 - 5/2)	
PTX.PR.25.5	14	1	63.8		velvety	regular	grayish green (5G_/2 - 5/2)	
PTX.PR.4.7	14	1	68.4		velvety	regular	pale green (5G_/2 - 6/2)	
PTX.PR.5.2	14	1	72.6		velvety	regular	pale green (5G_/2 - 6/2)	
PTX.PR.7.4	14	1	65.7		velvety	regular	pale green (5G_/2 - 6/2)	
PTX.PR.8.4	14	1	65.6		velvety	regular	pale green (5G_/2 - 6/2)	
UBOCC-A-111277	14	1	62.8	69.7	77.5	fasciculate	regular	grayish green (5G_/2 - 5/2)

F15-3	15	1	66.1	62.3	65.2	fasciculate	regular	light olive (10Y - 5/4)
F16-1	15	1	62.4			fasciculate	regular	grayish green (5G <sub>/2</sub> - 5/2)
F25-1	15	1	64.4			fasciculate	regular	grayish green (5G <sub>/2</sub> - 5/2)
F26-2	15	1	64.4			fasciculate	regular	grayish green (5G <sub>/2</sub> - 5/2)
F54	15	1	63.5			fasciculate	regular	grayish green (5G <sub>/2</sub> - 5/2)
F57-1	15	1	69.9			fasciculate	regular	grayish green (5G <sub>/2</sub> - 5/2)
F70	15	1	71.5			fasciculate	regular	grayish green (5G <sub>/2</sub> - 5/2)
F72	15	1	66.4			fasciculate	regular	grayish green (5G <sub>/2</sub> - 5/2)
F84	15	1	74.4	77.8	78.0	weakly floccose	regular	light grayish olive (10Y - 6/2)
F9-1	15	1	63.8	65.9	70.0	fasciculate	regular	grayish green (5G <sub>/2</sub> - 5/2)
F9-4	15	1	64.9	64.9	71.5	fasciculate	regular	grayish green (5G <sub>/2</sub> - 5/2)
PTX.PR.1.7	15	1	67.0			velvety	regular	grayish green (5GY - 5/2)
PTX.PR.16.1	15	1	63.3			fasciculate	regular	grayish green (5G <sub>/2</sub> - 5/2)
PTX.PR.20.1	15	1	65.1			fasciculate	regular	grayish green (5G <sub>/2</sub> - 5/2)
PTX.PR.20.2	15	1	68.3			fasciculate	regular	grayish green (5GY - 5/2)
PTX.PR.21.6	15	1	64.0	68.3	69.0	fasciculate	regular	grayish green (5G <sub>/2</sub> - 5/2)
PTX.PR.22.11	15	1	65.1			fasciculate	regular	grayish green (5G <sub>/2</sub> - 5/2)
PTX.PR.22.2	15	1	65.6			fasciculate	regular	grayish green (5G <sub>/2</sub> - 5/2)
PTX.PR.22.5	15	1	64.9	67.0	68.5	fasciculate	regular	grayish green (5G <sub>/2</sub> - 5/2)
PTX.PR.6.1	15	1	65.1			fasciculate	regular	grayish green (5G <sub>/2</sub> - 5/2)
F36-1	15	1	65.7			velvety	regular	grayish green (5G <sub>/2</sub> - 5/2)
PTX.PR.19.1	17	1	67.7			fasciculate	regular	grayish green (5G <sub>/2</sub> - 5/2)
F53	21	1	69.3			velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
DSMZ 1999	1	2	74.7	79.4	80.5	velvety	regular	greenish gray (5G <sub>/1</sub> - 6/1)
UBOCC-A-111170	2	2	62.8	55.1	66.0	velvety	irregular	pale yellowish green (5GY - 6/4) to pale green (5G <sub>/2</sub> - 7/2 - 6/2)
CBS 304.97	3	2	70.3			velvety	regular	light grayish green (5GY - 6/2)
CBS 479.84	3	2	61.8			velvety	regular	pale yellowish green (5GY - 6/4) to pale green (5G <sub>/2</sub> - 7/2 - 6/2)
LCP05419	3	2	28.8			velvety	irregular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 7/2 - 6/2)
MUCL 18048	4	2	43.5	45.8	49.0	velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 7/2)
F4-7	5	2	67.6			velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 7/2)
F52	5	2	72.5			velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 7/2)
PTX.PR.10.2	5	2	73.5			velvety	regular	pale green 5G <sub>/2</sub> - 7/2
PTX.PR.9.4	5	2	70.3			velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)

F10-1	6	2	71.9			velvety	regular	light greenish gray (10GY - 8/1)
F27-1	6	2	71.5			velvety	regular	pale green (5G_2 - 7/2)
F41-4	6	2	64.8	73.5	78.0	velvety	regular	light greenish gray (10GY - 8/1)
F42-1	6	2	66.3			velvety	regular	pale green (5G_2 - 7/2)
F44-3	6	2	66.7	66.8	73.5	fasciculate	regular	olive green to light greenish gray (5G_1 - 7/1)
F44-4	6	2	67.4			fasciculate	regular	olive green to light greenish gray (5G_1 - 7/1)
F45-2	6	2	61.9			fasciculate	regular	olive green to light greenish gray (5G_1 - 7/1)
F46-4	6	2	75.1			fasciculate	regular	light greenish gray (5G_1 - 7/1)
F47-2	6	2	59.9	59.5	59.1	fasciculate	regular	pure green/pale green (5G_2 - 7/2)
F48-1	6	2	68.6			fasciculate	regular	olive green to light greenish gray (5G_1 - 7/1)
F49-1	6	2	63.1			weakly fasciculate	regular	olive green to light grayish green (5GY - 6/2)
F50-2	6	2	67.3			fasciculate	regular	greenish gray (10GY - 5/1)
PTX.PR.11.2	6	2	69.9			fasciculate	regular	greenish gray (10GY - 5/1)
PTX.PR.14.3	6	2	78.4			fasciculate	regular	greenish gray (10GY - 5/1)
PTX.PR.15.2	6	2	60.4	64.9	59.9	fasciculate	regular	pale green (5G_2 - 7/2)
PTX.PR.18.3	6	2	65.6	70.3	57.6	fasciculate	regular	pale green (5G_2 - 7/2)
PTX.PR.2.9	6	2	75.3	77.2	82.0	fasciculate	regular	dark greenish gray (5G_1 - 4/1)
PTX.PR.26.1	6	2	77.0			fasciculate	regular	greenish gray (10GY - 5/1)
PTX.PR.3.6	6	2	58.8			fasciculate	regular	olive green to light grayish green (5GY - 6/2)
UBOCC-A-112076	6	2	66.1			velvety	regular	olive green to light grayish green (5GY - 6/2)
UBOCC-A-112166	6	2	69.2	73.4	71.5	fasciculate	regular	pale green (5G_2 - 7/2)
F43-1	7	2	59.6	80.6	83.0	velvety	regular	olive green to pale yellowish green (5GY - 6/4)
F65	8	2	54.2	55.3	48.5	velvety	irregular	olive green to light grayish green (5GY - 6/2)
UBOCC-A-110052	9	2	62.5	64.1	69.0	velvety	regular	pale green (5G_2 - 7/2 - 6/2)
UBOCC-A-111178	10	2	72.1	66.7	74.5	velvety	regular	olive green to light grayish green (5GY - 6/2)
CBS 112579	19	2	64.1	65.4	73.0	velvety	regular	pale green (5G_2 - 6/2)
MUCL 35036	20	2	61.4			velvety	regular	greenish gray (10GY - 6/1)
CBS 498.73	22	2	65.7			velvety	regular	grayish green (5G_2 - 5/2)
LCP05420	23	2	45.1			fasciculate	irregular	pale green (5G_2 - 7/2)
UBOCC-A-109090	23	2	55.2	54.0	53.0	velvety	regular	light olive green (5GY - 5/4)
LCP03969	24	2	60.8			fasciculate	regular	greenish gray (5G_1 - 5/1)
LCP04180	24	2	61.5			fasciculate	regular	greenish gray (5G_1 - 5/1)
UBOCC-A-111033	25	2	51.3			velvety	regular	olive green to pale yellowish green (5GY - 6/4)

F40-4	26	2	58.2			velvety	regular	pale yellowish green (5GY - 6/4)
PTX.PR.27.2	26	2	49.8	56.3	61.0	velvety	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 7/2)
PTX.PR.27.6	26	2	52.8			velvety	regular	light olive green (5GY - 5/4)
CBS 221.30 <sup>NT</sup>	27	2	78.2	77.9	82.0	velvety	regular	grayish green (5G <sub>/2</sub> - 5/2)
LCP00148	27	2	68.7			velvety	regular	grayish green (5G <sub>/2</sub> - 5/2)
LCP02492	27	2	65.4			velvety	regular	grayish green (5G <sub>/2</sub> - 5/2)
UBOCC-A-111172	28	2	47.2	53.3	57.5	velvety	regular	grayish green (5G <sub>/2</sub> - 5/2)
F2-1	12	3	50.9			velvety to weakly floccose	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 8/2)
F28-1	12	3	46.4			velvety to weakly floccose	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 8/2)
F29-1	12	3	51.0			velvety to weakly floccose	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 7/2)
F30-1	12	3	52.2			velvety to weakly floccose	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 8/2)
F33-1	12	3	51.0			velvety to weakly floccose	regular	light greenish gray (5GY - 8/1)
F34-1	12	3	54.3			velvety to weakly floccose	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 7/2)
F59-2	12	3	52.0			velvety to weakly floccose	regular	light greenish gray (10Y - 7/1)
F60-1	12	3	51.9	53.5	58.5	velvety to weakly floccose	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 8/2)
F6-1	12	3	53.0			velvety to weakly floccose	regular	light greenish gray (10Y - 8/1)
F61-6	12	3	49.4	55.4	56.0	velvety to weakly floccose	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
F62-4	12	3	52.3			velvety to weakly floccose	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 8/2)
F6-3	12	3	51.6			velvety to weakly floccose	regular	light greenish gray (5GY - 7/1)
F7-1	12	3	51.9			velvety to weakly floccose	regular	light greenish gray (5GY - 8/1)
F74-3	12	3	52.0			velvety to weakly floccose	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 7/2)
F8-1	12	3	55.4	58.0	65.5	velvety to weakly floccose	regular	light greenish gray (5GY - 8/1)
FM164	12	3	52.2			velvety to weakly floccose	regular	light greenish gray (5GY - 8/1)
PTX.PR.12.3	12	3	37.5	39.6	42.0	velvety to weakly floccose	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 7/2)
PTX.PR.13.6	12	3	52.3	58.0	59.3	velvety to weakly floccose	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 8/2)
PTX.PR.13.7	12	3	53.3			velvety to weakly floccose	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 8/2)
F51	16	3	53.2	57.1	61.5	velvety to weakly floccose	regular	pale green (5G <sub>/2</sub> - 6/2)
UBOCC-A-101449	18	3	65.6			velvety	regular	grayish green (5G <sub>/2</sub> - 5/2)

Les faits marquants de cette étude sont les suivants :

- Mise en place d'une large collection mondiale d'isolats fromagers et non fromagers de *P. roqueforti* (n > 180)
- Mise en évidence d'une diversité morphologique importante représentée par au moins 9 morphologies distinctes
- Existence d'une espèce unique *P. roqueforti* sur la base des régions testées par GC-PSR
- Développement de marqueurs microsatellites discriminants pour étudier la diversité intraspécifique chez *P. roqueforti*
- Mise en évidence de 28 haplotypes parmi les 164 isolats étudiés
- Mise en évidence de 3 populations génétiquement différenciées et corrélées à différents types de fromages à pâte persillée





# Chapitre 2

Diversité fonctionnelle au sein de l'espèce *Penicillium*  
*roqueforti*

-

Functional diversity within the *Penicillium roqueforti*  
species

Guillaume Gillot, Jean-Luc Jany, Elisabeth Poirier, Marie-Bernadette Maillard, Stella Debaets, Anne Thierry, Emmanuel Coton, Monika Coton. Functional diversity within the *Penicillium roqueforti* species (A soumettre au journal Applied and Environmental Microbiology).



Suite à l'évaluation de la diversité génétique présente au sein de notre collection d'isolats de *P. roqueforti*, l'objectif suivant était de décrire la diversité fonctionnelle en s'appuyant sur un sous-ensemble d'isolats jugé comme représentatif de la collection. Ainsi, afin d'évaluer une partie de la diversité fonctionnelle, 55 isolats de la collection ont été sélectionnés en se basant très largement sur la diversité génétique précédemment évaluée mais également sur le substrat d'isolement ou encore l'origine géographique afin d'obtenir la meilleure représentativité possible, l'objectif sous-jacent étant d'évaluer par la suite l'existence de liens potentiels entre la diversité fonctionnelle et la diversité génétique précédemment décrite.

Dans un premier temps, des essais préliminaires visant à évaluer la production d'arômes par les différents isolats sur un milieu « fromager » ont été réalisés en utilisant la technique de « Solid Phase MicroExtraction » (SPME) couplée à la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG). La conclusion finale fut que la fibre pour laquelle l'affinité pour les molécules ciblées était la plus importante était la fibre Carboxen/PDMS. Cependant, malgré une détection de l'ensemble de molécules ciblées (via des standards), l'absence d'un passeur automatique d'échantillons ne permettait pas une standardisation assez importante de l'injection, influant ainsi de manière non-négligeable sur le temps de rétention des molécules ciblées. De même, l'absence d'un spectromètre de masse rendait l'utilisation de standard obligatoire et réduisait le potentiel de reconnaissance des molécules produites. C'est pour cela qu'une collaboration fut ensuite envisagée avec Dr. Anne Thierry (équipe STLO, INRA de Rennes) qui employait la technique de HS-Trap permettant d'analyser de manière globale les arômes présents dans l'espace de tête. De même, de par leur implication dans la production de saveurs (métabolites volatiles et non-volatiles) ainsi que la texture du produit fini, les activités lipolytiques et protéolytiques ont également été évaluées. Pour cela, une étude préliminaire se basant sur les techniques et les milieux employés par Larsen et al. (1998; 1999) a été réalisée à partir de 6 isolats. Ainsi, des tests de diffusion sur gélose ont été réalisés sur trois milieux différents, l'un à base de tributyrine permettant d'évaluer l'activité estérase, un autre à base d'huile d'olive pour mesurer l'activité lipase et enfin un troisième milieu à base de caséine pour évaluer l'activité protéase. Cependant, la mesure des zones d'éclaircissement ou d'intensité de couleur résultant des différentes activités s'est révélée peu précise. Nous avons donc décidé de nous orienter vers le dosage des groupements NH<sub>2</sub> libres au TNBS pour évaluer l'activité protéolytique globale et d'obtenir une indication de l'intensité de la lipolyse à travers la détection des acides gras volatiles à chaîne courte (C4 et C6) en HS-Trap.

Concernant la mise au point de l'analyse en HS-Trap, un plan d'expérience a été mis en place.

Trois milieux ont été testés ainsi que deux contenants et une culture avec et sans cellophane (habituellement utilisé afin d'exprimer les résultats obtenus en unité de masse sèche). Les milieux testés étaient le cheese agar classique, un cheese agar où la matière grasse laitière est remplacée par une matière grasse laitière déjà émulsionnée ainsi qu'un rétentat d'ultrafiltration auquel un cinquième d'agar (v/v) à 75% est ajouté afin d'obtenir un milieu gélosé. Les conclusions finales furent que les cultures en fiole ne fournissaient pas des profils aromatiques en accord avec ceux classiquement obtenus à partir de fromages à pâte persillée. De même, les profils obtenus à partir des cultures utilisant les membranes de cellophane étaient beaucoup plus pauvres en diversité de composés et en intensité. Enfin, les profils aromatiques les plus caractéristiques furent obtenus avec le milieu gélosé issu de l'utilisation du rétentat d'ultrafiltration. Nous avons donc par la suite décidé de réaliser nos cultures en boîte de Petri en utilisant le rétentat d'ultrafiltration. Une modification fut toutefois apportée lors de l'élaboration du milieu de culture, une coagulation via l'utilisation de présure et de bactéries lactiques acidifiantes fut préférée à l'ajout d'agar afin de prévenir la prolifération éventuelle de bactéries sporulées grâce à l'abaissement du pH. Cette modification eut de plus comme avantage de rapprocher le modèle d'étude encore un peu plus des conditions de production d'un fromage via l'étape de coagulation.

Enfin, les souches ont également été testées quant à leur capacité à former des métabolites secondaires dont des mycotoxines. Pour cela, la production de 9 métabolites secondaires d'intérêt et parfois retrouvé dans des fromages, a été mesurée. Dans le cadre cette étude, une méthode de détection et de quantification par LC-MS/Q-TOF a été développée.

# 1 **Functional diversity within the *Penicillium roqueforti* species**

2  
3 Guillaume Gillot<sup>1</sup>, Jean-Luc Jany<sup>1</sup>, Elisabeth Poirier<sup>1</sup>, Marie-Bernadette Maillard<sup>2,3</sup>, Stella  
4 Debaets<sup>1</sup>, Anne Thierry<sup>2,3</sup>, Emmanuel Coton<sup>1</sup>, Monika Coton<sup>1\*</sup>.

5  
6 <sup>1</sup> Université de Brest, EA 3882 Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie  
7 Microbienne, ESIAB, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France.

8 <sup>2</sup> INRA, UMR1253 *Science et Technologie du Lait et de l'Œuf*, 65 rue de Saint Briec, 35000  
9 Rennes, France.

10 <sup>3</sup> AGROCAMPUS OUEST, UMR1253 *Science et Technologie du Lait et de l'Œuf*, 65 rue de  
11 Saint Briec, 35000 Rennes, France.

12  
13 **Keywords:** cheese, *Penicillium roqueforti*, secondary metabolites, volatilome, mycotoxins,  
14 proteolysis.

15  
16 **\*Corresponding author:** Monika Coton

17 Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne,

18 Parvis Blaise-Pascal, Technopôle Brest-Iroise

19 29280 Plouzané, France

20 Tel: +33 (0)2.90.91.51.55

21 Fax: +33 (0)2.90.91.51.01

22 E-mail: [monika.coton@univ-brest.fr](mailto:monika.coton@univ-brest.fr).

23  
24 **Running title:** Functional diversity in *Penicillium roqueforti*

## 26 **Abstract**

27 *Penicillium roqueforti* is used as a ripening culture for blue-veined cheeses and is greatly  
28 responsible for their organoleptic quality and typicity. Different types of blue-veined cheeses  
29 are manufactured and consumed worldwide, displaying specific aspect, texture, flavor and  
30 color. These features are largely accepted to be due to the different manufacturing methods  
31 but also to the specific *P. roqueforti* strains used. Indeed, *P. roqueforti* inoculated strains, via  
32 their proteolytic and lipolytic activities, have an effect both on texture and flavor of blue-  
33 veined cheeses. In particular, *P. roqueforti* produces a wide range of flavor compounds for  
34 which proportion variations influence flavor profiles of this type of cheese. Moreover, *P.*  
35 *roqueforti* species is also characterized by a substantial morphological and genetic diversity  
36 thus raising the question of the functional diversity of this species. In this context, 55  
37 representative strains were screened regarding particular metabolic properties as proteolytic  
38 activity (using  $\text{NH}_2$  free amino groups determination) and production of secondary  
39 metabolites, including aroma compounds (using HS-Trap GC-MS) and mycotoxins (via LC-  
40 MS/Q-TOF). Mini retentate model cheeses were used for aroma production and proteolysis  
41 analysis while YES agar medium was used for mycotoxin production. Overall, this study  
42 allowed highlighting a great functional diversity. Noteworthy, when *P. roqueforti* strains  
43 isolated from Protected Designation of Origin (PDO) or Protected Geographical Indication  
44 (PGI) blue-veined cheeses were only considered a clear relationship was demonstrated  
45 between genetic diversity, population structure and assessed functional traits.

46

47

48

49

## 50 **1. Introduction**

51 Earliest cheese-making evidences go back to the Neolithic era (1, 2). If at that time, milk  
52 coagulation via lactic acid production was probably first accidental, cheese-making suddenly  
53 provided numerous advantages (milk stabilization and storage, ease of transport,  
54 improvement of milk digestibility and change of organoleptic qualities) (3). Nowadays, more  
55 than 1000 varieties exist (4) and within the wide range of cheeses worldwide, blue-veined  
56 cheeses hold a special place with well-known varieties like French Roquefort, Italian  
57 Gorgonzola, Spanish Cabrales, English Stilton or Danish Danablu. Each blue cheese type  
58 originates from specific manufacturing processes and exhibits distinctive characteristics  
59 particularly due to the use of the well-known mold *Penicillium roqueforti*. This species has a  
60 very long history of safe use for blue cheese production although strain safety assessment has  
61 not been carried out in depth. In this context, *P. roqueforti*, and all other filamentous fungi  
62 used for food and feed production, have been excluded from the Qualified Presumption of  
63 Safety (QPS) evaluation activities since 2014, EFSA considering the body of knowledge  
64 related to a safe history of use as insufficient (5).

65 During cheese-making, *P. roqueforti* conidia are either added to milk, sprayed on curd or  
66 naturally colonize the cheese, in which their growth and metabolism largely contribute to the  
67 typical aspect and distinct blue cheese flavor (6). During the ripening period, *P. roqueforti* i)  
68 encounters specific growth conditions such as low temperatures, low oxygen levels, high  
69 carbon dioxide concentrations and presence of organic acids (7), ii) assimilates, as carbon  
70 sources, the main carbohydrates encountered in blue cheeses (lactose, glucose, galactose) but  
71 also lactate and citrate and iii) releases a large variety of proteolytic and lipolytic enzymes (6)  
72 involved in the organoleptic properties of the final product.

73 *P. roqueforti* strains are well known to have high enzymatic activities during blue cheese



74 ripening leading to the production of distinct aroma compounds or precursors in the final  
75 product (6). Indeed, these activities have been shown to be much higher than those observed  
76 in other cheese types (6, 8–10). In particular, *P. roqueforti* produces at least two extracellular  
77 lipases (an acidic and an alkaline lipase) (11–13) and an intracellular lipase (14), all involved  
78 in degradation of lipids into free fatty acids, which are important aroma compounds in cheese  
79 but also precursors of other aroma compounds such as methyl-ketones. Regarding proteolytic  
80 activities, *P. roqueforti* produces at least two extracellular proteases (a metalloprotease and an  
81 aspartic protease), two extracellular peptidases (a carboxypeptidase and a  
82 metalloaminopeptidase) and two intracellular peptidases (alkaline carboxy- and amino-  
83 peptidases) particularly involved in the hydrolysis of caseins and the release of small peptides  
84 and amino acids (6). Thus, thanks to these lipolytic and proteolytic activities, *P. roqueforti*  
85 contributes largely to the occurrence of a wide range of flavour compounds (volatile or not) in  
86 blue-veined cheeses. Interestingly, proteolytic and lipolytic activities can vary significantly  
87 between strains influencing the release of different amounts of aroma compounds (15–17) and  
88 consequently determining the specific aroma profiles of the different blue-veined cheeses  
89 (18).

90 In the past, the observed phenotypical diversity has led to numerous “technological” species  
91 names such as *P. glaucum*, *P. stilton*, *P. gorgonzolae* or *P. aromaticum*; however, nowadays,  
92 only one valid species name exists, *P. roqueforti* (19). Interestingly, substantial  
93 morphological and genetic differences among *P. roqueforti* strains in large worldwide strain  
94 collections have been recently reported (20, 21) and shown to be linked to specific strains  
95 used for cheese types recognized by a Protected Designation of Origin (PDO) or a Protected  
96 Geographical Indication (PGI) (20). For example, strains used to produce Gorgonzola-type  
97 cheeses displayed particular colony morphologies characterized by a pale green to a light

98 greenish grey colour and a velvety to weakly floccose texture. In this context, *P. roqueforti*  
99 strain selection is of great interest to ensure both efficient development during manufacture as  
100 well as product quality and typicity.

101 On the other hand, *P. roqueforti* has also been described to produce other secondary  
102 metabolites, in particular mycotoxins, in cheese but also in other foods or feeds especially if  
103 this species is a contaminant. For example, mycotoxin-related outbreaks due to PR toxin  
104 contaminations in animal feed have been reported (22–25). In cheese, PR toxin is unstable  
105 (26) and presumably degraded in PR imine (27). This metabolite can also be degraded into  
106 PR amide and PR acid according to the conditions (28). Two other well-known mycotoxins  
107 produced by *P. roqueforti*, roquefortine C (ROQ C) and mycophenolic acid (MPA), have also  
108 been encountered in cheese in a wide range of concentrations (29–35). However, a recent  
109 study showed these mycotoxins have relatively low cytotoxic effects, with IC<sub>50</sub> (Inhibitory  
110 Concentration 50%) respectively  $\geq 100 \mu\text{M}$  (ROQ C) and  $\geq 780 \mu\text{M}$  (MPA), on caco-2 human  
111 cell lines (36) compared to IC<sub>50</sub> values of mycotoxins with a regulatory limits in foods in EU,  
112 such as aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins or patulin (PAT) (Commission Regulation (EC)  
113 No 401/2006). Indeed, for example, Rasmussen et al. (37), showed that ROQ C was more  
114 than 30-fold less cytotoxic than PAT according to IC<sub>50</sub> values obtained from caco-2 cells  
115 experiments.

116 All these findings highlight the interest to further study functional metabolic traits among *P.*  
117 *roqueforti* strains that could also help lead to efficient strain selection in the future for the  
118 food industry.

119 In the present study, the main objectives were i) to assess functional diversity (proteolytic  
120 activities, metabolite production including aroma compounds and mycotoxins) within a subset  
121 of representative strains from a large worldwide *P. roqueforti* collection and (ii) to evaluate a

122 possible link between functional strain diversity and the previously described genetic  
123 diversity (20). To do so, 55 *P. roqueforti* strains (20) were screened using highly performant  
124 biochemical methods (LC-MS/Q-TOF for non-volatile metabolites and HS-Trap GC-MS for  
125 volatilome analysis).

126

## 127 **2. Materials and Methods**

### 128 **2.1 *Penicillium roqueforti* strains**

129 Among 164 previously studied isolates from a worldwide *P. roqueforti* collection  
130 (corresponding to 120 individual blue-veined cheeses collected from 18 different countries  
131 worldwide and to 27 *P. roqueforti* isolates from 21 different non-cheese substrates) (20), 55  
132 representative strains were selected for the present study (Table S1) based on multiple criteria  
133 (genetic diversity, morphological diversity, geographical origin and original substrate).

134

### 135 **2.2 Production of milk retentate from ultrafiltration**

136 Fresh raw milk (300 liters) was skimmed at 50°C using a cream separator (Elecrem,  
137 Châtillon, France). Cream was heat-treated at 95°C for 2 min with a pasteurizer Actijoule  
138 (Actini, Evian-Les-Bains, France) whereas skimmed milk was microfiltered at 50°C using a  
139 microfiltration unit equipped with 1.68 m<sup>2</sup> of mineral membranes (0.8 µm pore size, Pall-  
140 Exekia, Bazet, France). Microfiltered milk was then fat-standardized by adding heat-treated  
141 cream up to 20 g.kg<sup>-1</sup>. Standardized milk was concentrated by a 3.6 factor at 50°C using an  
142 ultrafiltration unit equipped with 13.6 m<sup>2</sup> of mineral membranes (0.02 µm pore size, Tami,  
143 Nyons, France). NaCl was added at a final concentration of 0.7% (w/w). Finally, the retentate  
144 was heat-treated at 95°C for 2 min with an indirect thermal processing system (Microthermics  
145 Inc., Raleigh, NC, USA) and frozen at -20°C. The composition of the retentate was as

146 follows: dry matter 282.9 g.kg<sup>-1</sup>, fat 70 g.kg<sup>-1</sup>, total nitrogen 107.56 g.kg<sup>-1</sup> and salt 0.84 g.kg<sup>-1</sup>.  
147 The pH was about 6.6.

148

### 149 **2.3 Media and culture conditions**

150 For aroma production assays, a model cheese was manufactured from milk retentate acidified  
151 by lactic starters, as follows. Thawed retentate was warmed up to 48°C for 10 min to facilitate  
152 downstream homogenization. Retentate was first inoculated with a mesophilic commercial  
153 lyophilized starter composed of strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp.  
154 *cremoris* (Choozit MA016 LYO 25 DCU, DuPont Danisco, France) at 10<sup>6</sup> CFU.mL<sup>-1</sup> and  
155 homogenized for 1 min. A Maxiren 180 rennet solution (DSM, Heerlen, the Netherlands),  
156 previously diluted five times, was then added (1.5 µL.mL<sup>-1</sup>) and homogenized for 1 min.  
157 Finally, 8 mL retentate aliquots were poured into 55 mm Petri dishes and incubated at 30°C  
158 for 1 h followed by 3 days at 20°C to produce acidified mini retentate model cheeses. The  
159 released whey was discarded before inoculation of spore suspensions. Regarding model  
160 cheeses, 38.5 µL of 10<sup>6</sup> spores.mL<sup>-1</sup> spore suspension were inoculated and spread onto plates.  
161 Cultures were then incubated for 14 days at 25°C in the dark. Each culture was performed in  
162 triplicate. Non-inoculated model cheeses were used as controls and incubated under the same  
163 conditions.

164 For mycotoxin determination, YES (Yeast Extract Sucrose) agar medium (38) buffered at pH  
165 4.5 with phosphate-citrate buffer (39) and characterized by a high C/N ratio to favor  
166 mycotoxin production, was used to assess the intraspecific variability of secondary metabolite  
167 production among *P. roqueforti* isolates, as described by Fontaine et al. (40). For secondary  
168 metabolite production (i.e. mycotoxins), 0.5 µL 10<sup>6</sup> spores.mL<sup>-1</sup> each spore suspension were  
169 inoculated in the center of YES plates and incubated for 7 days at 25°C in the dark. Each

170 culture was performed in triplicate. After incubation, the content of the agar plates was stored  
171 at -20°C prior to mycotoxin analysis.

172

## 173 **2.4 Spore suspension preparation and inoculation**

174 The strains were reactivated from frozen (-80°C) glycerol stocks on PDA (Difco PDA,  
175 Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) medium and incubated at 25°C  
176 for 5-7 days. The colonies were then subcultured on PDA medium in the same conditions.  
177 Spore suspensions were prepared from fungal colonies collected from agar plates with a  
178 sterile loop and suspended in 500 µL of sterile water containing 0.01% Tween 80. Spore  
179 numerations were performed using a Malassez hemocytometer and suspensions were adjusted  
180 to 10<sup>6</sup> spores.mL<sup>-1</sup>.

181

## 182 **2.5 Fungal growth assessment**

183 Fungal growth was assessed and correlated to mycotoxin concentrations produced in YES  
184 media by LC-MS/Q-TOF. To so, colony diameters were measured in two perpendicular  
185 directions after 7 days incubation on YES medium cultures and the corresponding surface was  
186 calculated. Mycotoxin quantification data was expressed as per unit of growth surface.

187

## 188 **2.6 Analysis of volatile compounds using gas chromatography-mass 189 spectrometry**

190 After 14 days incubation, three 10 mm-diameter plugs (~1 g in total) per Petri dish were  
191 transferred into 22 mL PerkinElmer vials and tightly closed with polytetrafluorethylene  
192 (PTFE)/silicone septa before storage at -80°C, prior to gas chromatography-mass  
193 spectrometry (GC-MS) headspace (HS)-trap analyses. HS-trap-GC-MS analyses were

194 performed using a Perkin Elmer Turbomatrix HS-40 trap sampler, and a Clarus 680 gas  
195 chromatograph coupled to a Clarus 600T quadrupole MS (Perkin Elmer, Courtaboeuf,  
196 France), as previously described by Pogačić et al. (41). Briefly, samples were warmed for 15  
197 min to 65°C and volatiles were extracted at 207 kPa pressure maintained in the vial for 1 min  
198 with the carrier gas (helium), before being adsorbed on a Tenax trap at 35 °C. According to  
199 preliminary test results, the trap load was only performed once for each vial trap. The trap was  
200 heated at 250°C for 0.1 min and backflushed at 89 kPa, leading to desorption of the volatiles.  
201 Volatiles were then separated on a Stalbilwax MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25  
202 µm; Restek), with helium as mobile phase. The temperature of the oven was initially 35 °C,  
203 maintained for 10 min then increased at 5°C.min<sup>-1</sup> up to 230°C. The mass spectrometer was  
204 operated in the scan mode (scan time 0.3 s, interscan delay 0.03 s) within a mass range of m/z  
205 29–206. Ionization was performed by electronic impact at 70 eV. All samples were analyzed  
206 in the same GC–MS run over a period of 13 consecutive days, with all the samples within a  
207 replicate injected in a randomized order over the GC–MS run. Standards and blank samples  
208 were regularly injected to verify the absence of instrumental drift and carryover, respectively,  
209 as previously described (41)

210 GC-MS data were processed as previously described by Pogačić et al. (41). Briefly, the data  
211 were processed using the open source XCMS package, which permits to convert the data to  
212 time- and mass-aligned chromatographic peaks areas.

213 Compounds were identified by comparison with mass spectra and retention times with those  
214 of authentic standards and/or on the basis of mass spectral data from the NIST 2008 Mass  
215 Spectral Library (Scientific Instrument Services, Ringoes, NJ, USA) and their retention index.

216 All statistical analyses were performed using software R (<http://www.r-project.org/>) on  
217 selected signals resulting from data processing using XCMS.

218 An analysis of variance (ANOVA) was performed using R on signals to determine if the  
219 concentration of each volatile compound significantly varied according to i) the different  
220 cultures including controls and ii) the different cultures for a subset of the 15 strains isolated  
221 from PDO/PGI cheeses. Means were then compared using the least significant difference  
222 (LSD) test.

223 Principal component analyses (PCA) were performed for the compounds that varied  
224 significantly by strain with P value < 0.01, using the package FactomineR of the R software.

225

## 226 **2.7 Mycotoxin production analysis**

### 227 **Non-selective extraction of metabolites including mycotoxins**

228 All samples (YES cultures, blank matrix or spiked blank matrix) were first homogenized for 1  
229 min using Ultraturrax T25 digital (IKA, Heidelberg, Germany). Then, 4 g of this mixture  
230 were added to 25 mL of acetonitrile (ACN) containing 0.1% formic acid (v/v) and vortexed  
231 for 30 s. A 15 min-sonication was then applied to samples before vortexing 30 s and  
232 centrifuging at 5000 g for 10 min at 4°C. Ten mL of the ACN phase were collected and stored  
233 at -20°C. Before LC-MS/Q-TOF analysis, 1 mL was filtered through a 0.2 µm PTFE  
234 membrane syringe 4 mm filter (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) in an  
235 amber vial.

236

### 237 **Chromatographic and mass spectrometer conditions**

238 Extracted metabolites were separated and identified by an Agilent 6530 Accurate-Mass  
239 Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) LC/MS system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA,  
240 USA). The HPLC system included a Binary pump 1200 and degasser, well plate autosampler  
241 with thermostat (set to 10°C) and a thermostated column compartment. Two µL of filtered

242 samples were injected in the system and separation was achieved using a ZORBAX Extend-  
243 C18 column (2.1 x 50 mm and 1.8  $\mu\text{m}$ , 600 bar). The column was maintained at 35 °C and the  
244 flow rate was set to 0.3 mL.min<sup>-1</sup> using as mobile phase: solvent A (milli-Q water + 0.1%  
245 formic acid + 10 mM ammonium formate) and solvent B (100% ACN). Solvent B was  
246 maintained at 10% for the first 4 minutes, followed by a gradient of 10-100% of B during 36  
247 min. Finally, solvent B was maintained at 100% for 10 min followed by 5-min post-time.  
248 Compounds were detected using an Agilent 6530 Series Accurate-Mass Quadrupole Time-of-  
249 Flight (Q-TOF) mass spectrometer. Analytes were ionized in both ESI+ and ESI- modes (ESI:  
250 Electrospray Ionization). Mass spectrometer conditions were: capillary voltage, 4 kV; source  
251 temperature, 325°C; nebulizer pressure, 50 psig; drying gas, 12 L/min and ion range, 100 to  
252 1000 m/z. Targeted metabolites were andrastin A (AND A), (iso)fumigaclavine A  
253 (ISO)FUMI A, the stereoisomers are not distinguishable by the used method), eremofortin A  
254 & B (EREM A & B), penitrem A (PEN A), MPA, ROQ C, PR toxin and PAT. AND A,  
255 (ISO)FUMI A, EREM A & B standards were obtained from Biovotica (Goettingen,  
256 Germany), PEN A from Cfm Oskar Tropitzsch (Marktredwitz, Germany), MPA, ROQ C and PAT  
257 from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) and PR toxin from Dr. Olivier Puel (INRA,  
258 Toulouse, France). All mycotoxin stock solutions were prepared in DMSO at 1 mg.mL<sup>-1</sup>  
259 except for PAT (5 mg.mL<sup>-1</sup> DMSO) and PR toxin (0.4 mg.mL<sup>-1</sup> ACN), and stored at -20°C in  
260 amber vials.

261

## 262 **Method performance and validation parameters**

263 Method performance and validation parameters including linearity ( $R^2$ ), detection limit (DL),  
264 quantification limit (QL), recovery, precision and matrix effects, were assessed according to  
265 the ICH guidelines (42). A calibration method was applied for reliable metabolite



266 quantifications as previously described by Fontaine et al. (30). Briefly, aliquots of blank  
267 matrix (YES medium) were first treated following the sample preparation procedure described  
268 above to obtain blank extracts. Each blank extract was then spiked with an adequate volume  
269 of the stock solutions of each mycotoxin to reach concentrations ranging from 1 to 5000  
270 ng.mL<sup>-1</sup> for AND A and (ISO)FUMI A, 10 to 5000 ng.mL<sup>-1</sup> for EREM A & B, 50 to 5000  
271 ng.mL<sup>-1</sup> for PEN A, 0.5 to 5000 ng.mL<sup>-1</sup> for MPA, 0.5 to 2500 ng.mL<sup>-1</sup> for ROQ C, 10 to  
272 2000 ng.mL<sup>-1</sup> for PR toxin and from 1500 to 750000 ng.mL<sup>-1</sup> for PAT. Calibration curves  
273 were obtained by plotting the peak area against mycotoxin concentrations using a 1/x<sup>2</sup>  
274 weighted linear regression model. According to ICH guidelines (42), DL and QL of each  
275 metabolite was obtained by multiplying the standard deviation of y-intercepts of regression  
276 lines divided by the slope, by 3.3 and 10, respectively. Each metabolite QL was validated by  
277 analysis of blank extracts spiked at their respective calculated QL level (42). Recovery  
278 percentage evaluation was performed in triplicate using matrices spiked with a mix of AND  
279 A, EREM A & B, (ISO)FUMI A, MPA, ROQ C, PR toxin, PEN A and PAT. For each  
280 mycotoxin, the method matrix effect was estimated as described by Fontaine et al. (30). A  
281 mix of the nine metabolites was also injected 10 times in ESI+ and 5 times in ESI- on  
282 successive days in order to evaluate method precision and repeatability. Calibration curve  
283 calculations were carried out using the Agilent MassHunter Workstation Software (Agilent  
284 Technologies, Santa Clara, CA, USA).

285

### 286 ***Mycotoxin detection and quantification in YES medium samples***

287 Identification of each metabolite in YES samples was performed using both the mean  
288 retention time  $\pm$  1 min for all metabolites (except for PR toxin and MPA with a mean  
289 retention time  $\pm$  0.5 min to ensure accurate quantification) and corresponding ions listed in

290 Table S2. Mycotoxin concentrations in YES samples were calculated from the equation  $y =$   
291  $mx+b$ , as determined by weighted ( $1/x^2$ ) linear regression of the matrix-matched calibration  
292 data and correlated to calculated fungal growth areas.

293

## 294 **2.8 Proteolysis determination using TNBS**

295 The principle and methodology were previously described (43, 44) and are based on  
296 determining free  $\alpha$ -amino groups released by hydrolysis of cheese proteins that react with  
297 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) to form products that strongly absorb at 420 nm. In  
298 the present study, proteolysis degree was determined from the cultures performed on the  
299 ultrafiltration retentate-based model medium. After plug-sampling, surface spores and  
300 mycelium were removed to determine dry weight. The remaining fungal free medium was  
301 weighed and three equivalent volumes of distilled sterile water were added. Then, the mixture  
302 was homogenized for 30 s using Ultraturrax T25 digital (IKA, Heidelberg, Germany),  
303 aliquoted in 1.5 mL tubes and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  prior to analysis.

304 Before analysis, the TNBS reagent solution (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid solution,  
305 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was diluted to 5 mM concentration in deionized water.  
306 A 1M borate potassium solution adjusted to pH 9.2 was prepared using boric acid (Sigma-  
307 Aldrich, St. Louis, MO, USA) and potassium hydroxide. Glycine (Sigma-Aldrich, St. Louis,  
308 MO, USA) standard curve was prepared and ranged from 0.1-1.5 mM. Regarding reactions,  
309 all experiments were performed in 96 microwell plates (Thermo Fischer Scientific, Roskilde,  
310 Denmark). Before analysis, samples were thawed. Then, 100  $\mu\text{L}$  of 10% trichloroacetic acid  
311 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were added to 400  $\mu\text{L}$  sample to precipitate proteins.  
312 The mixture was vortexed and centrifuged for 5 min at 3000 g at  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatant was  
313 collected and diluted 100 or 10 times for culture samples and controls, respectively. Ten  $\mu\text{L}$

314 diluted samples or the glycine standard, 100  $\mu$ L potassium borate 1 M pH 9.2 solution and 40  
315  $\mu$ L 5 mM TNBS solution were added in each well and incubated for 1h at 37°C in the dark.  
316 The reaction was stopped and pH neutralized by adding 40  $\mu$ L of stop solution (sodium  
317 phosphate monobasic 2 M and sodium sulfite 18 mM). The absorbance was read at 420 nm  
318 using a POLARstar Omega microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany).  
319 Potassium borate (1 M, pH 9.2) solution was used as a blank. Amino group concentrations  
320 were determined in millimolar (mM) equivalent glycine based on the glycine standard curve  
321 and taking into account the corresponding dilution factor.

322

### 323 **3. Results**

#### 324 **3.1 Aroma compounds production**

325 After GC-MS data processing using the XCMS package of R, 3067 signals, corresponding to  
326 one mass fragment (m/z) at one retention time, were generated since multiple signals are  
327 generated per compound.

328 A total of 52 volatile aroma compounds were identified, including 16 ketones, 8 acids  
329 (including free fatty acids, FFA), 7 sulfur compounds, 6 alcohols, 5 aldehydes, 4 pyrazines, 2  
330 alkanes, 1 ester, 1 lactone, 1 phenol and 1 terpene (Table 1).

331 Regarding acetoin and acids (including FFA), up to 25% carryover was detected from the  
332 previous sample while no carryover was observed for any other compound from other  
333 chemical classes. Three cultures showing aberrant values were discarded (one of the triplicate  
334 cultures for FM164, LCP00148, and F51), leading to a dataset of 172 cultures including 10  
335 controls. Results of the ANOVA performed showed significant differences for 38 out of the  
336 52 volatiles (Table 1).

337 PCA performed for these 38 volatile compounds is shown in Fig. 1. The first two axes

338 accounted for 33.39% of the total variability. The first principal component (PC1), describing  
339 19.61% of the variability, was positively associated with many volatiles, in particular acids  
340 (including FFA), pyrazines and, to a lesser extent, methyl-ketones, while it was negatively  
341 associated with diacetyl and acetoin (Fig. 1B). PC2, accounting for 13.78% of the variability,  
342 was positively related to many methyl-ketones. Control samples appeared in the upper left  
343 quadrant (Fig. 1A), positively associated with diacetyl and acetoin, negatively associated with  
344 most variables, and well separated from the other samples. It can be noted that some  
345 variability was also observed among the three biological replicates for some cultures as  
346 classically observed using this type of approach.

347 In a previous study by Gillot et al. (20), three genetically differentiated populations were  
348 described for a large *P. roqueforti* collection including the 55 isolates used in this study. In  
349 order to compare genetic data to aroma production, each genetic population was color coded  
350 in Fig. 1A. PCA results on aroma compound profiles showed that isolates belonging to  
351 genetic population 1 clustered quite well in comparison to the other two population of  
352 isolates. Furthermore, 4 isolates (namely LCP00148, FM164, LCP02492 and F51) were  
353 clearly distinguished from all other cultures and had distinct aroma compound profiles. Strain  
354 F51, for example, was positively associated with PC1 and produced significantly higher  
355 amounts of C3, iC4 and iC5. Strains LCP00148, FM164, LCP02492 were associated with  
356 several methyl-ketones (heptan-2-one, nonan-2-one, non-8-en-2-one) and 2,3-dimethyl-5-  
357 [(E)-prop-1-enyl]pyrazine. Interestingly, these 3 strains produced 30 to 130 fold more heptan-  
358 2-one compared to the other cultures and controls.

359 Individually and among the 38 volatiles used for PCA, LCP00148 was characterized by the  
360 highest amounts of 2-hydroxypentan-3-one, nonan-2-one, non-8-en-2-one, nonan-2-ol and  
361 undecan-2-one; FM164 by the highest amounts of pentan-2-one, butan-2-ol and heptan-2-one

362 and LCP02492 by the highest amounts of 2,3-dimethyl-5-[(E)-prop-1-enyl]pyrazine;  
363 moreover, it was characterized by the highest amounts of heptan-2-one, octan-3-one, 2-  
364 hydroxypentan-3-one, nonan-2-one, non-8-en-2-one, C3, undecan-2-one and C4.  
365 To a lesser extent, CBS 479.84 and CBS 498.73 were also distinguished from other isolates.  
366 CBS 479.84 was the highest producer of butan-2-one,  $\beta$ -Myrcene, 4-methyl-2,3-  
367 dihydropyran-6-one and p-cresol while CBS 498.73 was characterized by the highest amounts  
368 of 4-methylpentan-2-one, 2,5-dimethylpyrazine, 2,3,5-trimethylpyrazine and benzaldehyde.  
369 Overall, among the 55 isolates analyzed by GC-MS, high aroma production profile variability  
370 was observed including some isolates that produced much higher quantities of methyl-ketones  
371 or related aroma compounds.

372

### 373 **3.2 Mycotoxin detection and quantification**

374 A multi-mycotoxin method targeting 9 metabolites of interest for *P. roqueforti*, namely AND  
375 A, (ISO)FUMI A, EREM A & B, PEN A, MPA, ROQ C, PR toxin and PAT, was developed  
376 using LC-MS/Q-TOF. Mycotoxin standards and samples were ionized in their most sensitive  
377 ESI modes for detection and quantification (Table S2) although ESI (+/-) modes were both  
378 systematically performed on all samples. This procedure ensured best recoveries as well as  
379 DL and QL values for each target. Method performance characteristics were first obtained for  
380 the 9 mycotoxins prepared in ACN and all 9 metabolites were successfully eluted at different  
381 retention times including MPA and PR toxin known to have an  $[M+H]^+$  ion with the same  
382 mass ( $m/z$  321.13). Interestingly, the latter compound is not detected in ESI- facilitating the  
383 identification of both compounds. Linearity ( $R^2$ ) for each standard curve was determined to be  
384  $> 0.991$  (data not shown). Results obtained for the quantitatively validated 9 mycotoxins are  
385 presented in Table S2. QL values ranged from 37.41  $ng.g^{-1}$  to 327.46  $ng.g^{-1}$  for 8 mycotoxins

386 except PAT with a QL value equal to 19409.12 ng.g<sup>-1</sup> while DL values were as low as 12.34  
387 ng.g<sup>-1</sup> for PEN A and up to 108.06 ng.n<sup>-1</sup> for 7 mycotoxins (only PAT was higher with  
388 DL=6405.01 ng.g<sup>-1</sup>) (Table S2). Moreover, data showed that the compounds did not interfere  
389 with each other in the measuring range and low matrix interference was observed for the  
390 different mycotoxins in the measuring range studied (similar results in ACN experiments).  
391 Finally, a mixture of the nine metabolites injected 10 times in ESI+ and 5 times in ESI- over  
392 time revealed only slight differences between injections retention times ( $\pm$  0.01 to 0.06 min)  
393 and near identical peak areas thus validating technical stability. Blanks injected between two  
394 samples to test for carryover showed zero abundance of standards detected in all blanks (<DL  
395 values). Regarding the mean recovery rates, they ranged from 78 to 107% (42), which  
396 considered as acceptable recovery rates.

397 For the 55 studied isolates, among the 9 targeted metabolites, no PEN A (<DL of 12.34 ng.g<sup>-1</sup>)  
398 <sup>1</sup>) or PAT (<DL of 6405.01 ng.g<sup>-1</sup>) were detected in any YES culture samples. Regarding  
399 other metabolites, AND A, ROQ C, (ISO)FUMI A, PR toxin, MPA, EREM B and EREM A  
400 were respectively detected in 98, 96, 94, 87, 84, 54 and 27% while quantified in 98, 96, 78,  
401 58, 42, 40 and 9 % of the samples, in descending order of importance.

402 Interestingly, ROQ C, AND A and (ISO)FUMI A were the 3 most widely produced  
403 metabolites. Indeed, only 1 isolate (UBOCC-A-110052 originally isolated from olive brine)  
404 did not produced AND A in detectable quantities in YES cultures, 2 isolates (LCP00148  
405 originally isolated from brewery atmosphere & LCP02492, unknown substrate) did not  
406 produce ROQ C and no (ISO)FUMI A was detected for 3 isolates (CBS 304.97, DSMZ 1999  
407 & MUCL 35036 originally isolated from mozzarella, beef meat, and Quercus sp. drying  
408 wood, respectively). Noteworthy, 5 isolates (UBOCC-A-111277, F24-2, F15-3, F53,  
409 PTX.PR.22.2) produced quantifiable amounts of EREM B; however, no PR toxin was

410 detected while EREM B is one of the main intermediates involved in PR toxin biosynthesis.  
411 On the other hand, all isolates that were shown to produce EREM A (a metabolic intermediate  
412 found later than EREM B in the biochemical pathway) in quantifiable amounts also produced  
413 PR toxin (Table S3).

414 Concerning metabolite concentration ranges detected among isolates, the highest variability  
415 was observed for PR toxin production with a 110 factor observed between the highest (CBS  
416 479.84, 330 ng/g/cm<sup>2</sup> mycelium) and lowest (LPC04180, 3 ng/g/cm<sup>2</sup> mycelium)  
417 concentration. This feature was also illustrated by the corresponding standard deviation value  
418 which was the highest for this metabolite. Regarding concentration means, the most regularly  
419 produced mycotoxin in terms of number of positive samples and mean production was ROQ  
420 C (mean of 81 ± 39 ng/g/cm<sup>2</sup> mycelium) followed by AND A (mean of 62 ± 41 ng/g/cm<sup>2</sup>  
421 mycelium) and (ISO)FUMI A (mean of 57 ± 47 ng/g/cm<sup>2</sup> mycelium). Overall, (ISO)FUMI A,  
422 ROQ C, PR toxin and AND A were detected in more than 87% isolates and were produced at  
423 much higher concentrations when compared to EREM A, EREM B and MPA. Statistical tests  
424 were also performed on these data; however, results did not reveal any particular distribution  
425 among isolates when compared to the previously described genetic diversity by Gillot et al  
426 (20) for these strains.

427 Individually, 4 isolates, namely F65, F36-1, LCP05419 and CBS 479.84, were respectively  
428 found to produce much higher concentrations of (ISO)FUMI A and MPA (241 and 57  
429 ng/g/cm<sup>2</sup> mycelium, respectively), EREM A and B (25 and 58 ng/g/cm<sup>2</sup> mycelium,  
430 respectively), ROQ C and AND A (237 and 220 ng/g/cm<sup>2</sup> mycelium, respectively), or PR  
431 toxin (330 ng/g/cm<sup>2</sup> mycelium) in comparison to other isolates. Noteworthy, LCP05419,  
432 isolated from strawberry sorbet, produced the highest quantities of all targeted metabolites  
433 among all isolates in the tested conditions. On the contrary, the F27-1 strain, isolated from

434 blue cheese, was distinguished by an inability to produce quantifiable amounts of the majority  
435 of the targeted metabolites. This strain (F27-1) did not produce (ISO)FUMI A, EREM A,  
436 EREM B, PR toxin and MPA, but also presented low ROQ C (42 ng/g/cm<sup>2</sup> mycelium) and  
437 AND A (32 ng/g/cm<sup>2</sup> mycelium) quantities, below average value.

438

### 439 **3.3 Proteolytic activity of the different *P. roqueforti* isolates**

440 In total, 55 isolates were screened to determine their proteolytic activity. Mean values  $\pm$  95 %  
441 confidence intervals were calculated for each sample (isolates and control) and revealed that  
442 significant differences existed between the control condition and all samples except for 2  
443 samples. Equivalent glycine concentrations (mM) were used to evaluate the proteolytic  
444 activity of the isolates and concentrations ranged from 116 (*P. roqueforti* F41-4) to 550 (*P.*  
445 *roqueforti* F52) mM (Fig. 2). These results unraveled a 4.74 factor based on mean values  
446 between the least proteolytic and most proteolytic isolates. Regarding variability, the mean  
447 value of the standard deviations was equal to 14% and never exceeded 30% when isolates  
448 were considered separately. Mean values  $\pm$  95 % confidence intervals were calculated taking  
449 into account the 3 previously described genetically differentiated populations (20) but no  
450 correlation was highlighted.

451

### 452 **3.4 Global analysis for PDO/PGI isolates**

453 As strains isolated from a given PDO or PGI cheese type were systematically associated to  
454 the same genetic population in a previous study concerning the genetic diversity within the *P.*  
455 *roqueforti* species (20), specific statistical analyses were performed here with the subset of 15  
456 strains (out of the 55 screened) isolated from PDO/PGI cheeses. The results of ANOVA  
457 showed significant differences between strains for 20 volatiles (Table 1), proteolysis, and all



458 mycotoxins (data not shown). The results are summarized on a PCA including all 28 variables  
459 (Fig. 3). The first two axes accounted for 51.01% of total variability. PC1, describing 34.54%  
460 of the variability, was positively associated with most volatiles, in particular acids (including  
461 FFA), pyrazines and, to a lesser extent, methyl-ketones. PC2, accounting for 16.57% of the  
462 variability, was positively related to MPA, PR toxin, AND A and octan-3-one and negatively  
463 associated to EREM A, EREM B and octane. Noteworthy, concatenation of all informative  
464 variables (i.e. proteolysis degree and metabolite production including aroma compounds and  
465 mycotoxins) permitted to distinguished isolates associated to the 3 previously described  
466 genetically differentiated populations. The isolates belonging to population 3 were positively  
467 associated with PC1 while population 1 and 2 were negatively and positively correlated to  
468 PC2, separated by the zero axis of the PC2, respectively (Fig.3).

469

## 470 **4. Discussion**

471 In this study, we selected 55 representative *P. roqueforti* strains based on a previous study  
472 (20) and determined their volatilomes and mycotoxin production profiles using highly  
473 performant biochemical methods (HS-Trap GC-MS and LC-MS/Q-TOF, respectively).  
474 Substantial functional diversity was observed among both cheese-related and non-cheese  
475 related *P. roqueforti* isolates.

476 For aroma production, 52 volatile compounds were identified including sixteen ketones  
477 (representing on average 32% of total peak areas but ranging from 8 to 65%), 8 acids  
478 (including FFA) (23%), 7 sulfur compounds (13%), 6 alcohols (16%), 5 aldehydes (8%), 4  
479 pyrazines (7%), 2 alkanes (<1%), 1 ester (<1%), 1 lactone (<1%), 1 phenol (<1%) and 1  
480 terpene (<1%). These results were in accordance with previous studies highlighting methyl-  
481 ketones as the major flavor compounds in blue cheeses (18, 45–49). Indeed, they generally

482 constitute between 50 and 75% of the total flavor compounds (18, 48–50) and their presence  
483 and concentration in cheese is largely correlated to the typical blue cheese note and intensity  
484 (6). Usually, highest methyl-ketone concentrations are encountered for heptan-2-one and  
485 nonan-2-one, even if pentan-2-one and undecan-2-one concentrations are also often high (18,  
486 47, 49, 50). However, in this study, 2-butanone and 3-hydroxy-2-butanone (acetoin)  
487 represented almost 82% of the total methyl-ketone production. Noteworthy, the obtained data  
488 corresponded to production by pure strains while literature data correspond to values  
489 encountered in cheese that exhibit a complex microbiota with metabolic potential. Conditions  
490 used in this study, that are quite distant from classical cheese production, especially in terms  
491 of temperature, may affect fungal metabolism and explain the observed differences.

492 In this study, acids including FFA (C2 to C8) appeared as the second most important  
493 chemical group in terms of quality and quantity. Free fatty acids along with methyl-ketones  
494 were already reported in blue cheeses as the most abundant compounds (47, 49). Noteworthy,  
495 significant carry-over (up to 25%) was observed for this chemical group in the present study  
496 which may lead to variability in quantification.

497 Alcohols were the fourth most abundant compounds represented by approximately 16% total  
498 peak areas. This finding is also in good agreement with previous findings showing that  
499 alcohols constituted between 15 and 30% of total volatile flavor compounds in blue cheese  
500 (18, 48). In particular, among primary alcohols, 3-methylbutan-1-ol has been identified as the  
501 most abundant in blue cheeses (18, 48) which was also observed for *P. roqueforti* strains in  
502 this study. Indeed, this molecule represented no less than 71% of total alcohols followed by  
503 oct-1-en-3-ol (13%), a well-known mushroom flavor compound of *Agaricus bisporus* and  
504 *Pleurotus* species (51, 52). Interestingly, an unexpected level of sulfur compound production  
505 representing up to 13% of total volatile compounds was observed in the present study yet

506 lower concentrations are typically observed in blue cheeses directly. Aldehydes (8%) and  
507 pyrazines (7%) were also produced at significant levels by the different *P. roqueforti* isolates  
508 although typically reported at low levels in blue cheese (18). As stated above, the conditions  
509 used in this study may explain the observed differences. Finally, alkanes, esters, lactones,  
510 phenols and terpenes represented less than 1% of the total volatile fraction which is in  
511 agreement with previous studies that identified these compounds (especially esters and  
512 lactones that are often characterized by fruity and floral flavors) at low concentrations (18,  
513 47).

514 To further investigate the strain-dependent volatilome patterns observed for the 55 *P.*  
515 *roqueforti* isolates included in this study, PCA global analyses were carried out based on both  
516 the previously described genetic diversity for these isolates (20) and volatilome data.  
517 Interestingly, among the 3 genetically differentiated *P. roqueforti* populations, population 1  
518 individuals (Fig 1.) were homogeneously distributed in comparison to the other two genetic  
519 populations. This distribution can be partly explained as less genetic diversity exists within  
520 this population. Indeed, population 1 contains 16 strains represented by 5 haplotypes (out of  
521 28) while, for example, population 2 contains 34 strains represented by 19 different genetic  
522 profiles. Higher genetic diversity within population 2 can also explain the heterogeneous  
523 distribution observed among volatilome patterns observed for these *P. roqueforti* isolates.

524 Non volatile secondary metabolites, including mycotoxins, were also analyzed in this study to  
525 gain better knowledge on metabolite production profiles within this species. Indeed,  
526 metabolite profiling is often used as a means to discriminate fungal species such as those  
527 belonging to the section *Roquefortorum*, namely *P. roqueforti*, *P. paneum*, *P. carneum* and *P.*  
528 *psychrosexualis*. Among the targeted metabolites, quantifiable levels of (ISO)FUMI A, ROQ  
529 C, PR toxin and AND A were detected among a large number of isolates when compared to

530 EREM A, EREM B and MPA. Noteworthy, LC-MS/Q-TOF method does not distinguish  
531 fumigaclavine (FUMI A) from its isomer form isofumigaclavine A (ISOFUMI A) as these  
532 stereoisomers have the same chemical formula,  $C_{18}H_{22}N_2O_2$ , and only differ in C8, C9  
533 stereochemistries (8S,9S for FUMI A and 8S,9R for ISOFUMI A) (53).

534 (ISO)FUMI A has already been identified in blue cheeses (34) and silage (54) which  
535 correspond to *P. roqueforti* related environments. Several studies have already reported  
536 ISOFUMI A production by different *P. roqueforti* strains (55–58) and this isomeric form is  
537 well admitted to be commonly produced among *P. roqueforti* strains while FUMI A has  
538 especially been described to be produced by *A. fumigatus* and some *Penicillium* spp. such as  
539 *P. chrysogenum* or *P. commune*. However, a study carried out by Boysen et al. (59) also  
540 reported that multiple *P. roqueforti* strains were able to produce FUMI A contrary to *P.*  
541 *carneum* and *P. paneum* isolates. More recently, O'Brien et al. (58) showed that almost 70%  
542 of strains (55 out of 79) isolated from silage produced ISOFUMI A which is in accordance  
543 with the data obtained in our study.

544 MPA, a mycotoxin potentially produced by *P. roqueforti* strains and well-known to be used  
545 as an immunosuppressant in organ transplants, was produced by 42% of isolates clearly  
546 highlighting the strain-dependent nature of this metabolite. Other studies have already shown  
547 that MPA is not systematically produced (30) suggesting that MPA-production might be a  
548 strain-dependent trait in this species (40). Likewise, in the studies by Geisen et al. (60) and  
549 Boysen et al. (59), only 45 and 50 % of the studied strains, respectively, were MPA-producers  
550 in semi-synthetic media. These observations are once more in agreement with the present  
551 study. Several studies have also identified this metabolite in blue-veined cheeses with a large  
552 range of concentrations (29–33). Moreover, MPA is not always detected in quantifiable  
553 amounts, a finding observed in more than 62% of blue cheese samples in a recent study by

554 Fontaine et al. (30). Noteworthy, some cheese samples in the latter study actually  
555 corresponded to cheeses from where some of our isolates came from thereby confirming the  
556 strain-dependent nature of strains.

557 Concerning ROQ C, this mycotoxin is well-known to be produced by *P. roqueforti* strains  
558 and is almost always encountered in detectable quantities when *P. roqueforti* is cultured on  
559 semi-synthetic media but also in blue cheeses and silage samples (30, 31, 34, 35, 54, 58, 61–  
560 63). In the present study, all isolates except 2 (LCP00148 & LCP02492) produced  
561 quantifiable amounts of ROQ C. Further studies will be required to understand the genetic  
562 basis explaining the lack of production of these 2 isolates. Another metabolite known to have  
563 anti-tumor properties (64–66), AND A, was produced by all strains except 1 (UBOCC-A-  
564 110052). In general, it can be encountered in significant concentrations in blue veined cheeses  
565 (67, 68) and silage (54) and is commonly produced by *P. roqueforti* strains as reported by  
566 O'Brien et al. (58) and Nielsen et al. (63).

567 PR toxin is a known mycotoxin produced by *P. roqueforti* that has been incriminated in feed  
568 related outbreaks (22–25); however, it appears to be unstable (26) in cheese and is  
569 presumably degraded into PR imine (27). In this study, a large fraction of strains produced  
570 high PR toxin quantities. Several studies have demonstrated strong capabilities to produce PR  
571 toxin in semi-synthetic media (58, 63) with up to 77% of strains producing this metabolite.  
572 Eremefortins (EREM A and B) are known precursors involved in PR toxin biosynthesis and  
573 are not commonly searched for in food matrices. Contrasted results were observed and also  
574 raised the question of the genetic bases for only EREM B production.

575 In this study, no PAT or PENI A was detected (< DL) among all isolates included in the  
576 present study which is in accordance with previous literature data.

577 Regarding proteolysis, it has been described to be much more intense in blue cheeses in

578 comparison to other cheeses (8, 9, 69). This extensive proteolysis is mainly due to P.  
579 roqueforti (70). Numerous strains have already been described as highly proteolytic and  
580 activities can also vary significantly between strains (15–17). These findings are in agreement  
581 with the data obtained in this study highlighting the strain-dependent proteolytic potential of  
582 55 different P roqueforti isolates.

583 In conclusion, a large functional diversity was observed within populations 2 and 3 described  
584 in Gillot et al. (20) and to a lesser extent within population 1. Nevertheless, when taking into  
585 account only strains isolated from PDO/PGI blue cheeses, functional properties  
586 (concatenation of all informative variables), among isolates from the same population was  
587 much less variable. This result may indicate that, not surprisingly, cheesemakers selected  
588 within a single population, harboring a large functional diversity, strains sharing similar  
589 functional properties for elaborating cheeses with similar characteristics.

590

## 591 **Acknowledgements**

592 We would like to thank Valérie Gagnaire and Nicolas Pinon for assistance with proteolysis  
593 and retentate-based model cheese manufacture production, members from the Dairy Platform  
594 at UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, INRA, AGROCAMPUS OUEST,  
595 Rennes ([http://www6.rennes.inra.fr/plateforme\\_lait\\_eng](http://www6.rennes.inra.fr/plateforme_lait_eng)) for production of milk retentate and  
596 Florence Valence for valuable discussions. We are also grateful to Olivier Puel for providing  
597 us with the PR toxin standard and Océane Savary for technical assistance on mycotoxin  
598 extractions.

599

600

601

## 602 **Funding**

603 GG is funded by the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la  
604 Recherche (France) & the French Dairy Inter-branch Organization (CNIEL, France).

605

## 606 **References**

- 607 1. **Beresford TP, Fitzsimons NA, Brennan NL, Cogan TM.** 2001. Recent advances in cheese  
608 microbiology. *Int Dairy J* **11**:259–274.
- 609 2. **Salque M, Bogucki PI, Pyzel J, Sobkowiak-Tabaka I, Grygiel R, Szmyt M, Evershed RP.**  
610 2013. Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium BC in northern Europe. *Nature*  
611 **493**:522–525.
- 612 3. **Fox PF, McSweeney PLH.** 2004. Cheese: an overview, p. 1–18. In Fox, PF, McSweeney,  
613 PLH, Cogan, TM, Guinee, TP (eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 3rd ed. Elsevier  
614 Academic Press, London.
- 615 4. **Sandine WE, Elliker PR.** 1970. Microbially induced flavors and fermented foods. Flavor in  
616 fermented dairy products. *J Agric Food Chem* **18**:557–562.
- 617 5. **EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards).** 2013. Scientific opinion on  
618 the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013  
619 update). *EFSA J* **11(11)**:3449:106 pp.
- 620 6. **Cantor MD, van den Tempel T, Hansen TK, Ardö Y.** 2004. Blue cheese, p. 175–198. In  
621 Fox, PF, McSweeney, PLH, Cogan, TM, Guinee, TP (eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and*  
622 *Microbiology*, 3rd ed. Elsevier Academic Press, London.
- 623 7. **Abbas A, Dobson ADW.** 2011. Yeasts and Molds: *Penicillium roqueforti*, p. 772–775. In  
624 Fuquay, JW (ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2nd ed. Academic Press, San Diego.
- 625 8. **De Llano DG, Polo MC, Ramos M.** 1995. Study of proteolysis in artisanal cheeses: high  
626 performance liquid chromatography of peptides. *J Dairy Sci* **78**:1018–1024.
- 627 9. **Marcos A, Esteban MA, León F, Fernández-Salguero J.** 1979. Electrophoretic patterns of  
628 european cheeses: comparison and quantitation. *J Dairy Sci* **62**:892–900.
- 629 10. **Woo AH, Kollodge S, Lindsay RC.** 1984. Quantification of major free fatty acids in several  
630 cheese varieties. *J Dairy Sci* **67**:874–878.
- 631 11. **Menassa A, Lamberet G.** 1982. Contribution à l'étude du système lipolytique de *Penicillium*  
632 *roqueforti*. Caractères comparés de deux activités exocellulaires. *Le Lait* **62**:32–43.
- 633 12. **Mase T, Matsumiya Y, Matsuura A.** 1995. Purification and characterization of *Penicillium*  
634 *roqueforti* IAM 7268 lipase. *Biosci Biotechnol Biochem* **59**:329–330.

- 635 13. **Lamberet G, Menassa A.** 1983. Purification and properties of an acid lipase from *Penicillium*  
636 *roqueforti*. *J Dairy Res* **50**:459–468.
- 637 14. **Stepaniak L, Kornacki K, Grabska J, Rymaszewski J, Cichosz G.** 1980. Lipolytic and  
638 proteolytic activity of *Penicillium roqueforti*, *Penicillium candidum* and *Penicillium camemberti*  
639 strains. *Acta Aliment Pol* **6**:155–165.
- 640 15. **Larsen MD, Kristiansen KR, Hansen TK.** 1998. Characterization of the proteolytic activity  
641 of starter cultures of *Penicillium roqueforti* for production of blue veined cheeses. *Int J Food*  
642 *Microbiol* **43**:215–221.
- 643 16. **Farahat SM, Rabie AM, Farag AA.** 1990. Evaluation of the proteolytic and lipolytic activity  
644 of different *Penicillium roqueforti* strains. *Food Chem* **36**:169–180.
- 645 17. **Larsen MD, Jensen K.** 1999. The effects of environmental conditions on the lipolytic activity  
646 of strains of *Penicillium roqueforti*. *Int J Food Microbiol* **46**:159–166.
- 647 18. **Gallois A, Langlois D.** 1990. New results in the volatile odorous compounds of French  
648 cheeses. *Le Lait* **70**:89–106.
- 649 19. **Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, Hong S-B, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert**  
650 **KA, Varga J, Yaguchi T, Samson RA.** 2014. Identification and nomenclature of the genus  
651 *Penicillium*. *Stud Mycol* **78**:343–371.
- 652 20. **Gillot G, Jany J-L, Coton M, Le Floch G, Debaets S, Ropars J, López-Villavicencio M,**  
653 **Dupont J, Branca A, Giraud T, Coton E.** 2015. Insights into *Penicillium roqueforti* morphological  
654 and genetic diversity. *PLoS ONE* **10**:e0129849.
- 655 21. **Ropars J, López-Villavicencio M, Dupont J, Snirc A, Gillot G, Coton M, Jany J-L, Coton**  
656 **E, Giraud T.** 2014. Induction of sexual reproduction and genetic diversity in the cheese fungus  
657 *Penicillium roqueforti*. *Evol Appl* **7**:433–441.
- 658 22. **Le Bars J, Le Bars P.** 1989. Espèces fongiques des ensilages de maïs. Risques mycotoxiques.  
659 *Rec Med Vet* **165**:433–439.
- 660 23. **Scudamore KA, Livesey CT.** 1998. Occurrence and significance of mycotoxins in forage  
661 crops and silage: a review. *J Sci Food Agric* **77**:1–17.
- 662 24. **Still PE, Smalley EB, Strong FM, Wei R-D.** 1972. Mycotoxin from *Penicillium roqueforti*  
663 isolated from toxic cattle feed, p. 733. In *Federation Proceedings*.
- 664 25. **Veselý D, Veselá D, Adámková.** 1981. Occurrence of PR-toxin-producing *Penicillium*  
665 *roqueforti* in corn silage. *Vet Med (Praha)* **26**:109–115.
- 666 26. **Scott PM, Kanhere SR.** 1979. Instability of PR toxin in blue cheese. *J - Assoc Off Anal*  
667 *Chem* **62**:141–147.
- 668 27. **Siemens K, Zawistowski J.** 1993. Occurrence of PR Imine, a metabolite of *Penicillium*  
669 *roqueforti*, in blue cheese. *J Food Prot* **56**:317–325.
- 670 28. **Chang S-C, Cheng M-K, Wei Y-H.** 2004. Production of PR-imine, PR-acid, and PR-amide  
671 relative to the metabolism of PR toxin by *Penicillium roqueforti*. *Fungal Sci* **19**:39–45.



- 672 29. **Engel G, Milczewski KE von, Prokopek D, Teuber M.** 1982. Strain-specific synthesis of  
673 mycophenolic acid by *Penicillium roqueforti* in blue-veined cheese. *Appl Environ Microbiol* **43**:1034–  
674 1040.
- 675 30. **Fontaine K, Passeró E, Vallone L, Hymery N, Coton M, Jany J-L, Mounier J, Coton E.**  
676 2015. Occurrence of roquefortine C, mycophenolic acid and aflatoxin M1 mycotoxins in blue-veined  
677 cheeses. *Food Control* **47**:634–640.
- 678 31. **Kokkonen M, Jestoi M, Rizzo A.** 2005. Determination of selected mycotoxins in mould  
679 cheeses with liquid chromatography coupled to tandem with mass spectrometry. *Food Addit Contam*  
680 **22**:449–456.
- 681 32. **Lafont P, Siriwardana MG, Combemale I, Lafont J.** 1979. Mycophenolic acid in marketed  
682 cheeses. *Food Cosmet Toxicol* **17**:147–149.
- 683 33. **Usleber E, Dade M, Schneider E, Dietrich R, Bauer J, Märtilbauer E.** 2008. Enzyme  
684 immunoassay for mycophenolic acid in milk and cheese. *J Agric Food Chem* **56**:6857–6862.
- 685 34. **Scott PM, Kennedy BPC.** 1976. Analysis of blue cheese for roquefortine and other alkaloids  
686 from *Penicillium roqueforti*. *J Agric Food Chem* **24**:865–868.
- 687 35. **Finoli C, Vecchio A, Galli A, Dragoni I.** 2001. Roquefortine C occurrence in blue cheese. *J*  
688 *Food Prot* **64**:246–251.
- 689 36. **Fontaine K, Mounier J, Coton E, Hymery N.** 2015. Individual and combined effects of  
690 roquefortine C and mycophenolic acid on human monocytic and intestinal cells. *World Mycotoxin J*  
691 1–11.
- 692 37. **Rasmussen RR, Rasmussen PH, Larsen TO, Bladt TT, Binderup ML.** 2011. In vitro  
693 cytotoxicity of fungi spoiling maize silage. *Food Chem Toxicol* **49**:31–44.
- 694 38. **Frisvad JC, Filtenborg O.** 1983. Classification of terverticillate penicillia based on profiles  
695 of mycotoxins and other secondary metabolites. *Appl Environ Microbiol* **46**:1301–1310.
- 696 39. **Chang S-C, Lei W-Y, Tsai Y-C, Wei Y-H.** 1998. Isolation, purification, and characterization  
697 of the PR oxidase from *Penicillium roqueforti*. *Appl Environ Microbiol* **64**:5012–5015.
- 698 40. **Fontaine K, Hymery N, Lacroix MZ, Puel S, Puel O, Rigalma K, Gaydou V, Coton E,**  
699 **Mounier J.** 2015. Influence of intraspecific variability and abiotic factors on mycotoxin production in  
700 *Penicillium roqueforti*. *Int J Food Microbiol*.
- 701 41. **Pogačić T, Maillard M-B, Leclerc A, Hervé C, Chuat V, Yee AL, Valence F, Thierry A.**  
702 2015. A methodological approach to screen diverse cheese-related bacteria for their ability to produce  
703 aroma compounds. *Food Microbiol* **46**:145–153.
- 704 42. **ICH Harmonized Tripartite Guideline.** 2005. Validation of analytical procedures: text and  
705 methodology Q2(R1).
- 706 43. **Freedman RB, Radda GK.** 1968. The reaction of 2, 4, 6-trinitrobenzenesulphonic acid with  
707 amino acids, peptides and proteins. *Biochem J* **108**:383–391.
- 708 44. **Adler-Nissen J.** 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates

709 by trinitrobenzenesulfonic acid. *J Agric Food Chem* **27**:1256–1262.

710 45. **Dartey CK, Kinsella JE.** 1971. Rate of formation of methyl ketones during blue cheese  
711 ripening. *J Agric Food Chem* **19**:771–774.

712 46. **Day EA, Anderson DF.** 1965. Cheese flavor, gas chromatographic and mass spectral  
713 identification of neutral components of aroma fraction and blue cheese. *J Agric Food Chem* **13**:2–4.

714 47. **Gonzales De Llano D, Ramos M, Polo C, Sanz J, Martinez-Castro I.** 1990. Evolution of  
715 the volatile components of an artisanal blue cheese during ripening. *J Dairy Sci* **73**:1676–1683.

716 48. **Moio L, Piombino P, Addeo F.** 2000. Odour-impact compounds of Gorgonzola cheese. *J*  
717 *Dairy Res* **67**:273–285.

718 49. **De Frutos M, Sanz J, Martinez-Castro I.** 1991. Characterization of artisanal cheeses by GC  
719 and GC/MS analysis of their medium volatility (SDE) fraction. *J Agric Food Chem* **39**:524–530.

720 50. **Madkor S, Fox PF, Shalabi SI, Metwalli NH.** 1987. Studies on the ripening of stilton  
721 cheese: lipolysis. *Food Chem* **25**:93–109.

722 51. **Cronin DA, Ward MK.** 1971. The characterisation of some mushroom volatiles. *J Sci Food*  
723 *Agric* **22**:477–479.

724 52. **Mau Jen-L, Beelman Robert B, Ziegler Gregor R.** 1992. 1-octen-3-ol in the cultivated  
725 mushroom, *Agaricus bisporus*. *J Food Sci* **57**:704–706.

726 53. **Wallwey C, Li S-M.** 2011. Ergot alkaloids: structure diversity, biosynthetic gene clusters and  
727 functional proof of biosynthetic genes. *Nat Prod Rep* **28**:496–510.

728 54. **Rasmussen RR, Storm IMLD, Rasmussen PH, Smedsgaard J, Nielsen KF.** 2010. Multi-  
729 mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* **397**:765–776.

730 55. **Vinokurova NG, Boichenko LV, Arinbasarov MU.** 2003. Production of alkaloids by fungi  
731 of the genus *Penicillium* grown on wheat grain. *Appl Biochem Microbiol* **39**:403–406.

732 56. **Kozlovskii AG, Reshetilova TA, Medvedeva TN, Arinbasarov MU, Sakharovskii VG.**  
733 1979. Intracellular and extracellular alkaloids of *Penicillium roqueforti*. *Biokhimiia* **44**:1691–1700.

734 57. **Vinokurova NG, Boichenko DM, Baskunov BP, Zelenkova NF, Vepritskaya IG,**  
735 **Arinbasarov MU, Reshetilova TA.** 2001. Minor alkaloids of the fungus *Penicillium roquefortii*  
736 Thom 1906. *Appl Biochem Microbiol* **37**:184–187.

737 58. **O'Brien M, Nielsen KF, O'Kiely P, Forristal PD, Fuller HT, Frisvad JC.** 2006.  
738 Mycotoxins and other secondary metabolites produced in vitro by *Penicillium paneum* Frisvad and  
739 *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *J Agric Food Chem* **54**:9268–  
740 9276.

741 59. **Boysen M, Skouboe P, Frisvad J, Rossen L.** 1996. Reclassification of the *Penicillium*  
742 *roqueforti* group into three species on the basis of molecular genetic and biochemical profiles.  
743 *Microbiology* **142**:541–549.

744 60. **Geisen R, Cantor M., Hansen T., Holzapfel W., Jakobsen M.** 2001. Characterization of  
745 *Penicillium roqueforti* strains used as cheese starter cultures by RAPD typing. *Int J Food Microbiol*

- 746 **65**:183–191.
- 747 61. **Mansfield MA, Jones AD, Kuldau GA.** 2008. Contamination of fresh and ensiled maize by  
748 multiple *Penicillium* mycotoxins. *Phytopathology* **98**:330–336.
- 749 62. **Driehuis F, Spanjer MC, Scholten JM, te Giffel MC.** 2008. Occurrence of mycotoxins in  
750 feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes. *J Dairy Sci* **91**:4261–4271.
- 751 63. **Nielsen KF, Sumarah MW, Frisvad JC, Miller JD.** 2006. Production of metabolites from  
752 the *Penicillium roqueforti* complex. *J Agric Food Chem* **54**:3756–3763.
- 753 64. **Omura S, Inokoshi J, Uchida R, Shiomi K, Masuma R, Kawakubo T, Tanaka H, Iwai Y,**  
754 **Kosemura S, Yamamura S.** 1996. Andrastins A-C, new protein farnesyltransferase inhibitors  
755 produced by *Penicillium* sp. FO-3929. I. Producing strain, fermentation, isolation, and biological  
756 activities. *J Antibiot (Tokyo)* **49**:414–417.
- 757 65. **Uchida R, Shiomi K, Inokoshi J, Sunazuka T, Tanaka H, Iwai Y, Takayanagi H, Omura**  
758 **S.** 1996. Andrastins A-C, new protein farnesyltransferase inhibitors produced by *Penicillium* sp. FO-  
759 3929. II. Structure elucidation and biosynthesis. *J Antibiot (Tokyo)* **49**:418–424.
- 760 66. **Uchida R, Shiomi K, Inokoshi J, Tanaka H, Iwai Y, Omura S.** 1996. Andrastin D, novel  
761 protein farnesyltransferase inhibitor produced by *Penicillium* sp. FO-3929. *J Antibiot (Tokyo)*  
762 **49**:1278–1280.
- 763 67. **Nielsen KF, Dalsgaard PW, Smedsgaard J, Larsen TO.** 2005. Andrastins A–D, *Penicillium*  
764 *roqueforti* metabolites consistently produced in blue-mold-ripened cheese. *J Agric Food Chem*  
765 **53**:2908–2913.
- 766 68. **Fernández-Bodega MA, Mauriz E, Gómez A, Martín JF.** 2009. Proteolytic activity,  
767 mycotoxins and andrastin A in *Penicillium roqueforti* strains isolated from Cabrales, Valdeón and  
768 Bejes–Tresviso local varieties of blue-veined cheeses. *Int J Food Microbiol* **136**:18–25.
- 769 69. **Zarpoutis IV, McSweeney PLH, Fox PF.** 1997. Proteolysis in blue-veined cheese: an  
770 intervarietal study. *Ir J Agric Food Res* **36**:219–229.
- 771 70. **Coghill D.** 1979. The ripening of blue vein cheese: a review. *Aust J Dairy Technol* **34**:72–75.  
772

773 **Table 1.** Identified volatile compounds and corresponding retention index (RI), quantification ion (m/z), CAS number and chemical class.  
774

Chemical class	Compound <sup>a</sup> (abbreviated code or trivial name)	m/z	Identification <sup>b</sup>	RI <sup>c</sup>	CAS <sup>d</sup>	P value (n=172) <sup>e</sup>	P value (n=43) <sup>e</sup>
<b>Ketones</b>	propan-2-one (acetone)	58	RI,DB	811	67-64-1	0.028	0.504
	butan-2-one	43	S,RI,DB	895	78-93-3	***	***
	pentan-2-one	58	RI,DB	961	107-87-9	**	0.036
	butane-2,3-dione (diacetyl)	86	S,RI,DB	970	431-03-8	***	0.017
	2-methylpentan-3-one	100	RI,DB	992	565-69-5	0.074	***
	4-methylpentan-2-one	100	S,RI,DB	1000	108-10-1	***	**
	heptan-2-one	58	S,RI,DB	1178	110-43-0	***	0.070
	6-methylheptan-2-one	110	RI,DB	1228	928-68-7	***	***
	octan-3-one	99	RI,DB	1245	106-68-3	**	**
	3-hydroxybutan-2-one (acetoin)	45	S,RI,DB	1274	513-86-0	***	0.042
	2-hydroxypentan-3-one	102	RI,DB	1348	5704-20-1	***	0.402
	nonan-2-one	57	RI,DB	1378	821-55-6	***	0.071
	non-8-en-2-one	82	RI,DB	1433	5009-32-5	***	0.067
	decan-2-one	59	RI,DB	1473	693-54-9	0.044	0.450
	undecan-2-one	58	RI,DB	1588	112-12-9	***	0.284
1-(2-aminophenyl)ethanone	120	DB	N/A	551-93-9	***	0.300	
<b>Acids</b>	acetic acid (C2)	60	S,RI,DB	1451	64-19-7	***	0.056
	propanoic acid (C3)	74	S,RI,DB	1535	79-09-4	***	***
	2-methylpropanoic acid (iC4)	73	S,RI,DB	1563	79-31-2	***	***
	butanoic acid (C4)	60	S,RI,DB	1624	107-92-6	*	*
	3-methylbutanoic acid (iC5)	43	S,RI,DB	1664	503-74-2	***	**
	4-methylpentanoic acid (iC6)	74	S,RI,DB	1796	646-07-1	0.294	0.678
	hexanoic acid (C6)	60	S,DB	N/A	142-62-1	0.074	0.064
octanoic acid (C8)	84	S,DB	N/A	124-07-2	0.503	0.185	
<b>Sulfurs</b>	methanethiol	48	RI,DB	679	74-93-1	0.013	0.047
	methylsulfanylmethane (DMS: dimethyl sulfide)	35	RI,DB	743	75-18-3	*	0.014
	(methyldisulfanyl)methane (DMDS: dimethyl disulfide)	94	S,RI,DB	1065	624-92-0	0.416	0.058

	S-methyl butanethioate	118	RI,DB	1133	2432-51-1	0.513	0.062
	(methyltrisulfanyl)methane (DMTS: dimethyl trisulfide)	126	RI,DB	1361	3658-80-8	0.303	0.259
	(methyldisulfanyl)-methylsulfanylmethane	140	RI,DB	1648	42474-44-2	0.538	0.544
	methylsulfonylmethane	94	DB	N/A	67-71-0	0.011	0.023
<b>Alcohols</b>	butan-2-ol	59	S,RI,DB	1021	78-92-2	***	***
	2-methylpropan-1-ol	43	S,RI,DB	1105	78-83-1	0.128	0.042
	3-methylbutan-1-ol	55	S,RI,DB	1206	123-51-3	***	0.050
	oct-1-en-3-ol	57	RI,DB	1447	3391-86-4	***	**
	nonan-2-ol	83	RI,DB	1518	628-99-9	**	0.068
	2-phenylethanol	92	DB	N/A	60-12-8	***	0.104
<b>Aldehydes</b>	butanal	55	S,RI,DB	901	123-72-8	*	0.010
	3-methylbutanal	58	S,RI,DB	908	590-86-3	**	*
	3-methylbut-2-enal	84	RI,DB	1191	107-86-8	***	0.059
	benzaldehyde	106	S,RI,DB	1511	100-52-7	0.082	***
	2-phenylacetaldehyde	92	S,RI,DB	1634	122-78-1	***	0.048
<b>Pyrazines</b>	2-methylpyrazine	94	RI,DB	1234	109-08-0	***	***
	2,5-dimethylpyrazine	42	S,RI,DB	1305	123-32-0	***	***
	2,3,5-trimethylpyrazine	122	RI,DB	1387	14667-55-1	***	**
	2,3-dimethyl-5-[(E)-prop-1-enyl]pyrazine	148	DB	1604	55138-76-6	*	0.039
<b>Alkanes</b>	octane	85	S,RI,DB	800	111-65-9	***	***
	dodecane	98	S,RI,DB	1200	112-40-3	***	0.024
<b>Esters</b>	methyl 3-methylbut-2-enoate	83	RI,DB	1166	924-50-5	***	***
<b>Lactones</b>	4-methyl-2,3-dihydropyran-6-one	54	DB	N/A	2381-87-5	***	*
<b>Phenols</b>	4-methylphenol (p-cresol)	107	DB	N/A	106-44-5	***	0.011
<b>Terpenes</b>	7-methyl-3-methylideneocta-1,6-diene ( $\beta$ -myrcene)	93	RI,DB	1133	123-35-3	***	***

775

<sup>a</sup> name according to IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) nomenclature;

776

<sup>b</sup> Compounds identified on the basis of: S, retention time and mass spectrum from standard; RI, retention index; DB, mass spectral data Library NIST;

777

<sup>c</sup> RI, Kovats retention index; N/A, not applicable

778

<sup>d</sup> CAS (Chemical Abstracts Service) registry number

779

<sup>e</sup> P value of ANOVA: \*\*\*P < 0.0001, \*\*P < 0.001, \*P < 0.01. ANOVA performed using 172 samples or only the 43 samples in relation to PDO/PGI isolates.

780 **Table 2.** Targeted metabolite concentrations (ng/g/cm<sup>2</sup> mycelium) in YES medium after 7-  
 781 day culture at 25°C.  
 782

	(ISO)FUMI A	EREM B	ROQ C	EREM A	PR toxin	MPA	AND A
Number of positive samples <sup>a</sup>	52 (43)	30 (22)	53 (53)	15 (5)	48 (32)	46 (23)	54 (54)
Range	8-241	5-58	18-237	5-25	3-330	4-57	17-220
Mean ± SD <sup>b</sup>	57 ± 47	15 ± 11	81 ± 39	11 ± 7	59 ± 88	16 ± 13	62 ± 41
1st quartile	25	9	58	7	7	7	34
Median	40	13	66	8	12	13	56
3rd quartile	70	17	97	9	65	21	81

783 <sup>a</sup> Number of positive samples with a concentration above Detection Limit (above Quantification Limit).

784 <sup>b</sup> Mean levels ± Standard Deviation (SD) of metabolite contents in positive samples above Quantification Limit

785

786 **Figure legends**

787 **Fig. 1.** Individual factor map (A) and variable factor map (B) of principal component analysis  
788 on 38 volatile compounds produced in cultures of 55 *Penicillium roqueforti* isolates grown in  
789 a model cheese incubated for 14 days at 25 °C in the dark. Colors correspond to three  
790 previously described genetically differentiated populations (1, 2 and 3) (20). “C” (black dots)  
791 are non-inoculated control media incubated under the same conditions. The volatiles poorly  
792 represented on plot (B) are not shown ( $\cos^2 < 0.2$ ). Variable names are listed in Table 1.

793

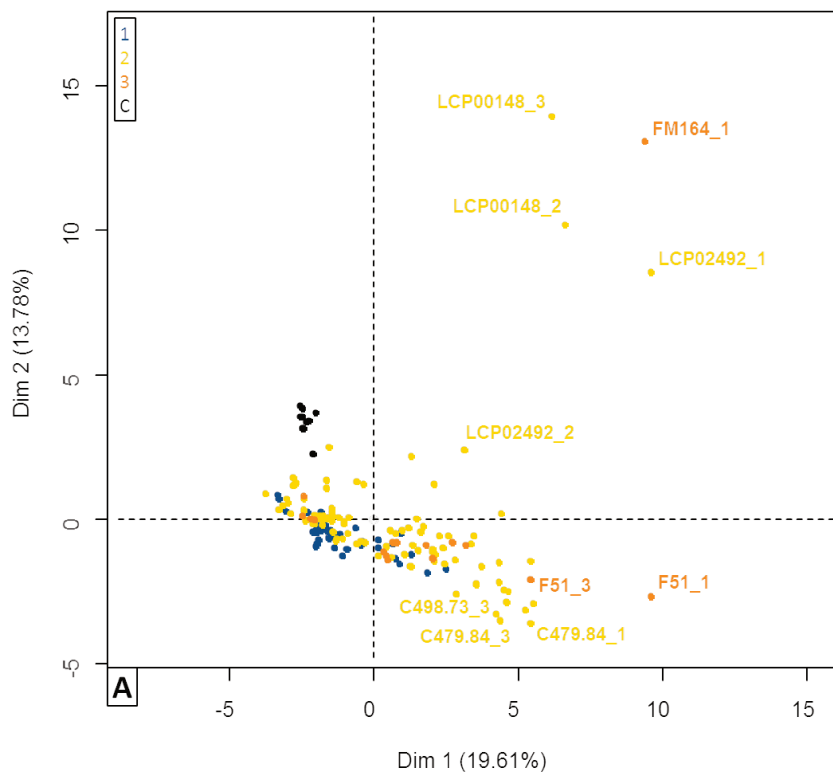
794 **Fig. 2.** Equivalent glycine concentrations (mM) revealing proteolytic activity levels of the  
795 *Penicillium roqueforti* isolates cultured on cheese models for 14 days at 25°C in the dark and  
796 determined using TNBS methodology targeting NH<sub>2</sub> free amino groups from matrix. Error  
797 bars represent standard deviations.

798

799 **Fig. 3.** Individual factor map (A) and variable factor map (B) of principal component analysis  
800 on 20 volatile compounds, 1 proteolysis index and 7 mycotoxins concentrations in cultures of  
801 15 *Penicillium roqueforti* cultures. Colors correspond to three previously described  
802 genetically differentiated populations (1, 2 and 3) (8). The volatiles poorly represented on plot  
803 (B) are not shown ( $\cos^2 < 0.3$ ). Variable names are listed in Table 1 and 2.

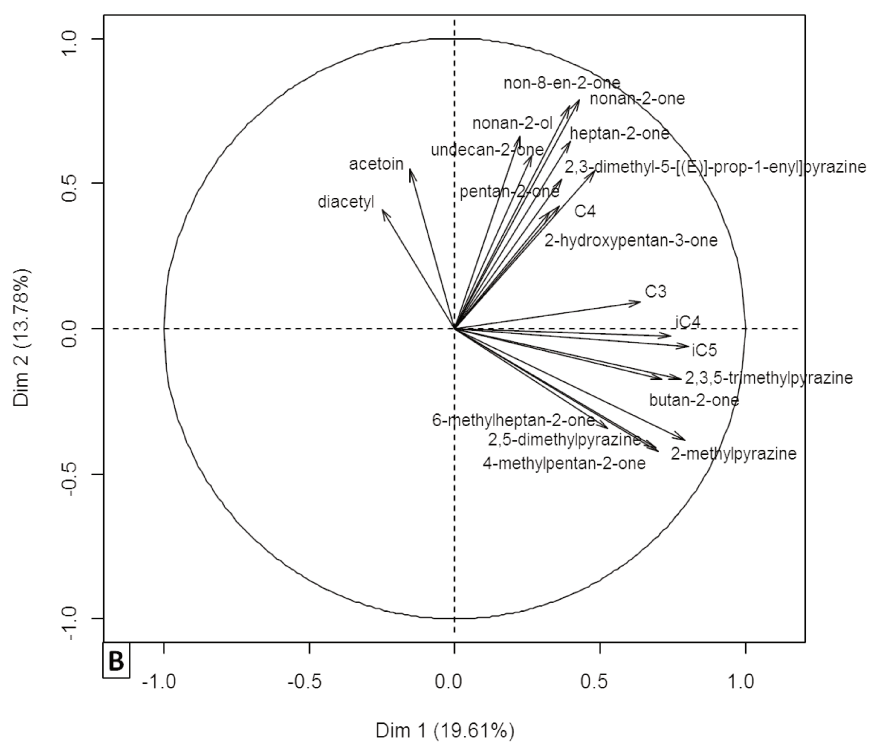
804

Individuals factor map (PCA)



805

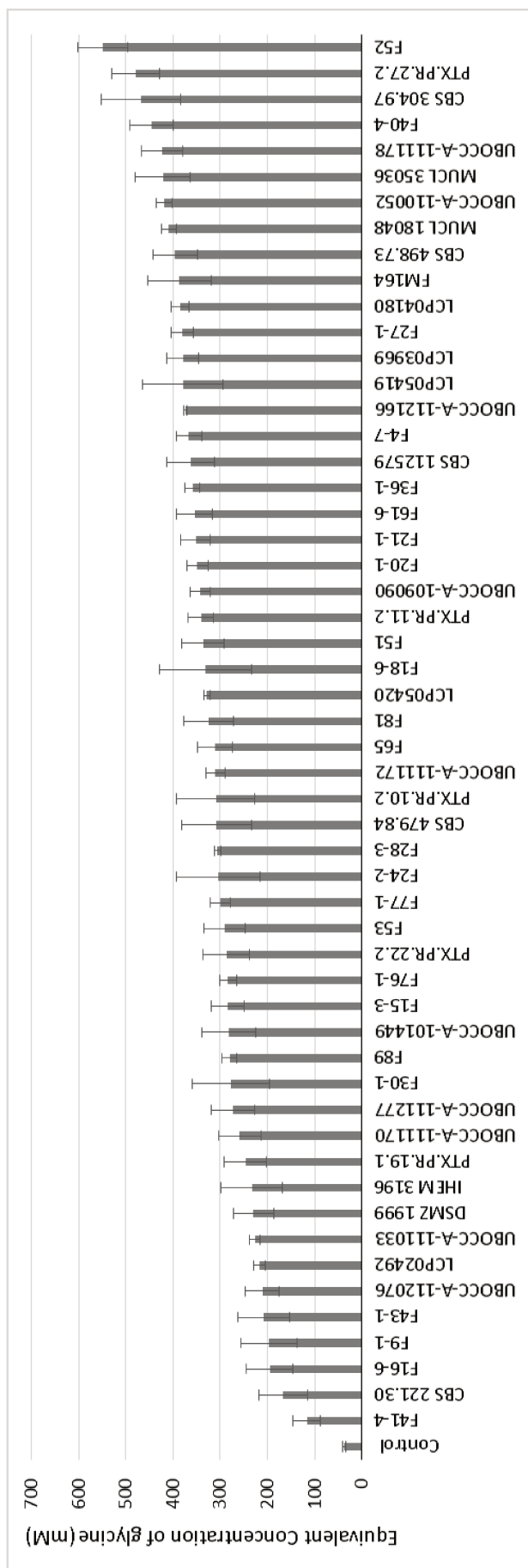
Variables factor map (PCA)



806

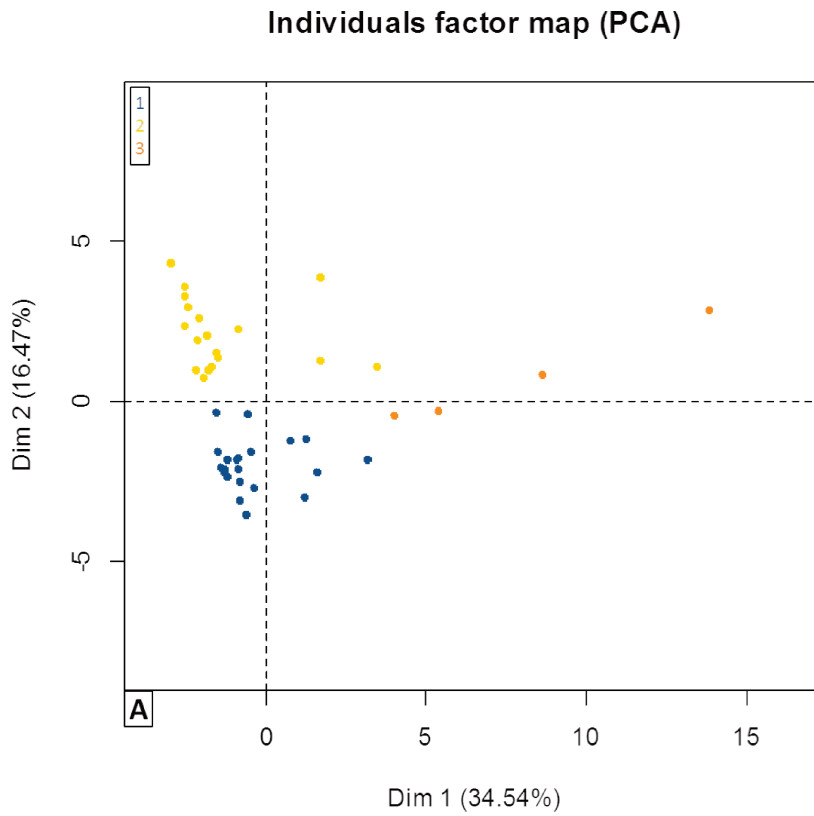
807 **Fig. 1**



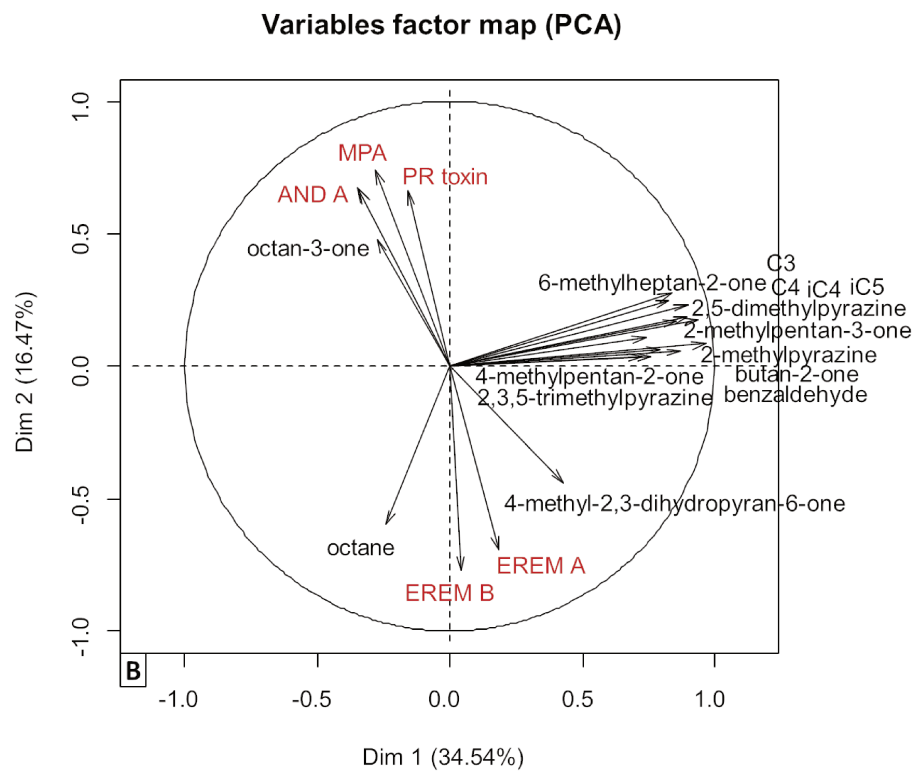


810 Fig. 2.

811



812



813

814 **Fig. 3**

**Table S1.** *Penicillium roqueforti* isolates included in the present study and their origin.

Isolate number	Substrate	Cheese designation (if PDO or PGI*)	Origin	Other isolate number
F4-7	Cheese	Blue cheese	Canada	
F9-1	Cheese	Fourme d'Ambert	France	
F15-3	Cheese	Blue cheese	Brazil	
F16-6	Cheese	Blue cheese	Spain	
F18-6	Cheese	Blue cheese	Spain	
F20-1	Cheese	Cabrales	Spain	UBOCC-A-113019
F21-1	Cheese	Gamonéu	Spain	
F24-2	Cheese	Blue cheese	Netherlands	
F27-1	Cheese	Blue cheese	USA	UBOCC-A-113007
F28-3	Cheese	Blue cheese	Latvia	UBOCC-A-113008
F30-1	Cheese	Blue cheese	Poland	
F36-1	Cheese	Blue cheese	Germany	
F40-4	Cheese	Bleu des Causses	France	
F41-4	Cheese	Bleu d'Auvergne	France	
F43-1	Cheese	Roquefort	France	UBOCC-A-113020
PTX.PR.10.2	Cheese	Blue cheese	Ireland	
PTX.PR.11.2	Cheese	Roquefort	France	
PTX.PR.19.1	Cheese	Blue cheese	France	
PTX.PR.22.2	Cheese	Bleu de Gex Haut-Jura	France	
PTX.PR.27.2	Cheese	Bleu des Causses	France	
FM164	Cheese	Gorgonzola	Italy	UBOCC-A-113014
UBOCC-A-101449	Fruit (Preparation)		Unknown	
CBS 221.30 <sup>NT</sup>	Cheese	Roquefort	USA	ATCC 10110; ATCC 1129; CECT 2905; IBT 6754; IFO 5459; IMI 024313; LSHB; UBOCC-A-108110
UBOCC-A-109090	Apricot (Preparation)		Unknown	
UBOCC-A-110052	Olive brine		Unknown	
UBOCC-A-111033	Corn silage		France	
UBOCC-A-111170	Surface (Dairy industry)		France	
UBOCC-A-111172	Air (Dairy industry)		France	
UBOCC-A-111178	Air (Dairy industry)		France	

UBOCC-A-111277	Pitted prunes		France	
UBOCC-A-112076	Brioche		France	
IHEM 3196	Human sputum		Belgium	UBOCC-A-113004
MUCL 18048	Cork		Belgium	UBOCC-A-112178
CBS 498.73	Apple		Russia	ATCC 24720; FRR 1480; IMI 174718; IMI 291199; MUCL 34883; UBOCC-A-112176
MUCL 35036	Wood in process of drying in the open air (Quercus sp.)		France	UBOCC-A-112177
CBS 112579	Sulphite liquor		Canada	IBT 16407;NRRL 1165; UBOCC-A-113001
CBS 304.97	Cheese	Mozzarella	Denmark	IBT 12.093; UBOCC-A-113002
CBS 479.84	Mouldy baker's yeast		Denmark	IBT 21543; UBOCC-A-113003
DSMZ 1999	Beef meat		Switzerland	UBOCC-A-112179
UBOCC-A-112166	Mouldy rye bread		France	
F65	Cheese	Blue cheese	Argentina	
F51	Cheese	Bleu du Vercors - Sassenage	France	
F52	Cheese	Blue cheese	New-Zealand	
F53	Cheese	Blue cheese	New-Zealand	
F61-6	Cheese	Blue cheese	Switzerland	UBOCC-A-115001
F76-1	Cheese	Blue cheese	Finland	
F77-1	Cheese	Blue Stilton	United-Kingdom	
F81	Cheese	Jihoceska Niva	Czech Republic	
F89	Cheese	Danablu	Denmark	
LCP00148	Brewery atmosphere		Unknown	
LCP02492	Unknown		Unknown	
LCP05419	Fridge inner wall		France	
LCP03969	Fruit compote		France	
LCP04180	Strawberry sorbet		France	
LCP05420	Fridge inner wall		France	

816  
817

\* Protected Designation of Origin (PDO) or Protected Geographical Indication (PGI)

818 **Table S2.** Method performance characteristics for metabolite quantification in YES medium.

Compound	RT	Quantifier Ion (Q1) (m/z)	Qualifier Ion (Q2) (m/z)	R <sup>2</sup>	DL (ng.g <sup>-1</sup> )	QL (ng.g <sup>-1</sup> )	ESI
PAT	0.688	153.0193	N/A	0.999	6405.01	19409.12	-
(ISO)FUMI A	1.686	299.1751	N/A	0.991	108.06	327.46	+
EREM B	11.209	249.1484	271.1252	0.997	73.55	222.88	+
ROQ C	14.695	390.1928	N/A	0.995	38.62	117.03	+
EREM A	15.753	307.1561	329.1358	0.997	77.80	235.77	+
PR toxin	17.029	321.1332	343.1148	0.996	42.89	129.97	+
MPA	17.465	321.1334	303.1231	0.999	44.37	134.44	+
AND A	22.262	485.2541	N/A	0.999	31.04	94.06	-
PEN A	27.242	632.2781	N/A	0.999	12.34	37.41	-

819 RT: Retention Time; R<sup>2</sup>: correlation coefficient; DL: Detection Limit; QL: Quantification Limit; ESI:  
820 Electrospray Ionization; NA: not applicable

821

822 **Table S3.** Targeted metabolite concentrations (ng/g/cm<sup>2</sup> mycelium) in YES medium after 7-  
823 day culture at 25°C for each screened isolate.  
824

Isolates	(ISO)FUMI A	EREM B	ROQ C	EREM A	PR toxin	MPA	AND A
CBS 112579	42	16	100	< DL	104	5	62
CBS 221.30	111	< DL	83	< DL	12	10	112
CBS 304.97	< DL	5	64	5	273	4	92
CBS 479.84	140	13	59	< QL	330	< DL	80
CBS 498.73	41	< DL	88	< DL	11	15	63
DSMZ 1999	< DL	< QL	18	< DL	10	< QL	20
F15-3	29	14	47	< DL	< QL	< QL	18
F16-6	< QL	< DL	61	< DL	< QL	14	87
F18-6	35	< DL	39	< DL	< DL	< QL	35
F20-1	44	17	149	< QL	6	< QL	44
F21-1	30	15	138	< QL	4	< QL	38
F24-2	22	7	113	< DL	< QL	< QL	28
F27-1	< QL	< DL	42	< DL	< DL	< QL	32
F28-3	< QL	< QL	64	< DL	< QL	< QL	35
F30-1	< QL	< QL	56	< DL	< QL	< QL	34
F36-1	64	58	60	25	25	< QL	26
F40-4	< QL	< DL	73	< DL	< QL	13	97
F41-4	58	< DL	63	< DL	12	9	63
F43-1	35	< DL	60	< DL	< QL	6	58
F4-7	54	< DL	92	< DL	9	24	79
F51	< QL	18	47	< QL	7	< QL	26
F52	13	< DL	57	< DL	< DL	< QL	48
F53	25	12	75	< DL	< QL	< QL	19
F61-6	21	< QL	72	< QL	< QL	< QL	40
F65	241	< DL	101	< DL	51	57	185
F76-1	23	17	129	< QL	5	< QL	40
F77-1	8	10	60	< QL	4	< QL	19
F81	20	14	146	< QL	4	< QL	40
F89	40	24	64	< QL	5	< DL	26
F9-1	33	< QL	52	< DL	< QL	< DL	21
FM164	< QL	9	65	< QL	7	< DL	36
IHEM3196	61	21	108	9	8	< QL	43
LCP00148	101	9	<LD	< DL	70	18	86
LCP02492	127	9	<LD	< DL	178	25	77
LCP03969	133	< DL	58	< DL	4	24	143
LCP05419	125	< QL	237	< DL	283	< QL	220
LCP05420	23	< DL	61	< DL	< QL	< DL	56
LPC04180	80	< DL	40	< DL	3	15	95
MUCL 18048	25	< DL	153	< DL	37	< DL	97
MUCL 35036	< DL	< QL	52	< DL	41	32	63
PTX.PR.10.2	17	< DL	70	< DL	< QL	4	66
PTX.PR.11.2	40	< DL	66	< DL	< DL	< QL	56

PTX.PR.19.1	16	< QL	30	< DL	< DL	< DL	17
PTX.PR.22.2	38	12	58	< DL	< QL	< DL	26
PTX.PR.27.2	< QL	< DL	64	< DL	< QL	9	43
UBOCC-A-101449	16	< DL	36	< DL	< DL	< DL	38
UBOCC-A-109090	83	< DL	91	< DL	31	8	103
UBOCC-A-110052	155	< DL	122	< DL	64	43	< DL
UBOCC-A-111033	< QL	< DL	144	< DL	8	19	65
UBOCC-A-111170	35	8	97	7	159	< QL	81
UBOCC-A-111172	53	< DL	151	< DL	27	13	119
UBOCC-A-111178	35	8	68	8	84	< QL	100
UBOCC-A-111277	39	10	66	< DL	< QL	< QL	29
UBOCC-A-112076	69	< DL	79	< DL	< QL	6	81
UBOCC-A-112166	71	< DL	82	< DL	< DL	5	68

825

Les faits marquants de cette étude sont les suivants :

- Mise au point d'une méthode de détection et quantification de 9 métabolites secondaires (incluant des mycotoxines) par LC-MS/Q-TOF
- Détection et identification de 52 molécules volatiles par HS-Trap GC-MS, les méthyls-cétones étant majoritaires
- Mise en évidence d'activités protéolytiques contrastées entre les différentes souches étudiées
- Mise en évidence d'une corrélation entre les propriétés fonctionnelles des souches de *P. roqueforti* et leur utilisation technologique pour la fabrication des fromages à pâte persillée possédant une AOP ou une IGP
- Confirmation de l'absence de production de patuline et de pénitrème A par des souches de *P. roqueforti*
- Confirmation du caractère souche-dépendant de la production d'acide mycophénolique





# Chapitre 3

Bases génétiques de la production de l'acide  
mycophénolique et de son caractère souche-dépendant  
chez *Penicillium roqueforti*

-

Genetic basis for mycophenolic acid production and  
strain-dependent production variability in *Penicillium*  
*roqueforti*

Guillaume Gillot, Jean-Luc Jany, Rebeca D. Santos, Elisabeth Poirier, Pedro I. Hidalgo, Ricardo V. Ullán, Emmanuel Coton, Monika Coton. Genetic basis for mycophenolic acid production and strain-dependent production variability in *Penicillium roqueforti* (A soumettre au journal *Applied Microbiology and Biotechnology*).



Le dernier volet de cette thèse s'inscrit dans la continuité des travaux présentés précédemment concernant le potentiel fonctionnel des isolats de *P. roqueforti* en s'intéressant plus particulièrement à la production de mycotoxines. Comme évoqué au cours de la synthèse bibliographique, à ce jour, seuls trois métabolites secondaires produits par des souches de *P. roqueforti* sont identifiés comme des mycotoxines (Frisvad et al., 2004). Il s'agit de la PR toxine, de l'acide mycophénolique et de la roquefortine C.

Concernant la PR toxine, elle a été décrite comme instable dans les fromages. En effet, selon les conditions, la PR toxine peut être dégradée en PR imine, PR amide (érémofofortine E) (Chang et al., 1993) ou PR acide (Chang et al., 1996). Cette dégradation potentielle explique sa non-détection au niveau des matrices fromagères. Des travaux visant à caractériser la voie de biosynthèse de la PR toxine chez *P. roqueforti* ont été engagés dans notre laboratoire en lien avec le laboratoire INBIOTEC de León en Espagne.

De précédentes études s'intéressant à la roquefortine C ont, elles, permis de mettre en évidence que cette mycotoxine était presque toujours produite en quantités détectables au sein de bleus mais également d'autres substrats (Finoli et al., 2001; Fontaine et al., 2015b; Kokkonen et al., 2005; O'Brien et al., 2006; Scott and Kennedy, 1976) et ce quelles que soient les souches de *P. roqueforti*. De même, qu'elles concernent directement *P. roqueforti* ou d'autres espèces du genre *Penicillium*, plusieurs études avaient déjà été publiées ou étaient en cours (collaboration avec l'Universidad de León et INBIOTEC, León, Espagne) concernant la caractérisation de la voie de biosynthèse de la roquefortine C (Ali et al., 2013; García-Estrada et al., 2011; Kosalková et al., 2015; Ries et al., 2013a).

Concernant l'acide mycophénolique, de précédentes études avaient mis en évidence que, contrairement à la roquefortine C, la production en quantités détectables d'acide mycophénolique n'était pas systématique que ce soit au sein des fromages (Fontaine et al., 2015b; Usleber et al., 2008) ou sur milieux semi-synthétiques (Boysen et al., 1996; Fontaine et al., 2015a; Geisen et al., 2001). En effet, Boysen et al. (1996) et Geisen et al. (2001) avaient par exemple mis en évidence que respectivement 50 % et 55 % des souches testées n'étaient pas capables de produire de l'acide mycophénolique sur milieux de culture, tout du moins en quantités détectables. Ainsi, ces observations et le fait qu'aucune étude ne s'était, à notre connaissance, auparavant intéressée à la voie de biosynthèse de l'acide mycophénolique chez *P. roqueforti* nous a amené à étudier cette dernière.

Pour cela, le génome de *P. roqueforti* récemment séquencé (Cheeseman et al., 2014) auquel nous avons accès, grâce à une collaboration avec le Pr. Joëlle Dupont du Muséum National d'Histoire Naturelle (UMR 7205 - Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité, Equipe

Diversité, Évolution végétale et Fongique) et le Dr. Tatiana Giraud de l'Université Paris-Sud XI (UMR 8079 - Ecologie, Systématique et Evolution), a été investigué. Les gènes précédemment décrits chez *P. brevicompactum* (Hansen et al., 2012; Regueira et al., 2011) comme impliqués dans la voie de biosynthèse de l'acide mycophénolique ont tout d'abord été recherchés au sein du génome de *P. roqueforti*. Par la suite, une souche caractérisée comme productrice d'acide mycophénolique a été sélectionnée et, en collaboration avec l'Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC, León, Espagne), des expériences d'ARN interférence ont été réalisées sur le gène *mpaC* codant putativement une polycétyde synthase intervenant au tout début de la voie de biosynthèse, et ce afin de confirmer l'implication du cluster dans la production d'acide mycophénolique. L'efficacité de la réduction a été vérifiée, d'une part, par dosage du métabolite final (MPA) par LC-MS/Q-TOF et, d'autre part, par quantification des messagers du gène *mpaC* par RT-qPCR. Enfin, nous avons exploré les bases génétiques pouvant expliquer les différences de production d'acide mycophénolique souche-dépendantes observées précédemment.

1 **Genetic basis for mycophenolic acid production and strain-**  
2 **dependent production variability in *Penicillium roqueforti***

3  
4 Guillaume Gillot<sup>1</sup>, Jean-Luc Jany<sup>1</sup>, Rebeca D. Santos<sup>2,3</sup>, Elisabeth Poirier<sup>1</sup>, Pedro I. Hidalgo<sup>1</sup>, Ricardo  
5 V. Ullán<sup>3</sup>, Emmanuel Coton<sup>1</sup>, Monika Coton<sup>1\*</sup>.

6  
7 <sup>1</sup> *Université de Brest, EA 3882 Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne,*  
8 *ESIAB, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France*

9 <sup>2</sup> *Área de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad de León, 24071*  
10 *León, Spain*

11 <sup>3</sup> *Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC), Avenida Real n°1, Parque Científico de León,*  
12 *24006 León, Spain*

13  
14 **Keywords:** mycotoxins, mycophenolic acid, gene silencing, *Penicillium roqueforti*

15  
16 **\*Corresponding author:** Monika Coton

17 *Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne,*

18 *Parvis Blaise-Pascal, Technopôle Brest-Iroise*

19 *29280 Plouzané, France*

20 *Tel: +33 (0)2.90.91.51.55*

21 *Fax: +33 (0)2.90.91.51.01*

22 *E-mail: [monika.coton@univ-brest.fr](mailto:monika.coton@univ-brest.fr).*

23  
24 **Running title:** *P. roqueforti* mycophenolic acid pathway

25

26 **Abstract**

27 Mycophenolic acid (MPA) is a mycotoxin produced by various *Penicillium* species including  
28 *Penicillium roqueforti*. The MPA biosynthetic pathway gene cluster was recently described in  
29 *Penicillium brevicompactum*. In the present study, an *in silico* analysis of the recently  
30 available *P. roqueforti* FM164 genome sequence allowed, for the first time, to localize a 23.5-  
31 kb putative MPA gene cluster. The cluster is composed of seven genes putatively coding for  
32 seven proteins (MpaA, MpaB, MpaC, MpaDE, MpaF, MpaG, MpaH) in *P. roqueforti* and is  
33 highly similar in terms of gene synteny and sequence homology to the cluster described in *P.*  
34 *brevicompactum*. The cluster contains, in particular, the *mpaC* gene encoding for a putative  
35 polyketide synthase. In order to confirm the involvement of this gene cluster in MPA  
36 biosynthesis, a gene silencing approach, using RNA interference targeting *mpaC*, was  
37 performed in a high MPA-producing *P. roqueforti* strain F43-1. Transformants exhibited  
38 contrasted *mpaC* gene expression and MPA production. In parallel, mycotoxin quantification  
39 on multiple *P. roqueforti* strains in our collection suggested strain-dependent MPA-  
40 production. The entire MPA gene cluster was sequenced for *P. roqueforti* strains with  
41 contrasted MPA production and a 174 bp deletion in *mpaC* was observed in low MPA-  
42 producers. PCRs directed towards the identified deleted region among 55 strains showed an  
43 excellent correlation with MPA quantification indicating the clear involvement of *mpaC* gene  
44 in MPA biosynthesis as well as the full functionality of the 7-gene MPA biosynthesis cluster  
45 in *P. roqueforti*. The developed molecular tools could be useful for *P. roqueforti* ripening  
46 culture selection.

47

## 48 **1. Introduction**

49 *Penicillium roqueforti*, a saprophytic fungus commonly found in nature (Abbas and Dobson  
50 2011), is well-known as a starter culture for blue-veined cheeses such as Roquefort,  
51 Gorgonzola, Stilton and Danablu. The typical blue-veined appearance and distinct flavor of  
52 blue cheeses is due to *P. roqueforti* growth, sporulation and metabolism in the cheese  
53 openings and core (Cantor et al. 2004). However, this species is also a common spoilage  
54 organism in various foods and feeds (Pitt & Hocking 2009). *P. roqueforti* is, for example, not  
55 only the main spoiler in silage for animal feed (Boysen et al. 2000; Storm et al. 2010) but also  
56 a common cheese spoiler and has already been isolated among other sources from barley, rice,  
57 flour, baked goods, refrigerated dough products, meat and meat products (Pitt & Hocking  
58 2009). This species is also known, under certain environmental conditions, to potentially  
59 produce secondary metabolites including mycotoxins that may have toxicological effects on  
60 animal or human health if present in foodstuffs or animal feed. In particular, PR toxin,  
61 mycophenolic acid (MPA) and roquefortine C (ROQ C) have been described to be produced  
62 by this species (Frisvad et al. 2004; Nielsen et al. 2006; O'Brien et al. 2006; Hidalgo et al,  
63 2014; Martin and Coton, 2015). However, only few *P. roqueforti* related toxicology studies  
64 (Hymery et al. 2014; Fontaine et al. 2015b) and mycotoxin related outbreaks such as PR toxin  
65 contamination in animal feed (Still et al. 1972; Veselý et al. 1981; Le Bars and Le Bars 1989;  
66 Scudamore and Livesey 1998) have been reported. Noteworthy, a recent study indicated that  
67 both MPA and ROQ C were less cytotoxic in acute exposure than regulated mycotoxins like  
68 aflatoxins (Fontaine et al. 2015b). As for PR-toxin, while it is considered to be the most toxic  
69 metabolite produced by *P. roqueforti* (Arnold et al. 1978), it was shown to be unstable in blue  
70 cheese due to the presence of amino compounds and microaerophilic conditions (Scott and  
71 Kanhere 1979) and, to this date, no intoxication cases associated with blue-veined cheese



72 consumption has ever been reported. Concerning the genetic basis of mycotoxin production,  
73 if PR toxin and ROQ C biosynthesis have been recently studied in *P. roqueforti* (Hidalgo et  
74 al. 2014; Kosalková et al. 2015, respectively), the MPA biosynthesis pathway has not yet been  
75 identified in this fungal species.

76 First described and characterized in 1893 as having antibiotic properties (Bentley 2000;  
77 Martín and Coton 2015), MPA is a fungal secondary metabolite related to *Penicillium* spp.  
78 genera which consists of an acetate-derived phthalide nucleus and a terpene-derived side  
79 chain (Birch et al. 1957). Since 1893, antiviral, antifungal (Nicoletti et al. 2004), antibacterial  
80 (Kavanagh 1947; Torrenegra et al. 2005), antitumor (Tressler et al. 1994) and antipsoriasis  
81 (Epinette et al. 1987) activities have been assigned to MPA but it is particularly known to be  
82 used as an immunosuppressant in kidney, heart and liver transplantations. Indeed,  
83 mycophenolate reduces B and T lymphocyte production via IMP dehydrogenase (IMPDH)  
84 inhibition (Bentley 2000). Numerous studies investigated MPA biosynthesis from a chemical  
85 point of view and several metabolic intermediates of the biosynthetic pathway have been  
86 proposed (Birkinshaw et al. 1948; Birch et al. 1957; Birch et al. 1958; Canonica et al. 1972;  
87 Muth and Nash 1975; Colombo et al. 1982). Recently, Regueira et al. (2011) identified and  
88 characterized a 25-kb MPA biosynthetic cluster in *P. brevicompactum* (IBT23078 strain).  
89 Moreover, these authors completely abolished MPA and MPA intermediate production by  
90 deleting the polyketide synthase (PKS) gene *mpaC* (Regueira et al. 2011). Thereafter, Hansen  
91 et al. (2012) made a clarification regarding gene composition of the previously described  
92 MPA gene cluster in the IBT23078 *Penicillium brevicompactum* strain explaining it was  
93 composed of seven putative genes (namely, *mpaA*, *mpaB*, *mpaC*, *mpaDE*, *mpaF*, *mpaG*,  
94 *mpaH*). Indeed, Regueira et al. (2011) have been previously described *mpaDE* gene as two  
95 single genes, *mpaD* and *mpaE*. More recently, Zhang et al. (2015) confirmed Hansen et al.

96 (2012) results observing the same gene synteny regarding the MPA gene cluster in the *P.*  
97 *brevicompactum* NRRL 864 strain. The MPA cluster was again characterized by seven open  
98 reading frames (ORFs) that putatively encode seven enzymes: a prenyltransferase (MpaA), a  
99 protein with unknown function (MpaB), a non-reducing polyketide synthase (MpaC), a  
100 natural fusion enzyme (MpaDE) consisting of a cytochrome P450 domain (MpaD) in the N-  
101 terminal region and an hydrolase domain (MpaE) in the C-terminal, an inosine-5'-  
102 monophosphate dehydrogenase (IMPDH, MpaF), an O-methyltransferase (MpaG) and an  
103 oxidative cleavage enzyme (MpaH). Zhang et al. (2015) also confirmed by site-directed  
104 mutagenesis that MpaG is responsible for the final step in the MPA biosynthetic pathway (i.e.  
105 demethylmycophenolic acid -DMMPA- conversion by methylation of the 5-hydroxy group  
106 into the final product MPA).

107 Regarding the biochemical pathway (see Regueira et al. 2011; Hansen et al. 2012; Zhang et  
108 al. 2015 for illustrations of the proposed biosynthetic pathways), MpaC, a non-reducing PKS,  
109 catalyzes the production of 5-methylorsellinic acid (5-MOA) from acetyl-CoA, malonyl-CoA  
110 (x3) and S-adenosyl methionine) (Regueira et al. 2011). Then, 5-MOA is converted to 5,7-  
111 dihydroxy-4-methylphthalide (DHMP) by a natural fusion of MpaD, a cytochrome P450, and  
112 MpaE, a putative lactone synthase (Hansen et al. 2012). The putative prenyltransferase MpaA  
113 might catalyze the farnesylation of DHMP to produce 6-farnesyl-5,7-dihydroxy-4-  
114 methylphthalide (FDHMP) followed by the MpaH oxidative cleavage of the farnesyl chain to  
115 generate DMMPA (Regueira et al. 2011). Finally, by methylation of the DMMPA 5-hydroxy  
116 group, MpaG converts DMMPA into MPA (Zhang et al. 2015). Concerning MpaF, it would  
117 confer self-resistance toward MPA by encoding the MPA-insensitive IMPDH (Hansen et al.  
118 2011) whereas MpaB function still remains unknown.

119 To date, only some biosynthetic pathways for various mycotoxins have been elucidated in

120 filamentous fungi and this especially concerns the most toxigenic ones such as aflatoxins,  
121 ochratoxin A or fumonisins. However, biosynthetic pathways involved in mycotoxin  
122 production in the food related fungus *P. roqueforti* have not yet been fully elucidated except  
123 for ROQ C (Kosalková et al. 2015). In the present study, the recently sequenced and  
124 annotated *P. roqueforti* FM164 genome sequence was used to search for genes putatively  
125 involved in MPA biosynthesis. Then, silencing of the polyketide synthase gene *mpaC* was  
126 performed using RNA interference to confirm that the identified cluster was indeed associated  
127 with MPA production. Finally, MPA cluster DNA sequences of three *P. roqueforti* strains  
128 exhibiting contrasted MPA production levels were investigated.

129

## 130 **2. Materials and Methods**

### 131 2.1 Strains and culture conditions

132 A known MPA-producing *P. roqueforti* strain F43-1 (Jasmine Elizabeth Pearl John, personal  
133 communication) from our culture collection was used in this study. The strain was routinely  
134 grown on solid Power sporulation medium (Ullán et al. 2007) for 5-7 days at 25°C. Two *P.*  
135 *roqueforti* CBS 221.30<sup>NT</sup> and PTX.PR.27 strains, exhibiting contrasted MPA production  
136 levels (Fontaine et al. 2015a), were used in order to compare MPA gene cluster sequences, in  
137 particular with the FM164 strain genome sequence. Indeed, based on Fontaine et al. (2015a)  
138 results, we selected these three *P. roqueforti* strains for its different MPA production rates  
139 (FM164: low producer, CBS 221.30: average producer and PTX.PR.27.2: high producer). The  
140 strains were grown on PDA medium (Potato Dextrose Agar, Difco, Becton Dickinson and  
141 Company, Franklin Lakes, NJ, USA) for 5-7 days at 25°C before DNA extraction.  
142 Information about all the strains used in this study is given in Supplementary Table S1.

143

## 144 2.2 In silico study

145 Genes putatively involved in the MPA biosynthetic cluster were searched for in silico on the  
146 *P. roqueforti* FM164 genome sequence (kindly provided by Pr. Joëlle Dupont, French  
147 National Museum of Natural History) using a standalone blast (Altschul et al. 1990). To do  
148 so, different blasts (tblastn, blastn, blastp, blastx) were performed using the previously  
149 described and available *P. brevicompactum* ORFs or protein sequences (Regueira et al. 2011).  
150 Positive blast results showing strong sequence identities were identified and localized on the  
151 *P. roqueforti* FM164 genome sequence. The entire gene cluster and upstream and  
152 downstream flanking regions were selected for further study. ORF Finder tool from NCBI  
153 was also used to analyze putative intron and exon regions in each identified ORF.

154

## 155 2.3 Plasmid constructions for mpaC gene silencing

156 A 381-bp exonic fragment of mpaC (nucleotides 100 to 480) was amplified by PCR using as  
157 template *P. roqueforti* F43-1 genomic DNA with primers containing 5' NcoI restriction site  
158 sequences (underlined) : mpaC-NcoI-P1F (5'-CCATGCCATGGGTATACAAAGATTCAGC  
159 CGG-3') and mpaC-NcoI-P2R (5'-CCATGCCATGGCTGGAATTCCCCGTGTATCCT-3').  
160 The 381-bp PCR product was then cloned into the unique NcoI site of the pJL43RNAi vector  
161 (Ullán et al. 2008) to obtain the pJL43RNAi-mpaC plasmid and transformed in chemically  
162 competent *E. coli* DH5 $\alpha$  cells. Plasmid extractions were performed as previously described by  
163 Maniatis et al. (1982) before transforming *P. roqueforti* protoplasts.

164

## 165 2.4 *P. roqueforti* protoplast obtention

166 *P. roqueforti* protoplasts were obtained using the protocol described by Hidalgo et al. (2014)  
167 with some minor modifications. Conidia from Power sporulation medium culture were

168 collected using physiological water (NaCl 0.9%). A final concentration of  $10^7$  conidia.mL<sup>-1</sup>  
169 were added to 100 mL YES (2% yeast extract and 15% sucrose) medium and incubated at  
170 28°C with a constant agitation of 200 rpm agitation for 20 to 24 h. Mycelium size (germ tube)  
171 was regularly monitored until it was approximately 10 times longer than the spore diameter  
172 using 40X microscope lens. Filtered mycelium was washed 2 times with 0.9% NaCl and once  
173 with TPP buffer (50 mM potassium phosphate buffer with 0.7 M KCl at pH 5.8) before  
174 resuspending in 10 mL TPP buffer supplemented with filtered lytic enzyme solution (lysing  
175 enzymes from *Trichoderma harzianum*, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at a final  
176 concentration of 20 mg.mL<sup>-1</sup>. The mixture was then incubated at 28°C for 2 to 4 h in an  
177 orbital shaker set to 80 rpm. After protoplast release, the suspension was filtered using a 22-  
178 25 µm pore size filter (Miracloth, Merck, Darmstadt, Germany), then centrifuged at 2500 rpm  
179 for 5 min at 4°C. The pellet was washed twice with KCM buffer. Protoplasts were finally  
180 suspended in KCM buffer with 10% (v/v) PCM solution to a final concentration of  $2.5 \times 10^8$   
181 protoplasts.mL<sup>-1</sup> (counted in a Malassez chamber).

182

### 183 2.5 *P. roqueforti* transformation

184 *P. roqueforti* protoplast transformations were performed as previously described (Ullán et al.  
185 2007). Briefly, a 100 µL protoplast solution ( $2.5 \times 10^8$  protoplasts.mL<sup>-1</sup>) supplemented with  
186 10 µL PCM and up to 10 µL plasmid DNA solution (1 to 2 µg.µL<sup>-1</sup>) were mixed gently. A  
187 control reaction without added DNA was also prepared to determine protoplast regeneration  
188 and the appearance of reverting colonies. All mixtures were incubated on ice for 20 min  
189 before adding 500 µl PCM solution and further incubated at room temperature for 20 min. Six  
190 hundred µL KCM solution were then added to dilute the polyethylene glycol in PCM  
191 solution. Finally, 300 µL transformation reaction, selection agent (phleomycin, final

192 concentration of 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and molten Czapek minimal medium supplemented with  
193 sorbitol (1 M) (Cz-sorbitol) (at a temperature of 48-50°C) were mixed and poured onto 10 mL  
194 Cz-sorbitol medium base (supplemented with phleomycin) previously prepared in the Petri  
195 dish. After solidification, Petri dishes were incubated at 28°C for 4-7 days until colonies  
196 appeared. Colonies were then re-isolated two times on Cz (without sorbitol but supplemented  
197 with phleomycin) plates and cultured for 4-7 days at 28°C to discard false positives.

198

## 199 2.6 DNA extraction

200 Genomic DNA was extracted from fresh mycelium after 5-7 days growth for *P. roqueforti*  
201 CBS 221.30<sup>NT</sup>, PTX.PR.27.2, F43-1 and the transformants using the FastDNA SPIN Kit (MP  
202 Biomedicals, Illkirch, France) according to the manufacturer's instructions. DNA solutions  
203 were adjusted to 100  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  for PCR experiments and all DNA samples were conserved at -  
204 20°C.

205 For Southern blotting, larger DNA quantities were required. Consequently, another extraction  
206 protocol was followed for F43-1 and the transformants. Briefly, 50 mL of YES were  
207 inoculated with fresh spore suspension (2 mL at  $10^8$  spores. $\text{mL}^{-1}$ ) and incubated in a 250 mL  
208 flask for 24h at 28°C in an orbital shaker (200 rpm). Mycelium was collected by filtration  
209 through a sterile nylon filter (30  $\mu\text{m}$  pore diameter), then washed twice with NaCl 0.9%  
210 (w/v). Collected mycelium was dried using filter papers before freezing at -80°C. Liquid  
211 nitrogen frozen mycelium was ground using a mortar and the powder was collected in 10 mL  
212 tubes without exceeding the 2.5 mL graduation. Three mL of extraction buffer (0.7M NaCl;  
213 0.1M  $\text{Na}_2(\text{SO}_3)$ ; 0.1M Tris HCl pH 7.5; 0.05 M EDTA pH 8; 20% SDS) preheated at 65°C  
214 were added. Mixture homogenization was performed using a vortex then incubated in a water  
215 bath set to 65°C for 20 min. Next, chloroform:isoamyl alcohol (24:1) extraction was

216 performed followed by DNA precipitation using one volume isopropanol. The obtained DNA  
217 pellets were resuspended in 800  $\mu$ L molecular biology grade water and then further purified  
218 using 0.5 volume 7.5 M ammonium acetate followed by 0.6 volume isopropanol. Finally, the  
219 purified DNA pellet was dried then resuspended in 100  $\mu$ L molecular biology grade water.

220

## 221 2.7 PCR amplifications

222 PCR amplifications were performed to confirm proper plasmid integration using the primers  
223 FPpcbC (5'-GCATGTTGCATCGGGAAATCC-3') and RPgpd1 (5'-  
224 CGGAGAGACGGACGGACGCAG-3'), which amplify the exonic fragment inserted  
225 between the two convergent PpcbC and Pgpd promoters (1977 bp amplicon size). These two  
226 promoters are absent in *P. roqueforti*. Silencing vectors and the *P. roqueforti* F43-1 parental  
227 strain were used as positive and negative controls, respectively. The PCR mixture included  
228 molecular biology grade water, PCR buffer (1X), 0.2 mM dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of  
229 each primer, 0.5 U of GoTaq DNA polymerase (Promega, Madison, USA), and 100 ng of  
230 genomic DNA template. Amplifications were performed using a peqSTAR 2X Gradient  
231 Thermocycler (PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Germany) using the following  
232 program: 95°C/2 min, [95°C/30s; 68°C/30s; 72°C/2 min] x 33 cycles, 72°C/10 min.

233 PCR amplifications were also performed to sequence the 23.5-kb MPA cluster using DNA  
234 extracts of two *P. roqueforti* strains (CBS 221.30<sup>NT</sup>, PTX.PR.27.2) characterized, with  
235 FM164 strain, by contrasted MPA production levels (Fontaine et al. 2015a). PCR  
236 amplifications were performed using the designed primers listed in Table S2 and using the  
237 same PCR mixture described above. A detailed illustration (Supplementary Fig. S1) presents  
238 corresponding primer positions, forward and reverse primer names containing respectively the  
239 prefix MF and MR. Amplifications were performed using a peqSTAR 2X Gradient

240 Thermocycler (PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Germany) using the following  
241 program: 95°C/5 min, [95°C/30s; 50°C/30s; 72°C/2 min] x 35 cycles, 72°C/10 min.  
242 Exceptionally, hybridization temperature was adjusted to 46°C for MF7/MR19, to 48°C for  
243 MF38/MR46, MF35/MR46 and MF24/MR32 and to 55°C for MF7/MR9, MF7/MR11 and  
244 MF5/MR6 primer couples.

245 To check if strains contained or not a detected deletion in the mpaC gene, PCR primers were  
246 designed to amplify a 241 bp fragment (or 67 bp with the deletion) by positioning primers  
247 upstream (MPACDEL\_F: 5'-AGGCAGATATCAGGGTGGTG-3') and downstream  
248 (MPACDEL\_R: 5'-GCCCGTTCTGGATGTTGTAG-3') of the identified 174 bp deleted  
249 region. PCR amplifications were performed using the same PCR mixture described above, the  
250 same equipment and the following program: 96°C/2 min, [96°C/30s; 59°C/25s; 72°C/25s] x  
251 35 cycles, 72°C/10 min.

252

## 253 2.8 Southern Blotting

254 Southern blot hybridization experiments were carried out on PCR positive transformants to  
255 ensure proper integration in the *P. roqueforti* genome using probes targeting an internal  
256 region of the exonic fragment. First, total DNA extractions were performed from both  
257 positive transformants and the parental *P. roqueforti* F43-1 strain as described above. Then,  
258 total DNA was digested overnight at 37°C with the SalI enzyme using the following mix:  
259 SalI enzyme 37.5 U, 1X H buffer, 15 µg DNA in a total reaction volume of 25 µL.

260 To prepare DNA probes for Southern blot hybridization, a PCR amplification using mpaC-  
261 NcoI-P1F (5'-CCATGCCATGGGTATACAAAGATTCAGCCGG-3') and mpaC-NcoI-P2R  
262 (5'-CCATGCCATGGCTGGAATTCCCGTGTATCCT-3') (sequences corresponding to the  
263 NcoI restriction sites are underlined) was performed in 60 µL total volume as described above.



264 The following PCR conditions were used: 95°C/5min, [95°C/30s; 53°C/30s; 72°C/30s] x 35  
265 cycles, 72°C/5 min. After electrophoresis migration, DNA fragments were eluted using the  
266 MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands) according to the  
267 manufacturer's instructions to prepare probes. To do so, 0.5-1.5 µg linear DNA PCR  
268 fragments were denatured in a maximum volume of 22.5 µL by boiling for 10 min. Samples  
269 were then transferred to ice for 5 min and mixed with 3 µL of Hexanucleotide Mix (10X), 3  
270 µL of DIG-DNA labeling mix (10X) and 1.5 µL of Klenow enzyme (Roche, Mannheim,  
271 Germany). Mixture was incubated at 37°C for 20 min and the reaction was stopped by  
272 freezing samples at -20°C.

273 Previously digested DNA was separated by agarose gel electrophoresis in 0.8% (w/v) TAE  
274 gel. Agarose gel was successively incubated with agitation in depurinization solution (0.25 M  
275 HCl) for 15 min (xylene cyanol front-migration changes from blue to yellow), denaturing  
276 solution (1.5 M NaCl, 0.5 N NaOH) for 30 min (xylene cyanol front-migration recovers the  
277 original blue color) and neutralization solution (1.5 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl) for 30 min.  
278 Then, DNA transfer from agarose gel to a nylon filter was performed following Sambrook et  
279 al. methodology (1989).

280 For DNA hybridization, the membrane was placed in a sealed plastic bag with 10 mL  
281 prehybridization solution (5X SSC, 1-2% (w/v) blocking reagent (Roche, Mannheim,  
282 Germany), 0.1% (w/v) lauroilsarcosin, 0.02% (w/v) SDS) and incubated at 67 °C for 4h in a  
283 water bath. Previously prepared probes were boiled for 10 min to denature DNA and quickly  
284 cooled on ice before being mixed with 10 mL prehybridization solution to prepare the  
285 hybridization solution. The prehybridization solution was replaced by the hybridization  
286 solution and the membrane was incubated for at least 8h at 67°C in a water bath. The  
287 membrane was then successively washed by shaking with washing solution I (2X SSC, 0.1%

288 (w/v) SDS) for 15 min at 68 °C, washing solution II (0.1X SSC, 0.1% (w/v) SDS) for 15 min  
289 at 68 °C, buffer I (100 mM maleic acid, 150 mM NaCl, pH=7.5 + 0.3% (v/v) Tween-20) for 5  
290 min at room temperature and finally with buffer II (100 mM maleic acid, 150 mM NaCl, pH  
291 7.5, 1% of blocking reagent (Roche, Mannheim, Germany)) for 30 min at room temperature  
292 to block the membrane. The membrane was further incubated with buffer II/antibody (anti-  
293 digoxigenin conjugated with alkaline phosphatase in buffer II (1:10000) (Roche, Mannheim,  
294 Germany)) for at least 30 min under agitation at room temperature. The antibody solution was  
295 removed, membrane washed twice with buffer I for 15 min at room temperature then with  
296 buffer III (0.1 M Tris-HCl pH=9.5, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>) for 5 min at room  
297 temperature. Finally, buffer III was replaced by buffer IV, consisting in 45 µL NBT (4-Nitro  
298 blue tetrazolium chloride) (Roche, Mannheim, Germany) and 35 µL BCIP (5-Bromo-4-  
299 chloro-3-indolyl-phosphate) (Roche, Mannheim, Germany) stock solutions per 10 mL of  
300 buffer III, to reveal bands. Stock solutions were previously prepared in 67% (v/v) DMSO  
301 supplemented with NBT and BCIP (18.75 and 9.4 mg.mL<sup>-1</sup>, respectively).

302

### 303 2.8 Metabolite extraction from *P. roqueforti* cultures

304 For optimal MPA production, the parental strain F43-1 and obtained transformants were  
305 grown in YES-Corn extract medium (YES-C, 1% yeast extract, 7.5% sucrose and 20% (v/v)  
306 corn extract) buffered at pH 4.0 with phosphate-citrate buffer (Chang et al. 1998). Corn  
307 extract was prepared by boiling 1 kg of dried corn grains in 1.5 L distilled water for 60 min  
308 before filtering with a cloth filter. The corn extract filtrate was adjusted as needed to a total  
309 volume of 1 L with distilled water before being mixed with other YES-C medium  
310 components and sterilized. Fifty mL of YES-C medium were placed in 250 mL flask,  
311 inoculated with 1 mL *P. roqueforti* spore suspension (10<sup>8</sup> spores.mL<sup>-1</sup>) and incubated under

312 static conditions for 7 days at 25°C. Cultures were performed in triplicate with two biological  
313 replicates for each transformant and the parental strain *P. roqueforti* F43-1. Secondary  
314 metabolites produced in YES-C liquid medium by the different *P. roqueforti* strains were  
315 extracted by liquid-liquid extraction using the following methodology. Twenty mL of  
316 fermentation broth were separated from mycelium by filtration then 20 mL of ethyl acetate  
317 were added and the suspension was mixed vigorously for 1 min. The suspension was  
318 centrifuged at 6000 rpm for 5 min at 4°C to separate the two phases and the organic phase  
319 was collected in a new tube. A second extraction was performed with 20 ml ethyl acetate and  
320 the two organic extracts were pooled together before drying using a rotary evaporator (RV-10,  
321 digital, VWR by IKA, Staufen, Germany). Dried samples were re-dissolved in 5 ml of H<sub>2</sub>O +  
322 0.1% formic acid / acetonitrile (50%/50%, v/v) before being analyzed by Q-TOF LC-MS.  
323 In order to link mycotoxin production to fungal biomass, the filter collected mycelium  
324 obtained at the beginning of the liquid-liquid extraction was transferred to aluminium pre-  
325 weighed dishes and dried for 7 days at 70°C. Mycelium dry weight was determined using a  
326 Pioneer precision balance (Ohaus, Pine Brook, NJ, USA).

327

### 328 2.9 MPA identification and chromatographic analysis

329 Extracted metabolites were separated and identified by an Agilent 6530 Accurate-Mass  
330 Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) LC/MS system. The HPLC system included a Binary  
331 pump 1200 and degasser, well plate autosampler with thermostat and a thermostated column  
332 compartment. Before LC-MS/Q-TOF analysis, all extracts were filtered through a 0.2 µm  
333 PTFE membrane syringe 4 mm filter (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) in  
334 an amber vial. Two µL samples were injected in the system and separation was achieved  
335 using a ZORBAX Extend-C18 column (2.1 x 50 mm and 1.8 µm, maximum pressure 600

336 bar). The column was maintained at 35 °C and the flow rate was set to 0.3 mL.min<sup>-1</sup> using as  
337 mobile phase: solvent A (milli-Q water + 0.1% formic acid + 10 mM ammonium formate)  
338 and solvent B (100% acetonitrile). Solvent B was maintained at 10% for the first 4 minutes,  
339 followed by a gradient of 10-100% of B during 18 min. Finally, solvent B was maintained at  
340 100% for 5 min followed by 5-min post-time to equilibrate the column to original run  
341 conditions. Compounds were detected using an Agilent 6530 Series Accurate-Mass  
342 Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) mass spectrometer. Analytes were ionized in both ESI+  
343 and ESI- modes. Mass spectrometer conditions were: capillary voltage, 4 kV; source  
344 temperature, 325°C; nebulizer pressure, 50 psig; drying gas, 12 L.min<sup>-1</sup> and ion range, 100 to  
345 1000 m/z. MPA standard solution was obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)  
346 and stored in acetonitrile at -20°C. MPA quantification was performed using the [M-H<sup>+</sup>]-H<sub>2</sub>O  
347 303 m/z ion (ESI+) and a second validation using [M-H]<sup>+</sup> 319 m/z ion (ESI-). These two ions  
348 were selected as *P. roqueforti* produces two mycotoxins with the same molecular weight  
349 (320.3371 g.mol<sup>-1</sup> for both PR toxin and MPA) and very close retention times. After MPA  
350 production assessment and adjustment (taking into account fungal dry mass), mean ± 95%  
351 confidence interval were calculated.

352

#### 353 2.10 RNA extraction and gene expression studies

354 RNA was extracted from fresh mycelium after 4 and 7 days growth on YES agar medium  
355 using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands) according to the  
356 manufacturer's instructions. After RNA extraction, a second DNase treatment was performed  
357 using the RapidOut DNA Removal Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)  
358 according to the manufacturer's instructions. All RNA samples were quantified using a  
359 Nanodrop ND 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)

360 then conserved at -80°C. RT-qPCR was performed using the iTaq Universal SYBR Green  
361 One-Step Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.  
362 The PCR mixture included molecular biology grade water, iTaq universal SYBR Green  
363 reaction mix (1X), 300 nM of each primer, IScript reverse transcriptase (1X) and 25 ng of  
364 RNA template. Amplifications were performed using a Bio-Rad CFX96 real-Time PCR  
365 Thermocycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using the following program: 50°C/10 min,  
366 95°C/1 min, [95°C/10s; 60°C/30s] x 40 cycles, 65-95°C (0.5°C increment with 5s/step).  
367 Several reference genes were tested:  $\beta$ -actin involved in cytoskeleton organization,  
368 phosphofructokinase (pfkA), cohesion complex subunit (psm1) involved in chromosomes  
369 segregation during mitosis, Rho GTPase activator (sac7) involved in signal transduction,  
370 mitochondrial membrane fission protein (fis1) being a part of a mitochondrial complex that  
371 promotes mitochondrial fission, ubiquitin-protein ligase (ubc6) involved in endoplasmic  
372 reticulum-associated protein catabolic process while the targeted gene was mpaC. For this  
373 purpose, new RT-qPCR primer couples dedicated to *P. roqueforti* gene expression studies  
374 were developed for each gene target (Table 1). All experiments were performed in triplicate  
375 using 3 biological replicates. Gene expression data were analyzed using the Livak method  
376 (Livak and Schmittgen 2001) and 95% confidence intervals were calculated. Linear standard  
377 curve ( $R^2$ ), amplification efficiency (E) and consistency across replicate reactions were  
378 assessed for all primer couples.

379

### 380 **3. Results**

#### 381 3.1 In silico identification of the MPA biosynthesis gene cluster

382 By comparing the seven ORFs described in *P. brevicompactum* (Regueira et al. 2011; Hansen  
383 et al. 2012) with the recently annotated *P. roqueforti* FM164 genome (Cheeseman et al.

384 2014), a 23.5-kb MPA biosynthetic gene cluster was successfully localized in *P. roqueforti*  
385 (Fig. 1).

386 The *P. roqueforti* MPA biosynthetic cluster is a 7-gene cluster and includes the *mpaA*, *mpaB*,  
387 *mpaC*, *mpaF*, *mpaG* and *mpaH* genes as well as *mpaDE* single gene which encodes a fusion  
388 protein with two active domains involved in the conversion of 5-methylorsellinic acid (5-  
389 MOA) to 5,7-dihydroxy-4-methylphthalide (DHMP). This cluster shows identical gene  
390 organization in comparison to the cluster previously described by Hansen et al. (2012) (Fig.  
391 1). Amino acid identity percentages ranged from 72 to 98% between the predicted sequences  
392 and the closest sequences in Genbank (Table 2). As expected, highest identical amino acid  
393 scores were found with *P. brevicompactum* for five out of the seven proteins (*MpaA*, *MpaB*,  
394 *MpaC*, *MpaDE*, *MpaG*). Interestingly, the two genes coding for *MpaF* and *MpaH* in *P.*  
395 *roqueforti* showed highest amino acid sequence homologies with proteins in *Penicillium*  
396 *chrysogenum* (currently named *Penicillium rubens*, Houbraken et al. 2011) and *Penicillium*  
397 *expansum*, respectively, even if, to our knowledge, these two *Penicillium* species have never  
398 been shown to produce MPA. Noteworthy, clear differences were observed in terms of gene  
399 size regarding *mpaB* and *mpaDE* between *P. roqueforti* and *P. brevicompactum* (Fig. 1), and  
400 also affected the putative translated protein sizes (298 and 932 aa, 392 and 853 aa,  
401 respectively).

402 Detailed information including gene and protein sizes, conserved domains, putative activities  
403 and accession numbers about the *P. roqueforti* MPA biosynthesis cluster is summarized in  
404 Table 2.

405

### 406 3.2 *MpaC* silencing by RNAi strategy

407 To determine whether the identified 23.5 kb *P. roqueforti* MPA biosynthetic cluster is indeed

408 involved in MPA production, a gene silencing strategy targeting *mpaC* (encoding the putative  
409 polyketide synthase involved in the first step of this pathway) was used as recently described  
410 by Hidalgo et al. (2014) and Kosalková et al. (2015). A 381bp exonic *mpaC* gene fragment  
411 was cloned into the pJL43RNAi vector between two promoters, *Pgpd* and *PpcbC*, to obtain  
412 the corresponding silencing vector pJL43RNAi-*mpaC*. This silencing vector was transformed  
413 into *P. roqueforti* protoplasts and several phleomycin resistant transformants (CI1 to CI6)  
414 were obtained, while the phleomycin concentration used fully inhibited the growth of  
415 untransformed *P. roqueforti* F43-1. Each transformant was then analyzed to confirm proper  
416 integration of the silencing cassette in the *P. roqueforti* genome and ensure no rearrangement  
417 occurred. Confirmation of transformants was performed using two methods. The first one was  
418 based on PCR amplifications that targeted the exonic fragment inserted between the two *Pgpd*  
419 and *PpcbC* promoters and results confirmed the correct integration for three out of six  
420 transformants according to the observed 1977 bp amplicon size band (CI1, CI2 and CI3)  
421 (Supplementary Fig. S2) while no corresponding bands was observed for the other three  
422 transformants. The six transformants were also analyzed to confirm correct gene silencing  
423 cassette integration by Southern blotting using a probe targeting an internal region of an  
424 exonic *mpaC* fragment (381 bp). As previously described, total DNA of each transformant  
425 was first digested with *SalI* to release the endogenous gene and the integrated silencing  
426 cassette from the genome. Positive and negative controls were also included in each  
427 experiment and corresponded to the silencing vector and *P. roqueforti* F43-1 parental strain,  
428 respectively. The bands observed in each PCR positive transformant (CI1 to CI3) and the one  
429 corresponding to digested silencing plasmid presented the same size (Supplementary Fig. S3).  
430 This band was not observed for the untransformed F43-1 control strain. These Southern blot  
431 hybridizations also revealed, as expected, a 9680 bp band in each transformant and the

432 untransformed F43-1 control strain corresponding to the endogenous copy of the *mpaC* gene  
433 (Supplementary Fig. S3). In total, three transformants (CI1 to CI3) were shown to have  
434 correctly integrated the *mpaC* gene silencing cassette by both PCR and Southern  
435 hybridization.

436

### 437 3.3 Effect of *mpaC* gene silencing on MPA production

438 Cultures of the three positive transformants (CI1 to CI3, confirmed to carry the pJL43RNAi-  
439 *mpaC* silencing cassette) and the parental strain *P. roqueforti* F43-1 were performed in YES-  
440 C using controlled conditions for 7 days in triplicate with two biological replicates. After  
441 extraction, MPA was quantified and correlated to the mycelium dry masses (no significant  
442 differences were observed among the dry mass mean values). Transformants exhibited  
443 contrasted MPA production. Transformants CI1 and CI2 showed reduced MPA production by  
444 5-9% and 38-61%, respectively, after 7-day fermentation in liquid YES-C medium (Fig. 2).  
445 Moreover, statistical analyses were performed (95% confidence intervals) and revealed that  
446 the mean MPA production observed in particular for the CI2 transformant was significantly  
447 different in comparison to the parental strain (F43-1) in both biological replicates. However,  
448 the CI3 transformant exhibited higher MPA production than the control strain (Fig. 2)  
449 indicating on one hand that *mpaC* was not silenced and on the other raising the question of the  
450 location of the gene silencing cassette in the *P. roqueforti* genome and its impact on MPA  
451 production. These results not permitted to conclude on the involvement of the *mpaC* gene in  
452 MPA biosynthesis in *P. roqueforti* F43-1. It should be noted that this gene silencing strategy  
453 is not a site-directed approach and therefore variations in gene expression data can be  
454 observed in some cases due to off-target effects. It would be interesting to determine the  
455 integration site of the silencing cassette for this transformant to better understand the observed



456 higher MPA quantities (20-98%) (Fig. 2).

457

### 458 3.4 Impact of gene silencing on mpaC gene expression

459 To confirm that the decrease in MPA production observed for the CI2 transformant was  
460 indeed due to reduced mpaC gene expression, quantitative RT-qPCR experiments were  
461 performed. Only few reference genes have been specifically designed for *P. roqueforti* to date  
462 and correspond to either  $\beta$ -actin (used in this study) or  $\beta$ -tubulin targets. However, these gene  
463 targets are not always considered as the most stable and suitable for RT-qPCR, therefore five  
464 newly designed primer couples targeting pfkA, psm1, sac7, fis1 and ubc6 genes (see Materials  
465 and Methods section) were created in this study based on the recently annotated *P. roqueforti*  
466 FM164 genome sequence (Table 1). Primers were also designed at an exon-exon junction in  
467 mpaC to evaluate mpaC gene expression (Table 1). High amplification efficiencies and  
468 consistency across replicate reactions were observed with  $R^2 \geq 0.97$  and up to 0.99 observed  
469 for pfkA, psm1, sac7 and mpaC primer couples. Expression of the other targeted genes, in  
470 particular  $\beta$ -actin and to a lesser extent fis1 and ubc6, was too variable and therefore not  
471 included in the analyses (data not shown). Based on the Livak method (Livak and Schmittgen  
472 2001), gene expression data were analyzed and relative quantification of the mpaC gene was  
473 normalized to the 3 different reference genes (Fig. 3). The normalized expression ratio was  
474 calculated using the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method (Livak method). Melting curve analyses were performed to  
475 ensure RT-qPCR product specificity for all experiments (Table 2) and amplification products  
476 for each gene (reference genes and mpaC) were also confirmed on electrophoresis gels (data  
477 not shown).

478 RT-qPCR results (Fig. 3) confirmed that the decrease in the MPA biosynthesis was due to  
479 decreased mpaC gene expression in 4-day *P. roqueforti* cultures. On the other hand, 7-day *P.*

480 roqueforti cultures did not show significant mean differences between the CI2 transformant  
481 and control strain (data not shown). Indeed, contrary to the knock-out approach recently  
482 described in *P. roqueforti* (Goarin et al. 2014), this knock-down gene silencing strategy is  
483 known to have short term transient effects (Salame et al. 2010) that first downregulates gene  
484 expression followed by decreased MPA production. Normalized expression ratios were  
485 calculated for 4-day *P. roqueforti* cultures using *pfkA*, *psm1* or *sac7* reference genes and  
486 indicated an up to 7.1 reduction factor in *mpaC* gene expression for the CI2 transformant  
487 compared to the *P. roqueforti* parental strain F43-1. Moreover, statistical tests (95%  
488 confidence intervals) showed that the *mpaC* gene expression mean was significantly different  
489 from the control mean for two reference genes (*pfkA* and *sac7*). Overall, results showed that  
490 three reference genes were highly stable and suitable for *P. roqueforti* gene expression  
491 studies, namely *pfkA*, *sac7* and *psm1*. Overall, these results together with the observed  
492 decrease in MPA biosynthesis confirmed the involvement of the *mpaC* gene in MPA  
493 biosynthesis.

494

### 495 3.5 Origin of strain-dependent MPA production variability

496 A recent study in our laboratory suggested that MPA-production ability was a strain-  
497 dependent trait (Fontaine et al. 2015a). Based on this study, we selected three *P. roqueforti*  
498 strains producing MPA at different levels (FM164, CBS 221.30 and PTX.PR.27.2 produced,  
499 respectively, low, average and high MPA concentrations according to the dataset). In order to  
500 determine if gene sequence variations could explain the observed differences in MPA-  
501 production between strains in optimal growth conditions (YES medium after 7-day culture at  
502 25°C), the identified 23.5 kb MPA biosynthesis cluster was fully sequenced in CBS 221.30  
503 and PTX.PR.27.2 (Genbank accession n° KU234530 and KU234531, respectively) and

504 compared between all three strains. MPA gene cluster sequence analyses showed that gene  
505 synteny was fully conserved between the three isolates and a minimum of 99% nucleotide  
506 sequence identity was observed for 6 genes (mpaA, mpaB, mpaDE, mpaF, mpaG, mpaH)  
507 while for mpaC about 97% sequence identity was observed for PTX.PR27.2 and  
508 CBS221.30<sup>NT</sup> in comparison to FM164. This difference in nucleotide sequence identity was  
509 explained by a 174 bp deletion observed within mpaC in *P. roqueforti* FM164  
510 (Supplementary Fig. S4). This deletion clearly modifies the amino acid sequence of the  
511 corresponding protein, introducing a frameshift and decreasing the encoded protein length by  
512 14 amino acids, compared to what is observed in PTX.PR27.2 and CBS221.30<sup>NT</sup> but also in  
513 *P. brevicompactum* (Supplementary Fig. S4). This modification is located in the  
514 lipase/esterase domain of the MpaC enzyme.

515 To further confirm this finding and to check whether low or non-producing MPA strains  
516 contained the same deletion in the mpaC gene, PCR primers were designed to amplify a 241  
517 bp fragment (or 67 bp with the deletion) by positioning primers upstream and downstream of  
518 the identified 174 bp region. In total, 55 *P. roqueforti* representative strains from our  
519 worldwide *P. roqueforti* collection, belonging to the three recently described distinct genetic  
520 populations (Gillot et al. 2015) and for which MPA production was also determined (Gillot et  
521 al., unpublished data) were tested by PCR. Interestingly, all strains presenting the same  
522 deletion (19 out of 55) as observed for FM164 (Supplementary Fig. S4) were characterized by  
523 non-detectable MPA production (< detection limit of the LC-MS/Q-TOF method). This 174  
524 bp deletion is clearly correlated to no or limited MPA production in these strains.  
525 Noteworthy, these 19 strains all belong to two genetic groups (populations 1 & 3) previously  
526 described in Gillot et al. (2015). Moreover, these strains represented 19 out of the 21  
527 members of these two populations (1 & 3) included in the present study and it is important to

528 note that the two remaining strains (F36-1 & UBOCC-A-101449) were not fully assigned to  
529 their corresponding population (not 100% affiliation) in the previous study (Gillot et al. 2015)  
530 which could explain this difference in amplification. Furthermore, 17 out of 19 strains were  
531 isolated from blue cheeses while the other two (IHEM 3196 & UBOCC-111277) were  
532 isolated from human sputum and pitted prunes, respectively, and correspond to two human  
533 related environments. It is also noteworthy that all the strains isolated from non-cheese  
534 substrates used in this present study and pertaining to last population described in Gillot et al.  
535 (2015) (population 2) did not harbor the deletion.

536

#### 537 **4. Discussion**

538 This study allowed describing for the first time a functional 7-gene cluster involved in MPA  
539 biosynthesis in *P. roqueforti*. This cluster, highly similar to the one described by Hansen et al.  
540 (2012) in *P. brevicompactum*, contains genes coding for seven putative enzymes. The key  
541 enzyme of this pathway, a polyketide synthase, is encoded by the *mpaC* gene. Involved at the  
542 beginning of the pathway, the corresponding enzyme MpaC is responsible for MPA backbone  
543 synthesis (Regueira et al. 2011). This makes *mpaC* the best target gene within the cluster in  
544 order to characterize at a functional level the identified MPA biosynthesis gene cluster.

545 Here, using a RNA interference strategy targeting *mpaC* gene, contrasted results in terms of  
546 MPA production were obtained. In case of CI2 transformant, a significant decrease in MPA  
547 production was observed and this significant reduction could be attributed to a  
548 downregulation in *mpaC* gene expression as revealed by RT-qPCR analysis. Noteworthy,  
549 expression of the commonly used  $\beta$ -actin reference gene was shown to be too variable.  
550 Therefore, on the basis of a recent global analysis of reference gene stability in filamentous  
551 fungi (Llanos et al. 2015), five other reference genes shown to have only weak gene

552 expression changes (no tendency for up- or down-regulation) were used in this study by  
553 designing novel *P. roqueforti* specific primers. Three RT-qPCR primer couples  
554 (corresponding to *pfkA*, *psm1* and *sac7* genes) were shown to be highly stable and efficient  
555 reference genes in this study and will be of great use for future gene expression studies in *P.*  
556 *roqueforti*. Overall, the RNA interference strategy not allow concluding that the gene  
557 encoding the MpaC enzyme is clearly involved in MPA biosynthesis in *P. roqueforti*.

558 The ability to produce MPA is almost exclusively found in species from the *Penicillium*  
559 subgenus *Penicillium*. Indeed, several species of this subgenus such as *Penicillium*  
560 *bialowieziense*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium carneum*, *P. roqueforti* or more  
561 recently *Penicillium psychrosexualis* have been reported to produce MPA (Frisvad et al.  
562 2004; Houbraeken et al. 2010). In particular, MPA can be produced by *P. roqueforti* which is  
563 well-known to be used as a starter culture for blue-veined cheeses. Several studies have  
564 described the presence of MPA in blue-veined cheeses with a large range of concentrations  
565 (Engel et al., 1982; Fontaine et al., 2015; Kokkonen et al., 2005; Lafont et al., 1979; Usleber  
566 et al., 2008). However, recent studies showed that MPA is not systematically produced  
567 (Fontaine et al. 2015c) and suggested that MPA-production might be a strain-dependent trait  
568 in this species (Fontaine et al. 2015a). This finding does not necessarily seem to be the case,  
569 to this date, for other mycotoxins such as ROQ C which is almost always encountered in  
570 detectable quantities in blue cheeses or others substrates (Scott and Kennedy 1976; Finoli et  
571 al. 2001; Kokkonen et al. 2005; O'Brien et al. 2006; Fontaine et al. 2015c). The large  
572 concentration range of MPA observed in cheese can be associated with the influence of  
573 numerous biotic and abiotic factors modulating fungal growth and metabolite production.  
574 These factors were recently reviewed (Hymery et al. 2014) and correspond for biotic factors  
575 to the intrinsic capacity of a given mold species or strain to produce mycotoxins, its

576 physiological state and the interactions with the cheese microbiota, while the main abiotic  
577 factors correspond, on one hand, to cheese-making and environmental factors (e.g.  
578 temperature, relative humidity, ripening time and storage atmosphere) and, on the other hand,  
579 to cheese physicochemical factors (e.g. chemical composition, C/N ratio, NaCl content, water  
580 activity, pH, redox potential). The impact of some of these factors on mycotoxin production,  
581 including MPA, in *P. roqueforti* was recently confirmed by Fontaine et al. (2015a).  
582 Concerning the existence of strain intrinsic MPA production ability, it could be linked to  
583 either the involvement of regulatory factors or to the existence of genetic variations in the  
584 regulatory regions or in the gene clusters themselves. Concerning regulatory factors,  
585 numerous studies have characterized such factors, in particular in penicillin biosynthesis by *P.*  
586 *rubens*, for example, CreA, PcRFX1 or PcFKH1 (Domínguez-Santos et al. 2012; Cepeda-  
587 García et al. 2014; Domínguez-Santos et al. 2015). Interestingly, ortholog regulatory factors  
588 of PcRFX1 were identified in *Acremonium chrysogenum* (CPCR1) (Schmitt et al. 2004) and  
589 *Penicillium marneffei* (RfxA) (Bugeja et al. 2010) which are in agreement with the putative  
590 involvement of similar regulatory factors for MPA production. However, in *P.*  
591 *brevicompactum*, no transcription factor genes were found associated to the MPA  
592 biosynthesis gene cluster (Regueira et al. 2011). These authors stated that the question  
593 whether or not the MPA gene cluster is regulated remained unanswered. In order to determine  
594 if gene sequence variations were associated with the observed variations in strain-dependent  
595 MPA production, the entire MPA cluster DNA sequence was studied among 3 *P. roqueforti*  
596 strains characterized by contrasted MPA production levels. The complete MPA gene cluster  
597 among two *P. roqueforti* isolates (CBS 221.30<sup>NT</sup> and PTX.PR.27.2) in comparison to *P.*  
598 *roqueforti* FM164 (data not shown) revealed a 174 bp deletion in the 3' region of the *mpaC*  
599 gene in the *P. roqueforti* FM164 isolate explaining this major variation. Interestingly, this

600 strain was characterized by the lowest MPA production among the three studied isolates. This  
601 deletion is located at the lipase/esterase domain of the MpaC enzyme. Consequently, this  
602 region was further amplified from 55 *P. roqueforti* strains from our collection and revealed  
603 that all strains presenting the same deletion were characterized by non-detectable MPA  
604 production. Thus, these results allow concluding that *mpaC* is clearly involved in MPA  
605 biosynthesis in *P. roqueforti*. Moreover, the 7-gene MPA biosynthesis cluster, highly similar  
606 in regards to gene synteny, homology and sequence identity (ranging from 72 to 92%) to the  
607 cluster described in *P. brevicompactum*, is fully functional in *P. roqueforti*. Thus, we can  
608 hypothesize that the corresponding biochemical pathway is also similar to the one previously  
609 described in *P. brevicompactum* (Regueira et al. 2011; Hansen et al. 2012; Zhang et al. 2015).  
610 Noteworthy, a strong correlation was found between the corresponding strains, characterized  
611 by non-detectable MPA production, as almost all strains belonged to populations 1 and 3  
612 previously described in Gillot et al. (2015) and were isolated from the same substrate, i.e. blue  
613 cheeses. Interestingly, all strains isolated from non-cheese environments and belonging to the  
614 third population described in Gillot et al. (2015) (population 2) did not harbor this deletion.  
615 These observations provide food for thought regarding footprints of adaptation which have  
616 led to metabolic specialization. Indeed, domestication footprints have already been found in  
617 *P. roqueforti* cheese fungi genomes (Cheeseman et al. 2014; Ropars et al. 2015).  
618 This result also showed that gene alterations within the MPA gene cluster occur in *P.*  
619 *roqueforti* and can explain the absence of MPA production by certain strains but do not  
620 exclude the hypothesis of regulation by transcription factors or sequence variations in  
621 promoter or regulatory regions. Supporting this hypothesis was the fact that CBS 221.30<sup>NT</sup>  
622 and PTX.PR.27.2, although exhibiting only little differences in their MPA cluster sequence,  
623 do not produce equivalent MPA levels, independently from growth, in the same culture

624 conditions. Interestingly, this alteration of the *mpaC* gene precluding detectable MPA  
625 biosynthesis confirmed the involvement of *mpaC* and the identified cluster in MPA  
626 production as shown by the RNA interference strategy used in this study.

627 In conclusion, this study allowed for the first time to identify and confirm the involvement of  
628 a 7-gene cluster in MPA production in *P. roqueforti*. Interestingly, MPA production is a  
629 strain-dependent trait and low MPA production is associated with an alteration (deletion) in  
630 the *mpaC* gene encoding for the PKS responsible for the first step of the biochemical  
631 pathway. The developed molecular tools used for the detection of non-MPA producers could  
632 be useful in the future for *P. roqueforti* ripening culture selection.

633

## 634 **Acknowledgements**

635 Guillaume Gillot is funded by the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement  
636 Supérieur et de la Recherche (France) & the French Dairy Inter-branch Organization (CNIEL,  
637 France). The authors are thankful to Stella Debaets and Oceane Savary for technical  
638 assistance in MPA biosynthesis cluster PCR amplifications. We are also grateful to Pr. Joëlle  
639 Dupont for providing the *P. roqueforti* FM164 genome sequence.

640

## 641 **References**

- 642 Abbas A, Dobson ADW (2011) Yeasts and Molds: *Penicillium roqueforti*. In: Fuquay JW (ed)  
643 Encyclopedia of Dairy Sciences, 2nd edn. Academic Press, San Diego, pp 772–775
- 644 Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J*  
645 *Mol Biol* 215:403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- 646 Arnold DL, Scott PM, McGuire PF, Harwig J, Nera EA (1978) Acute toxicity studies on roquefortine  
647 and PR toxin, metabolites of *Penicillium roqueforti*, in the mouse. *Food Cosmet Toxicol* 16:369–371.  
648 doi: 10.1016/S0015-6264(78)80009-1
- 649 Ballester A-R, Marcet-Houben M, Levin E, Sela N, Selma-Lázaro C, Carmona L, Wisniewski M,  
650 Droby S, González-Candelas L, Gabaldón T (2015) Genome, transcriptome, and functional analyses



651 of *Penicillium expansum* provide new insights into secondary metabolism and pathogenicity. *Mol*  
652 *Plant Microbe Interact* 28:232–248. doi: 10.1094/MPMI-09-14-0261-FI

653 Bentley R (2000) Mycophenolic acid: a one hundred year odyssey from antibiotic to  
654 immunosuppressant. *Chem Rev* 100:3801–3826. doi: 10.1021/cr990097b

655 Birch AJ, English RJ, Massy-Westropp RA, Slaytor M, Smith H (1958) 67. Studies in relation to  
656 biosynthesis. Part XIV. The origin of the nuclear methyl groups in mycophenolic acid. *J Chem Soc*  
657 365–368. doi: 10.1039/JR9580000365

658 Birch AJ, English RJ, Massywestropp R, Smith H (1957) The origin of the terpenoid structures in  
659 mycelianamide and mycophenolic acid. Mevalonic acid as an irreversible precursor in terpene  
660 biosynthesis. *Proc Chem Soc* 233–234.

661 Birkinshaw JH, Bracken A, Morgan EN, Raistrick H (1948) Studies in the biochemistry of micro-  
662 organisms. 78. The molecular constitution of mycophenolic acid, a metabolite of *Penicillium brevi-*  
663 *compactum* Dierckx. II. Possible structural formulae for mycophenolic acid. *Biochem J* 43:216–223.

664 Borroto-Esoda K, Myrick F, Feng J, Jeffrey J, Furman P (2004) In vitro combination of amdoxovir  
665 and the nosine monophosphate dehydrogenase inhibitors mycophenolic acid and ribavirin  
666 demonstrates potent activity against wild-type and drug-resistant variants of human immunodeficiency  
667 virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* 48:4387–4394. doi: 10.1128/AAC.48.11.4387-4394.2004

668 Boysen ME, Jacobsson K-G, Schnürer J (2000) Molecular identification of species from the  
669 *Penicillium roqueforti* group associated with spoiled animal feed. *Appl Environ Microbiol* 66:1523–  
670 1526. doi: 10.1128/AEM.66.4.1523-1526.2000

671 Bugeja HE, Hynes MJ, Andrianopoulos A (2010) The RFX protein RfxA is an essential regulator of  
672 growth and morphogenesis in *Penicillium marneffei*. *Eukaryot Cell* 9:578–591. doi:  
673 10.1128/EC.00226-09

674 Canonica L, Kroszczyński W, Ranzi BM, Rindone B, Santaniello E, Scolastico C (1972) Biosynthesis  
675 of mycophenolic acid. *J Chem Soc [Perkin 1]* 2639–2643. doi: 10.1039/P19720002639

676 Cantor MD, van den Tempel T, Hansen TK, Ardö Y (2004) Blue cheese. In: Fox PF, McSweeney  
677 PLH, Cogan TM, Guinee TP (eds) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 3rd edn. Elsevier  
678 Academic Press, London, pp 175–198

679 Cepeda-García C, Domínguez-Santos R, García-Rico RO, García-Estrada C, Cajiao A, Fierro F,  
680 Martín JF (2014) Direct involvement of the CreA transcription factor in penicillin biosynthesis and  
681 expression of the *pcbAB* gene in *Penicillium chrysogenum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:7113–7124.  
682 doi: 10.1007/s00253-014-5760-1

683 Chang S-C, Lei W-Y, Tsai Y-C, Wei Y-H (1998) Isolation, purification, and characterization of the  
684 PR oxidase from *Penicillium roqueforti*. *Appl Environ Microbiol* 64:5012–5015.

685 Cheeseman K, Ropars J, Renault P, Dupont J, Gouzy J, Branca A, Abraham A-L, Ceppi M, Conseiller  
686 E, Debuchy R, Malagnac F, Goarin A, Silar P, Lacoste S, Sallet E, Bensimon A, Giraud T, Brygoo Y  
687 (2014) Multiple recent horizontal transfers of a large genomic region in cheese making fungi. *Nat*

688 Commun. doi: 10.1038/ncomms3876

689 Colombo L, Gennari C, Potenza D, Scolastico C, Aragazzini F, Gualandris R (1982) 6-Farnesyl-5,7-  
690 dihydroxy-4-methylphthalide oxidation mechanism in mycophenolic acid biosynthesis. *J Chem Soc*  
691 [Perkin 1] 365–373. doi: 10.1039/P19820000365

692 Diamond MS, Zachariah M, Harris E (2002) Mycophenolic acid inhibits dengue virus infection by  
693 preventing replication of viral RNA. *Virology* 304:211–221. doi: 10.1006/viro.2002.1685

694 Domínguez-Santos R, García-Estrada C, Kosalková K, Prieto C, Santamarta I, Martín J-F (2015)  
695 PcFKH1, a novel regulatory factor from the forkhead family, controls the biosynthesis of penicillin in  
696 *Penicillium chrysogenum*. *Biochimie* 115:162–176. doi: 10.1016/j.biochi.2015.05.015

697 Domínguez-Santos R, Martín J-F, Kosalková K, Prieto C, Ullán RV, García-Estrada C (2012) The  
698 regulatory factor PcRFX1 controls the expression of the three genes of  $\beta$ -lactam biosynthesis in  
699 *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genet Biol* 49:866–881. doi: 10.1016/j.fgb.2012.08.002

700 Engel G, Milczewski KE von, Prokopek D, Teuber M (1982) Strain-specific synthesis of  
701 mycophenolic acid by *Penicillium roqueforti* in blue-veined cheese. *Appl Environ Microbiol* 43:1034–  
702 1040.

703 Epinette WW, Parker CM, Jones EL, Greist MC (1987) Mycophenolic acid for psoriasis. *J Am Acad*  
704 *Dermatol* 17:962–971. doi: 10.1016/S0190-9622(87)70285-0

705 Finoli C, Vecchio A, Galli A, Dragoni I (2001) Roquefortine C occurrence in blue cheese. *J Food Prot*  
706 64:246–251.

707 Fontaine K, Hymery N, Lacroix MZ, Puel S, Puel O, Rigalma K, Gaydou V, Coton E, Mounier J  
708 (2015a) Influence of intraspecific variability and abiotic factors on mycotoxin production in  
709 *Penicillium roqueforti*. *Int J Food Microbiol*. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.021

710 Fontaine K, Mounier J, Coton E, Hymery N (2015b) Individual and combined effects of roquefortine  
711 C and mycophenolic acid on human monocytic and intestinal cells. *World Mycotoxin J* 1–11. doi:  
712 10.3920/WMJ2014.1861

713 Fontaine K, Passeró E, Vallone L, Hymery N, Coton M, Jany J-L, Mounier J, Coton E (2015c)  
714 Occurrence of roquefortine C, mycophenolic acid and aflatoxin M1 mycotoxins in blue-veined  
715 cheeses. *Food Control* 47:634–640. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.07.046

716 Frisvad JC, Smedsgaard J, Larsen TO, Samson RA (2004) Mycotoxins, drugs and other extrolites  
717 produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Stud Mycol* 49:201–241.

718 Gillot G, Jany J-L, Coton M, Le Floch G, Debaets S, Ropars J, López-Villavicencio M, Dupont J,  
719 Branca A, Giraud T, Coton E (2015) Insights into *Penicillium roqueforti* morphological and genetic  
720 diversity. *PLoS ONE* 10:e0129849. doi: 10.1371/journal.pone.0129849

721 Goarin A, Silar P, Malagnac F (2014) Gene replacement in *Penicillium roqueforti*. *Curr Genet*  
722 61:203–210. doi: 10.1007/s00294-014-0456-8

723 Häggblom P (1990) Isolation of roquefortine C from feed grain. *Appl Environ Microbiol* 56:2924–  
724 2926.

725 Hansen BG, Genee HJ, Kaas CS, Nielsen JB, Regueira TB, Mortensen UH, Frisvad JC, Patil KR  
726 (2011) A new class of IMP dehydrogenase with a role in self-resistance of mycophenolic acid  
727 producing fungi. *BMC Microbiol* 11:202. doi: 10.1186/1471-2180-11-202

728 Hansen BG, Mnich E, Nielsen KF, Nielsen JB, Nielsen MT, Mortensen UH, Larsen TO, Patil KR  
729 (2012) Involvement of a natural fusion of a cytochrome P450 and a hydrolase in mycophenolic acid  
730 biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 78:4908–4913. doi: 10.1128/AEM.07955-11

731 Hidalgo PI, Ullán RV, Albillos SM, Montero O, Fernández-Bodega MÁ, García-Estrada C,  
732 Fernández-Aguado M, Martín J-F (2014) Molecular characterization of the PR-toxin gene cluster in  
733 *Penicillium roqueforti* and *Penicillium chrysogenum*: cross talk of secondary metabolite pathways.  
734 *Fungal Genet Biol* 62:11–24. doi: 10.1016/j.fgb.2013.10.009

735 Houbraken J, Frisvad JC, Samson RA (2011) Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium*  
736 *chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA Fungus Glob Mycol J* 2:87–95. doi:  
737 10.5598/imafungus.2011.02.01.12

738 Houbraken J, Frisvad JC, Samson RA (2010) Sex in *Penicillium* series *Roqueforti*. *IMA Fungus*  
739 1:171–180.

740 Hymery N, Vasseur V, Coton M, Mounier J, Jany J-L, Barbier G, Coton E (2014) Filamentous fungi  
741 and mycotoxins in cheese: a review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 13:437–456. doi: 10.1111/1541-  
742 4337.12069

743 Kavanagh F (1947) Activities of twenty-two antibacterial substances against nine species of bacteria. *J*  
744 *Bacteriol* 54:761–766.

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

748 Kosalková K, Domínguez-Santos R, Coton M, Coton E, García-Estrada C, Liras P, Martín JF (2015)  
749 A natural short pathway synthesizes roquefortine C but not meleagrín in three different *Penicillium*  
750 *roqueforti* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 1–12. doi: 10.1007/s00253-015-6676-0

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

753 Le Bars J, Le Bars P (1989) Espèces fongiques des ensilages de maïs. Risques mycotoxiques. *Rec*  
754 *Med Vet* 165:433–439.

755 Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative  
756 PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25:402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262

757 Llanos A, François JM, Parrou J-L (2015) Tracking the best reference genes for RT-qPCR data  
758 normalization in filamentous fungi. *BMC Genomics* 16:71. doi: 10.1186/s12864-015-1224-y

759 Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 1st edn. Cold  
760 Spring Harbor Laboratory Press, New-York

761 Martín JF, Coton M (2015) Blue cheese: microbiota and fungal metabolites. In: Frias J, Martínez-

762 Villaluenga C, Peñas E (eds) *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*. Elsevier, New York  
763 (In press),

764 Muth WL, Nash CH (1975) Biosynthesis of mycophenolic acid: purification and characterization of S-  
765 Adenosyl-l-methionine: demethylmycophenolic acid O-methyltransferase. *Antimicrob Agents*  
766 *Chemother* 8:321–327. doi: 10.1128/AAC.8.3.321

767 Nicoletti R, De Stefano M, De Stefano S, Trincone A, Marziano F (2004) Antagonism against  
768 *Rhizoctonia solani* and fungitoxic metabolite production by some *Penicillium* isolates.  
769 *Mycopathologia* 158:465–474. doi: 10.1007/s11046-004-3712-5

770 Nielsen KF, Sumarah MW, Frisvad JC, Miller JD (2006) Production of metabolites from the  
771 *Penicillium roqueforti* complex. *J Agric Food Chem* 54:3756–3763.

772 O’Brien M, Nielsen KF, O’Kiely P, Forristal PD, Fuller HT, Frisvad JC (2006) Mycotoxins and other  
773 secondary metabolites produced in vitro by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti*  
774 Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *J Agric Food Chem* 54:9268–9276. doi:  
775 10.1021/jf0621018

776 Pitt JI, Hocking AD (2009) *Fungi and Food Spoilage*, 3rd edn. Springer, London

777 Regueira TB, Kildegaard KR, Hansen BG, Mortensen UH, Hertweck C, Nielsen J (2011) Molecular  
778 basis for mycophenolic acid biosynthesis in *Penicillium brevicompactum*. *Appl Environ Microbiol*  
779 77:3035–3043. doi: 10.1128/AEM.03015-10

780 Ropars J, Rodríguez de la Vega RC, López-Villavicencio M, Gouzy J, Sallet E, Dumas É, Lacoste S,  
781 Debuchy R, Dupont J, Branca A, Giraud T (2015) Adaptive horizontal gene transfers between  
782 multiple cheese-associated fungi. *Curr Biol* 25:2562–2569. doi: 10.1016/j.cub.2015.08.025

783 Salame TM, Ziv C, Hadar Y, Yarden O (2010) RNAi as a potential tool for biotechnological  
784 applications in fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:501–512. doi: 10.1007/s00253-010-2928-1

785 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold  
786 Spring Harbor Laboratory Press, New-York

787 Schmitt EK, Bunse A, Janus D, Hoff B, Friedlin E, Kürnsteiner H, Kück U (2004) Winged helix  
788 transcription factor CPC1 is involved in regulation of  $\beta$ -lactam biosynthesis in the fungus  
789 *Acremonium chrysogenum*. *Eukaryot Cell* 3:121–134. doi: 10.1128/EC.3.1.121-134.2004

790 Scott PM, Kanhere SR (1979) Instability of PR toxin in blue cheese. *J - Assoc Off Anal Chem*  
791 62:141–147.

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

794 Scudamore KA, Livesey CT (1998) Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and  
795 silage: a review. *J Sci Food Agric* 77:1–17.

796 Still PE, Smalley EB, Strong FM, Wei R-D (1972) Mycotoxin from *Penicillium roqueforti* isolated  
797 from toxic cattle feed. In: *Federation Proceedings*. p 733

798 Storm I m. l. d., Kristensen N b., Raun B m. l., Smedsgaard J, Thrane U (2010) Dynamics in the

799 microbiology of maize silage during whole-season storage. *J Appl Microbiol* 109:1017–1026. doi:  
800 10.1111/j.1365-2672.2010.04729.x

801 Torrenegra RD, Baquero JE, Calderon JS (2005) Antibacterial activity and complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C  
802 NMR assignment of mycophenolic acid isolated from *Penicillium verrucosum*. *Rev Latinoam*  
803 *Quimica* 33:76–81.

804 Tressler RJ, Garvin LJ, Slate DL (1994) Anti-tumor activity of mycophenolate mofetil against human  
805 and mouse tumors in vivo. *Int J Cancer* 57:568–573. doi: 10.1002/ijc.2910570421

806 Ullán RV, Campoy S, Casqueiro J, Fernández FJ, Martín JF (2007) Deacetylcephalosporin C  
807 production in *Penicillium chrysogenum* by expression of the isopenicillin N epimerization, ring  
808 expansion, and acetylation genes. *Chem Biol* 14:329–339. doi: 10.1016/j.chembiol.2007.01.012

809 Ullán RV, Godio RP, Teijeira F, Vaca I, García-Estrada C, Feltre R, Kosalkova K, Martín JF (2008)  
810 RNA-silencing in *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*: validation studies using  
811  $\beta$ -lactam genes expression. *J Microbiol Methods* 75:209–218. doi: 10.1016/j.mimet.2008.06.001

812 Usleber E, Dade M, Schneider E, Dietrich R, Bauer J, Märtilbauer E (2008) Enzyme immunoassay for  
813 mycophenolic acid in milk and cheese. *J Agric Food Chem* 56:6857–6862. doi: 10.1021/jf801063w

814 van den Berg MA, Albang R, Albermann K, Badger JH, Daran J-M, Driessen AJM, Garcia-Estrada C,  
815 Fedorova ND, Harris DM, Heijne WHM, Joardar V, Kiel JAKW, Kovalchuk A, Martín JF, Nierman  
816 WC, Nijland JG, Pronk JT, Roubos JA, van der Klei IJ, van Peij NNME, Veenhuis M, von Döhren H,  
817 Wagner C, Wortman J, Bovenberg RAL (2008) Genome sequencing and analysis of the filamentous  
818 fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nat Biotechnol* 26:1161–1168. doi: 10.1038/nbt.1498

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

821 Zhang W, Cao S, Qiu L, Qi F, Li Z, Yang Y, Huang S, Bai F, Liu C, Wan X, Li S (2015) Functional  
822 characterization of MpaG', the O-methyltransferase involved in the biosynthesis of mycophenolic  
823 acid. *ChemBioChem* 16:565–569. doi: 10.1002/cbic.201402600

824

825 **Table 1:** Primers and corresponding genes used in the present study for RT-qPCR analysis.

Gene	Primer	Sequence (5' – 3')	T <sub>m</sub> (°C)	Fragment size (bp)	Reference
<i>β-actin</i>	<i>β-actin-F</i>	CTGGCCGTGATCTGACCGACTAC	85	457	(Domínguez-Santos et al. 2012)
	<i>β-actin-R</i>	GGGGGAGCGATGATCTTGACCT	85		
<i>pfkA</i>	<i>pfkA-F</i>	GGTTTCGTCATCGAGGTGAT	84	188	This study
	<i>pfkA-R</i>	GCGACGATAACGATTGTACG	84		
<i>psm1</i>	<i>psm1-F</i>	TTCGGAGATGCGTACTTCAC	82.5	162	This study
	<i>psm1-R</i>	TTTAGACGTGCGCAAAACAC	82.5		
<i>sac7</i>	<i>RhoGTP-F</i>	AATGGGAAAACCTCCCAATC	84.5	246	This study
	<i>RhoGTP-R</i>	GTCGTAATCGCGGAAGAACT	84.5		
<i>fis1</i>	<i>fis1-F</i>	GCCCAATACGAGAAAGAAGG	83	201	This study
	<i>fis1-R</i>	GCCGTAGTTCCTAGCTTGA	83		
<i>ubc6</i>	<i>ubc6-F</i>	CTTTCAAACGGCTCACTCG	79	151	This study
	<i>ubc6-R</i>	CCCCAGTACTGTCCGTTTTTC	79		
<i>mpaC</i>	<i>rt-mpa for</i>	CATACGGCTCGCTGTCTGTA	84.5	187	This study
	<i>rt-mpa rev</i>	GCTGTGAGGGAGTTGAAAGC	84.5		

826

**Table 2.** Analysis of genes and putative gene products in the MPA biosynthesis gene cluster of *P. roqueforti* FM164.

Gene	Location in nucleotide sequence	Size (bp) <sup>a</sup>	Corresponding protein	Size (aa) <sup>b</sup>	Conserved domain <sup>c</sup>	Putative activity	Accession number	% identity <sup>d</sup>	E value	Organism	Reference
mpaA	Proq05g069820	1126	MpaA	325	PT_UbiA superfamily	UbiA prenyltransferase family	CDM36728	80	0.0	<i>P. brevicompactum</i>	(Zhang et al. 2015)
mpaB	Proq05g069810	949	MpaB	298	DUF2236 superfamily	Domain of unknown function DUF2236	CDM36727	83	3e-171	<i>P. brevicompactum</i>	(Zhang et al. 2015)
mpaC	Proq05g069800	7715	MpaC	2477	SAT, KS, AT, PP, MT, esterase	$\beta$ -ketoacylsynthase	CDM36726	72	0.0	<i>P. brevicompactum</i>	(Regueira et al. 2011)
mpaDE	Proq05g069780a	3710	MpaDE	932	p450 superfamily/Lactamase B superfamily	Cytochrome P450/hydrolyase	CDM36724	79	0.0	<i>P. brevicompactum</i>	(Zhang et al. 2015)
mpaF	Proq05g069770	1708	MpaF	526	TIM_phosphate_binding superfamily	Probable inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	CDM36723	98 92	0.0 0.0	<i>P. rubens</i> <i>P. brevicompactum</i>	(van den Berg et al. 2008) (Regueira et al. 2011)
mpaG	Proq05g069760	1249	MpaG	398	AdoMet_MTases superfamily	O-methyltransferase, caffeic acid-type	CDM36722	77	0.0	<i>P. brevicompactum</i>	(Zhang et al. 2015)
mpaH	Proq05g069750	1479	MpaH	433	Abhydrolase_6	unnamed protein product	CDM36721	83 82	0.0 0.0	<i>P. expansum</i> <i>P. brevicompactum</i>	(Ballester et al., 2015) (Regueira et al. 2011)

829 <sup>a</sup> bp, base pairs, <sup>b</sup> aa, amino acids, <sup>c</sup> Identified by the “NCBI Conserved Domain Search” tool, <sup>d</sup> Identical amino acid (aa) percentage between the predicted sequence and the closest sequence in  
830 Genbank using BlastP

831 **Figure legends**

832

833 **Fig. 1.** Comparison of the MPA biosynthetic gene cluster organization between the available  
834 *P. brevicompactum* cluster sequences (A, B) and *P. roqueforti* (C) (this study).

835

836 **Fig. 2.** Production of MPA by the *P. roqueforti* transformants (CI1 to CI3) in comparison  
837 with the untransformed control strain (F43-1) quantified using the  $[M-H^+]-H_2O$  m/z 303.12  
838 ion specific for MPA. Data presented corresponds to two biological replicates (clear and dark  
839 grey bars, respectively) performed in triplicate. Error bars represent standard deviation.  
840 Statistical significance is represented as follows: \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$ .

841

842 **Fig. 3.** Relative *mpaC* gene expression for the CI2 *mpaC* silenced transformant compared to  
843 the *P. roqueforti* control strain (F43-1) based on 3 reference genes (*pfkA*, *psm1*, *sac7*). Error  
844 bars represent standard deviation. Significant different mean ( $P < 0.05$ ) is represented by an  
845 asterisk.

846



847 **A**

848 ***P. brevicompactum* IBT23078 (25,486 bp) according to Hansen et al., 2012.**



850 **B**

851 ***P. brevicompactum* NRRL 864 (25,483 bp) according to Zhang et al., 2015.**



853 **C**

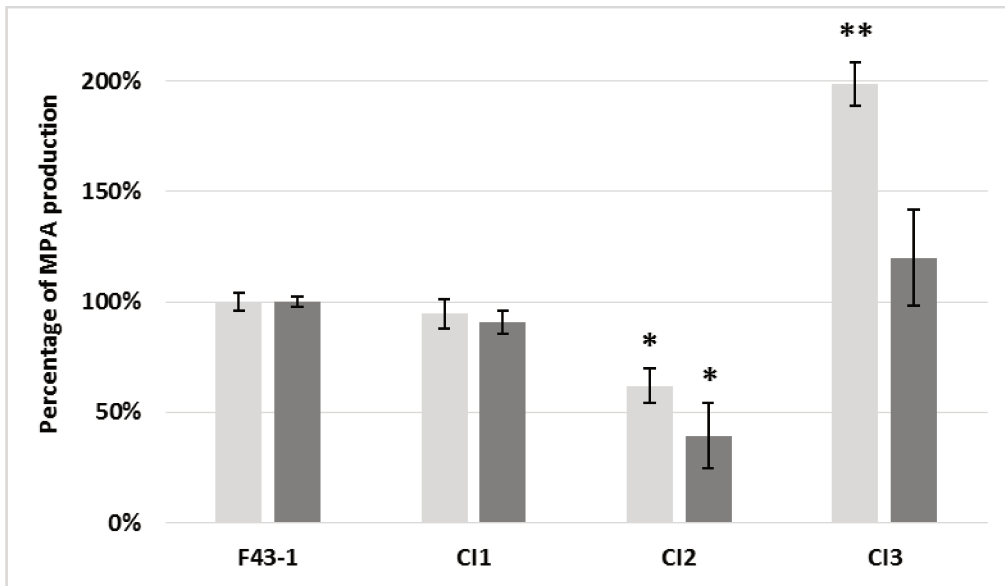
854 ***P. roqueforti* FM164 (23,470 bp) (this study).**



856 1 kb

857 **Fig. 1.**

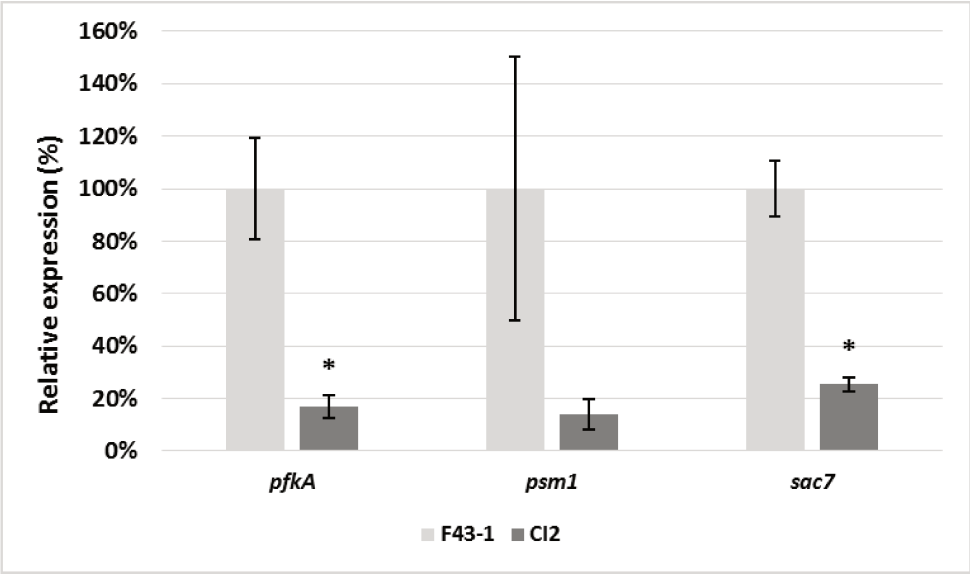
858



859

860 **Fig. 2.**

861



862

863 **Fig. 3.**

864 **Supplementary Table S1.** *P. roqueforti* cheese isolates included in the present study and  
865 their origin.  
866

Isolate number	Cheese designation (if PDO or PGI*)	Origin	Other isolate number
F43-1	Roquefort	France	UBOCC-A-113020
PTX.PR.27.2	Bleu des Causses	France	
FM164	Gorgonzola	Italy	UBOCC-A-113014
CBS 221.30 <sup>NT</sup>	Roquefort	USA	ATCC 10110; ATCC 1129; CECT 2905; IBT 6754; IFO 5459; IMI 024313; LSHB; UBOCC-A-108110

867  
868 \* Protected Designation of Origin (PDO) or Protected Geographical Indication (PGI)

869 **Supplementary Table S2:** Information about the primers used in the present study for MPA  
870 gene cluster amplification and sequencing.

871

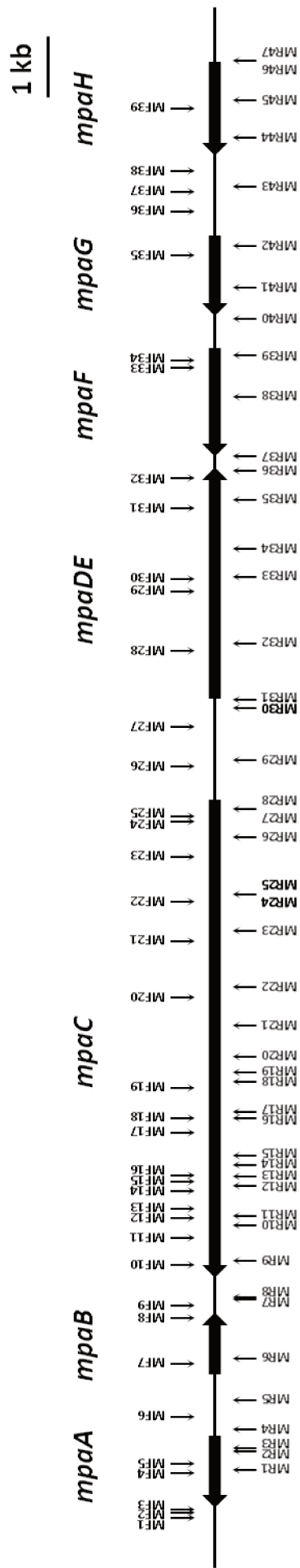
Primer	Sequence (5' - 3')	T <sub>m</sub> (°C)	Strain <sup>a</sup>	Use <sup>b</sup>
MF1	CCAGGCTTTCGTTTTCTCTG	63.8	1	A & S
MF2	CCAGGCTTTCGTTTTCTCTG	63.8	2	A & S
MF3	CGACTTTCCTCCACTGCACTA	65.1	1 & 2	A & S
MF4	CTGCTGAATACGGGTCGTTT	63.9	2	A & S
MF5	AATATTAAGTCCAGCATTTTCAC	57.8	1 & 2	A & S
MF6	CGAGGAATGCTCCGTCTTAC	63.7	2	A & S
MF7	CTATAGACGACTTAAACAGCTACA	56.3	1 & 2	A & S
MF8	GGTGGGATTGCAGTTCCTT	63.9	2	A & S
MF9	CTACCTAACACCCCCACGAC	63.2	1	A & S
MF10	ACAAGGTCATCGCTTGTTCC	64.0	1	A & S
MF11	GCAGTAAAAGCCAGCGTCAT	64.2	2	A & S
MF12	GTATGAAATGGAGTTATTACAAGG	57.3	1 & 2	A & S
MF13	GGAGCAAATCTCCAGAGCAG	64.0	1	A & S
MF14	GAGATTTCCGGTAGCATGGA	63.9	1	A & S
MF15	ACAAGCGATGGCGAGATATC	64.0	2	A & S
MF16	GGATTTTAACCTGCCGACCG	67.4	1 & 2	S
MF17	TGGGAAGGAGCTAGGTGAGA	63.9	1	A & S
MF18	CATTGTCCTGGCTTCATCA	62.4	2	A & S
MF19	GAAGTAGTCTGCATAATTGGTAAC	57.5	1 & 2	A & S
MF20	AGATGCGTACTGTATAGAGAAGAG	57.5	1 & 2	A & S
MF21	GGGCAGAATAGAGGAGACCA	63.1	2	A & S
MF22	TTCTCAGTATAGTCCTCAGATCC	58.0	1 & 2	A & S
MF23	GCTGTGAGGGAGTTGAAAGC	63.9	1	A & S
MF24	ATTCCAAAAGTCAACTAGATGTT	57.4	1 & 2	A & S
MF25	TGGAGATCCATTCTCAAAACG	63.9	1 & 2	A & S
MF26	AATCTCAATACAGAAGGTGAGAC	57.9	1 & 2	A & S
MF27	TTTGGAGGTTGCGTAGAGGT	63.5	1 & 2	A & S
MF28	GCACAAGTATACGTACAAGACAT	57.4	1 & 2	A & S
MF29	CGAGGTTTCAGACGAGAAGG	63.9	1 & 2	A & S
MF30	ATGTCATGCGTACAATTATGTAT	57.5	1 & 2	A & S
MF31	CGTCCACTTTCCTACTGTCT	64.2	1 & 2	A & S
MF32	ATTCTTGCTCATGATAGTACCTT	57.5	1 & 2	A & S
MF33	TGTTCCGGTACAGTGTCCAT	64.3	1 & 2	A & S
MF34	ACGATTAGAGAGAACGACCTAT	57.5	1 & 2	A & S
MF35	TCACAATCTATCCCCTTACC	57.9	1 & 2	A & S
MF36	GCGGTAATACGGTGTAAGGC	63.1	1 & 2	S
MF37	GGTGACTGGTGCTAGGTCA	61.4	1 & 2	A & S
MF38	GAAAGAGCTGATGTGAAACT	56.0	1	A & S

MF39	ACGTCATTTCCGCCAGAGAGT	63.8	1 & 2	A & S
MR1	GGCTTAATGCTGCCTTTGAC	63.6	1	A & S
MR2	CCTGTGCTTTGTTCACTGCT	63.1	2	A & S
MR3	GCACCATTCCAAGCTCTCTC	63.9	2	A & S
MR4	GGACAGCCCGATTTTCTAGC	64.8	1 & 2	A & S
MR5	GGGTTGTATCGTGGGGCTAA	65.7	1 & 2	S
MR6	GTCTGTCATCTTAGCCATAGACT	58.1	1 & 2	A & S
MR7	AAGTGCGTCCCAAGATTTGC	66.2	1 & 2	S
MR8	TGGACCCCATCTATTCCAAA	64.0	2	A & S
MR9	GTTAGTCCAAACTATCAGATCC	55.9	1	A & S
MR10	GATTCCTGCCCATCAGTGTT	63.9	1 & 2	A & S
MR11	GTAAGTTCAAATTCATCTTTTGTC	57.5	2	A & S
MR12	AGTAGCCCTCCCTCGCTCT	64.3	1	A & S
MR13	ACCAAGAATCTCCTCGAGCA	63.9	2	A & S
MR14	GGACGGGGTATCGCTAATTT	63.7	1	A & S
MR15	CCAACTGGTCAACTCGTGC	64.5	1 & 2	S
MR16	TGTTGCAGTCCAAGAGATGC	64.1	1 & 2	A & S
MR17	CTGGCCAAGCTGAACAACAA	66.3	1 & 2	A & S
MR18	TGAGGATCATCTGGCATCAA	64.4	2	A & S
MR19	GTCATTCTCGATATTTAGCAGTAG	57.7	1 & 2	A & S
MR20	GCCGTTAACACCCAAGATGT	63.7	1	A & S
MR21	CTATCCCATCGAAGCCTGT	65.1	1 & 2	S
MR22	GAGCATTTCACAAGAACTTTAC	57.1	1 & 2	A & S
MR23	CTCGAACAGGTCACCCATCA	66.3	1 & 2	S
MR24	CTGCAAGTAGCATATGAAGC	57.7	1 & 2	A & S
MR25	GAGTCCATGGATCCACAACA	63.6	2	A & S
MR26	CCAGCGGACCATGACTATCT	64.0	1 & 2	S
MR27	GGGTTCTTATCTGATATTCTTGA	57.8	1 & 2	A & S
MR28	TTGACGAGCTTCCCTCCTTA	63.7	1	A & S
MR29	GCATCAAAATGCCCAAAGAT	63.6	1 & 2	A & S
MR30	AGGGCAGTATATATTAAGAATGG	56.9	1 & 2	A & S
MR31	CGTGGCAGTGTTAGAAAGCA	64.0	1 & 2	A & S
MR32	CAAGTATAGACAACAAACGTAGC	57.2	1 & 2	A & S
MR33	CCCGATGAACTAAGAGATTATAC	57.4	1 & 2	A & S
MR34	GCGATATTCTTCCCCAGACA	63.9	1 & 2	A & S
MR35	GAGATTTCCCGCACTTTCCG	67.8	1 & 2	S
MR36	AACAGCCACTTCGTCTGCTT	63.9	1 & 2	A & S
MR37	AGTACACCAGACCAAAAGTTAGT	57.4	1 & 2	A & S
MR38	ATCCCTGATCTCCCTGCTCT	64.1	1 & 2	S
MR39	ACTTACAATGACTTCCTGATTTT	57.4	1 & 2	A & S
MR40	ATCGGCAAATCTAGGCTTCA	63.5	1 & 2	A & S
MR41	CGTGCTTCAGGATCGAGAAC	64.9	1 & 2	S

MR42	TATTCAACACACTTTCTGGTCT	57.8	1 & 2	A & S
MR43	GTTCCGTCCGACCCAAATTC	67.5	1 & 2	A & S
MR44	GTCTGAGGGAAGAGTGAAAG	58.0	1	A & S
MR45	GCCTATCTACATCCACGCCT	63.0	1 & 2	S
MR46	TATTTTCCTCTTCATTCTG	55.8	1 & 2	A & S
MR47	TCTGCATGCAATTCCTGTT	63.2	1 & 2	A & S

872 <sup>a</sup> primers used for PTX.PR.27.2 (1) and/or CBS 221.30<sup>NT</sup> (2) strains

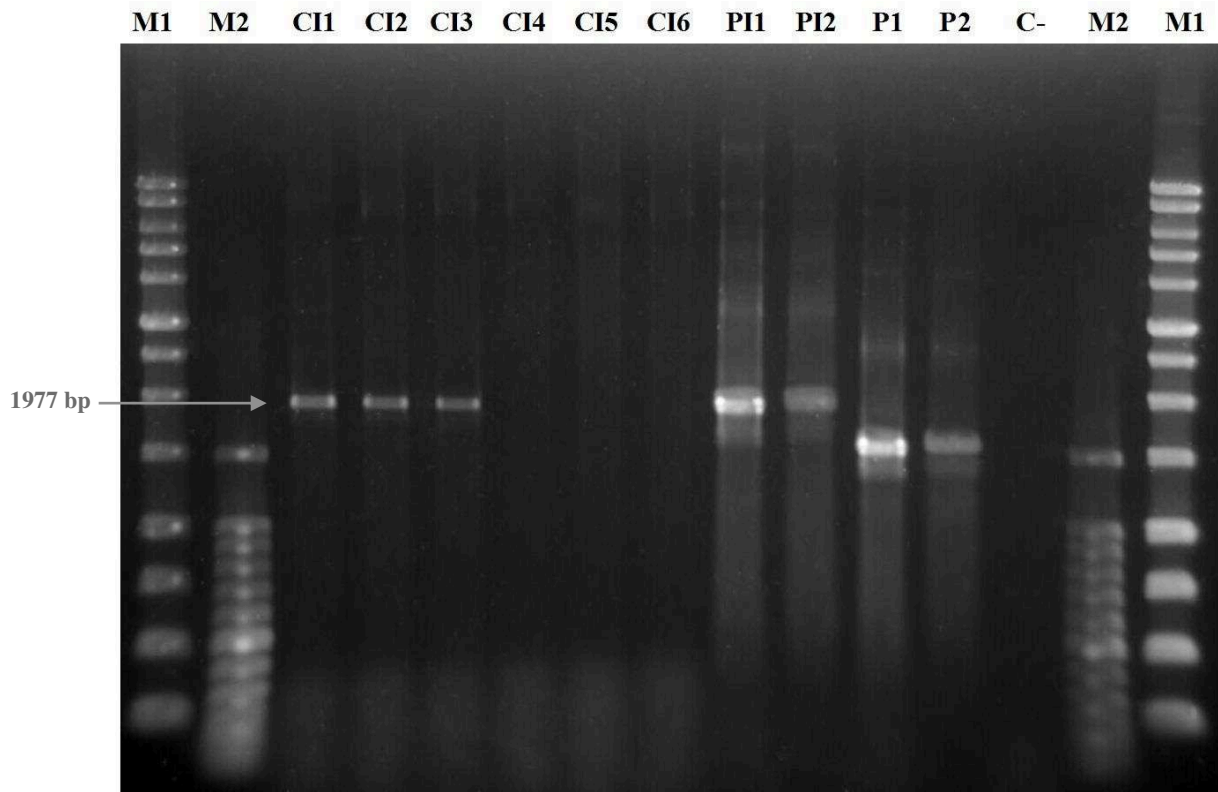
873 <sup>b</sup> primers used for amplification (A) and/or sequencing (S)



**Supplementary Fig. S1.** Primers and their corresponding positions for amplification and/or sequencing of the MPA gene cluster in *P. roqueforti*.

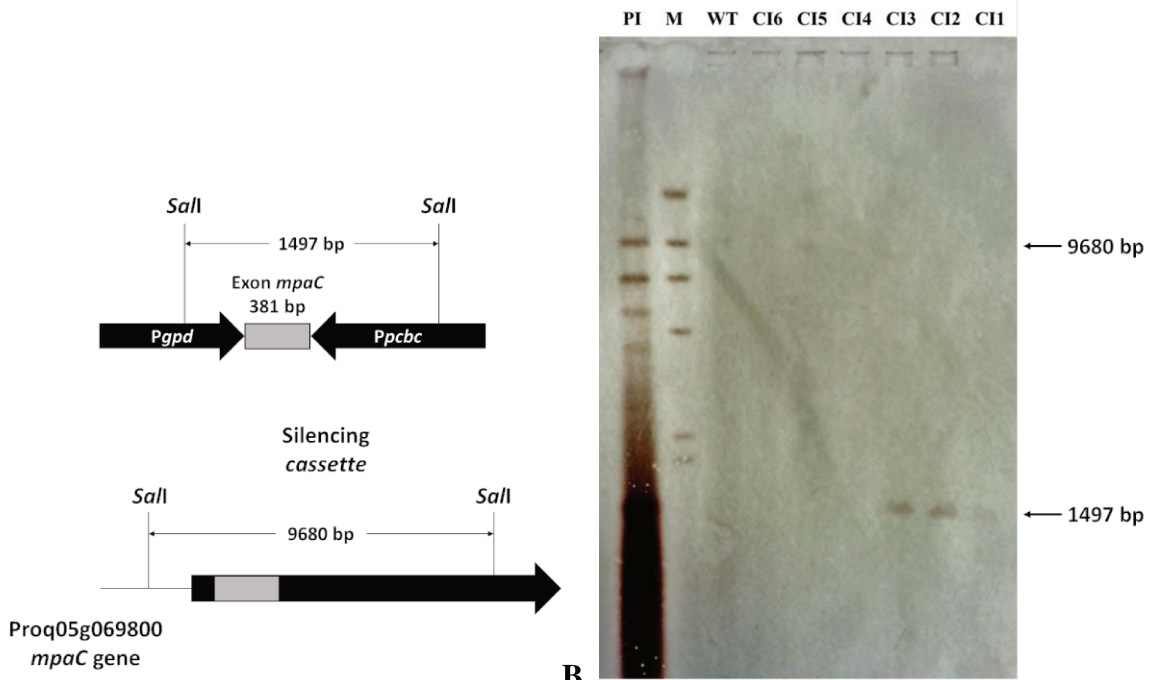
874  
 875  
 876  
 877  
 878





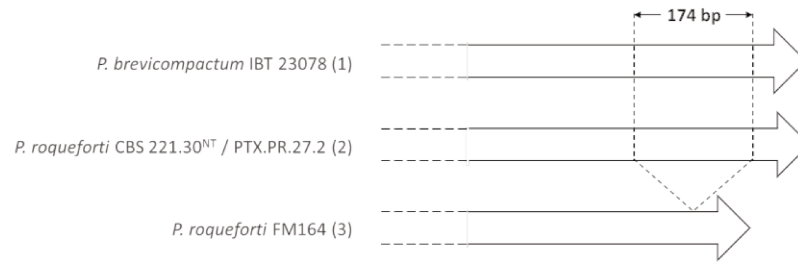
879

880 **Supplementary Fig. S2.** PCR amplification gel electrophoresis performed to confirm proper  
 881 plasmid integration in *P. roqueforti* transformants. M1 & M2: DNA ladders (Benchtop 1kb  
 882 and 100bp DNA Ladder, Promega, Fitchburg, WI, USA). CI1 to CI6: transformants. PI1 &  
 883 PI2: plasmid with insert. P1 & P2: plasmid without insert. C-: negative control.  
 884



885 **A**  
 886 **Supplementary Fig. S3.** Silencing strategy for the *mpaC* gene silencing in *P. roqueforti*.  
 887 Structure of the *mpaC* silencing cassette and map of the relative position of the endogenous *mpaC*  
 888 gene in *P. roqueforti* genome, showing the relevant restriction sites (A) and Southern  
 889 hybridization (B) indicating the 9680- and 1497-bp bands corresponding to the endogenous  
 890 gene and the correct integration of the cassette, respectively. PI: plasmid with insert. M:  $\lambda$ -  
 891 HindIII molecular weight marker. WT: untransformed parental strain F43-1 (Wild-Type). CI1  
 892 to CI6: transformants.  
 893

894 (A) 3'-end of mpaC



895

896

(B) C-terminal region of MpaC

897 (1) ----- QIRVGRYNTP TFLIHGTSDD LVPCAQTEST HGALTASGVE AELRVVQEAA HLFDLYPASH AGQEAKAAVA EGYEFLRRHV QL  
 (2) ----- QIRIGRYRTP TFMVHGTSDS LVPCAQTEST YNALTQNGIE ADIRVVQGAV HLFDLYPSSH AGQNAKEAVA DGYEFLKRHI HSKGYSDKD  
 (3) ----- QIRIGRYRTP TFMVHGTSDS LVPCAQTEST YNALTQNGIE ADIRVVQGAI EVL-LYLQHP --ERARKWIC SGSLTLEI

897

898

899 **Supplementary Fig. S4.** Location of the 3'-174 bp deletion in the *mpaC* gene of *P.*  
 900 *roqueforti* FM164 and corresponding C-terminal region amino acid sequence modifications.  
 901 (1): *P. brevicompactum* IBT 23078; (2): *P. roqueforti* CBS 221.30<sup>NT</sup> / PTX.PR.27.2; (3): *P.*  
 902 *roqueforti* FM164.

Les faits marquants de cette étude sont les suivants :

- Identification in silico d'un cluster (23,5 kb) de 7 gènes potentiellement impliqué dans la production d'acide mycophénolique chez *P. roqueforti*
- Confirmation de l'implication du cluster dans la production d'acide mycophénolique par ARN interférence ciblant le gène *mpaC*, et ayant conduit à une réduction d'expression du gène mesuré par RT-qPCR et de production d'acide mycophénolique
- Confirmation de la fonctionnalité de la voie de biosynthèse de l'acide mycophénolique chez *P. roqueforti*
- Mise en évidence d'une délétion de 174 pb au niveau du gène *mpaC* chez plusieurs souches de *P. roqueforti* ne produisant pas des niveaux détectables d'acide mycophénolique



## **DISCUSSION & CONCLUSIONS**



Le premier volet de cette thèse avait pour objectif d'obtenir une meilleure définition taxonomique de l'espèce *Penicillium roqueforti*. En effet, si un certain nombre d'études se sont intéressées à la diversité fongique associée aux fromages (Callon et al., 2006; Flórez and Mayo, 2006; Gente et al., 2007; Hermet et al., 2012; Ropars et al., 2012), la biodiversité des *P. roqueforti* associés aux fromages, et plus particulièrement aux fromages à pâte persillée, n'avait été que peu étudiée jusqu'alors.

Dans un premier temps, une collection d'isolats de *P. roqueforti* issus de fromages à pâte persillée du monde entier a été mise en place, il s'agit, à notre connaissance, de la plus vaste collection décrite à ce jour. Afin d'améliorer la représentativité de cette collection de travail, des souches de *P. roqueforti* isolées de substrats non-fromagers tels que l'ensilage, différents fruits (prune, abricot, pomme), le pain ou encore la viande ont également été intégrés, l'objectif étant également de pouvoir comparer par la suite des isolats d'origine fromagère et non-fromagère.

A partir de cette collection de travail comportant plus de 180 isolats de *P. roqueforti*, une étude réalisée sur différents milieux de culture classiquement utilisés au sein du genre *Penicillium* a permis de mettre en évidence l'existence d'une importante diversité morphologique avec un minimum de 9 morphologies distinctes observées.

Dans ce contexte, les isolats de *P. roqueforti* étant associés à des niches écologiques diverses et présentant de surcroît des morphologies distinctes, la question de l'existence de plusieurs espèces au sein de l'espèce actuelle *P. roqueforti* s'est posée. Cette question était d'autant plus légitime qu'il existait toujours une confusion dans la littérature quant aux dénominations attribuées aux souches « technologiques » telles que *P. glaucum*, *P. stilton* ou encore *P. gorgonzolae*, du fait de leurs différences morphologiques.

Afin de répondre à ce premier questionnement, et en s'appuyant sur des études phylogénétiques précédemment réalisées chez des champignons filamenteux, l'application de la méthode « Genealogical Concordance - Phylogenetic Species Recognition » (GC-PSR) a été entreprise. Onze loci ont été testés concernant leur polymorphisme de séquences. Les cinq régions les plus polymorphes (*βtub*, *cct8*, *cmd*, *mcm7* et *tsr1*) ont été séquencées chez la quasi-totalité des isolats de la collection. Leur utilisation a indiqué l'existence a priori d'une seule espèce phylogénétique. Cependant, un signal phylogénétique relativement faible a été mis en évidence pour ces gènes, limitant ainsi leur pouvoir résolutif dans le cadre de l'application de la méthode GC-PSR. Aussi, trois régions supplémentaires, recherchées et sélectionnées sur la base de leur polymorphisme de séquences lors d'une comparaison de plusieurs génomes de *P. roqueforti* (via une collaboration avec l'UMR 7205 - Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité, Equipe Diversité, Évolution végétale et Fongique et l'UMR 8079 - Ecologie, Systématique et



Evolution), ont également été séquencées sur un sous-ensemble de la collection (n = 30). Dans ce cas également, l'incongruence entre les topologies d'arbres construits indépendamment à partir des trois gènes a été mise en évidence indiquant qu'il n'existait pas, sur la base des régions analysées, de preuves en faveur de l'existence de différentes espèces au sein de l'entité *P. roqueforti*.

Il faut cependant noter que la méthode GC-PSR ne permet pas de détecter des espèces qui se seraient récemment différenciées. En effet, cette méthode requiert la coalescence des régions ciblées. La séparation entre espèces pourrait être trop récente et le processus de coalescence trop lent pour que les espèces puissent être reconnues comme distinctes. Cette étude a aussi mis en évidence qu'en fonction de la cible sélectionnée, *P. psychrosexualis* ne se distinguait pas systématiquement des isolats de *P. roqueforti* ou de ceux de *P. carneum*, deux espèces bien distinctes. *P. psychrosexualis* étant, par exemple, caractérisé comme *P. paneum* et *P. carneum* par la capacité à produire de la patuline (Houbraken et al., 2010), métabolite non recensé à ce jour comme étant produit par *P. roqueforti*, la question du caractère hybride de cette espèce reste ouverte. La génomique comparative pourrait être une solution permettant de répondre à cette question. Elle pourrait également permettre de s'affranchir des difficultés rencontrées lors du choix des gènes cibles en sélectionnant les gènes simple copie les plus intéressants pour les études phylogénétiques chez *Penicillium*.

Le deuxième objectif de cette première partie a consisté à décrire la diversité intraspécifique. L'utilisation de quatre marqueurs microsatellites a révélé une importante diversité génétique au sein de la collection, avec pas moins de 28 haplotypes détectés parmi les 164 isolats fromagers et non-fromagers. Malgré un nombre plus limité d'isolats (n = 24), ce sont, logiquement, au vu de la variété des substrats d'isolement, les *P. roqueforti* issus de substrats non fromagers qui ont montré la diversité génétique la plus importante (15 haplotypes). Il faut toutefois noter que cette étude a également mis en évidence que la production des fromages à pâte persillée au niveau mondial ne reposait pas uniquement sur l'utilisation d'un très faible nombre de souches technologiques associées à un nombre réduit de producteurs de ferments.

Les données obtenues ont également permis d'analyser la structure de population des *P. roqueforti* et ont clairement permis de mettre en évidence l'existence de trois populations hautement différenciées. Une étude similaire utilisant un plus grand nombre de marqueurs (n = 11) a également permis d'identifier jusqu'à six populations au sein d'une collection de 114 isolats de *P. roqueforti* dont 53 sont communs aux deux études (Ropars et al., 2014). La comparaison de ces deux études sur la base des isolats communs révèle une corrélation relativement forte entre les différents clusters décrits et montre en particulier que les isolats ne

provenant pas de fromages à pâte persillée sont presque tous regroupés dans un même cluster. Ces résultats indiquent bien que l'utilisation d'un plus grand nombre de marqueurs microsatellites permet une meilleure définition de la diversité intraspécifique et de la structure de population. Cependant, il faut noter que dans un contexte appliqué, les notions de coût et de rapidité d'analyse sont importantes. Il s'agit donc de trouver un équilibre entre finesse de l'analyse et aspects économiques. Les outils développés permettent une étude rapide et peu onéreuse de la biodiversité intraspécifique mais peuvent également être utilisés pour le suivi d'implantation de souches lors d'une fermentation.

De manière tout à fait intéressante, la structure de population décrite au sein de ces travaux de thèse est corrélée à différents types de fromages à pâte persillée laissant penser qu'une différenciation génétique aurait pu avoir lieu suite à la domestication d'individus provenant au départ d'une même population mais utilisés dans des procédés de fabrication différents. La différenciation la plus remarquable concerne la population constituée dans sa quasi-totalité d'isolats provenant de fromages de type Gorgonzola. En effet, cette population est caractérisée par des morphologies (couleur et texture) non observées au sein des autres populations et qui ont, entre autres, comme particularité de croître plus lentement comparativement aux autres morphologies décrites.

Une pression de sélection liée à des caractères phénotypiques pourrait avoir induit une différenciation de population à travers des balayages sélectifs (Chen et al., 2010; Smith and Haigh, 1974), en particulier au sein de populations d'organismes comme les champignons dans lesquelles les événements de reproduction sexuée n'apparaissent pas comme prédominants comparativement à la reproduction asexuée. Cependant, si des balayages sélectifs avaient eu lieu, la diversité présente au sein de chaque population devrait en principe être réduite (Kaplan et al., 1989; Sabeti et al., 2006), ce qui n'est pas le cas au sein de nos clusters. De même, la forte différenciation observée entre les populations ne peut être expliquée par la seule action de l'Homme étant donné la période probable de domestication. En effet, même si des historiens rapportent, au moins en France, une production de bleus depuis la période du Chalcolithique (Dumay, 1982), les mentions les plus anciennes dans la littérature faisant état d'une production avérée de fromages à pâte persillée remontent au neuvième siècle avec le Gorgonzola (879) tandis que le Roquefort n'est cité qu'à partir de 1070 (Fox and McSweeney, 2004). La différenciation génétique observée ne peut s'expliquer par une simple dérive génétique étant donné le caractère neutre des marqueurs ciblés et la période de coexistence des différentes technologies fromagères.

La seconde hypothèse, plus vraisemblable, est que différents producteurs de fromages à pâte persillée auraient domestiqué des populations de *P. roqueforti* déjà différenciées, possédant des caractéristiques métaboliques et morphologiques particulières.

Il faut noter que la comparaison des génomes de souches environnementales et fromagères provenant des différentes populations décrites au cours de cette thèse pourrait permettre d'évaluer si les génomes des souches fromagères comportent des preuves d'adaptation qui auraient mené à une potentielle spécialisation métabolique des souches. Ces preuves pourraient correspondre à l'expansion de certaines familles de gènes spécialisés dans l'exploitation du substrat fromager ou encore dans le gain de compétitivité ou bien à des transferts horizontaux favorables par exemple. Des preuves de domestication sous la forme de transferts horizontaux récents ont d'ailleurs été révélées au sein des génomes de *P. roqueforti* et *P. camemberti*, ces derniers conférant un avantage compétitif vis à vis d'autres micro-organismes sur matrice fromagère (Cheeseman et al., 2014; Ropars et al., 2015).

Il faut également remarquer qu'il aurait été intéressant d'intégrer un panel plus large de souches non fromagères étant donné la diversité révélée au sein de ce groupe de souches. Même si *P. roqueforti* est presque exclusivement utilisé dans la production de fromages à pâte persillée, cette démarche aurait ainsi permis d'améliorer la représentativité de la collection. Néanmoins, il apparaît difficile d'isoler des souches de *P. roqueforti* de leur environnement naturel. En effet, les réservoirs naturels de *P. roqueforti* ne sont pas connus et donc très vraisemblablement sous-échantillonnés. En réalité, la très grande majorité des souches disponibles dans les collections publiques ont été retrouvées par hasard, sans efforts particuliers de recherche et surtout très souvent isolées de matrices contaminées étant en rapport avec des activités humaines. De même, il aurait pu être intéressant d'intégrer des souches commerciales de *P. roqueforti* afin d'évaluer leur présence et leur répartition au sein de l'ensemble des fromages échantillonnés. Cette collection reste cependant, à notre connaissance, la plus vaste jamais réalisée et caractérisée, composée de surcroît d'isolats d'origines très diverses en termes de substrat mais aussi de zone géographique d'isolement.

Une partie de la diversité génétique ayant été, au moins en partie, corrélée à des différences phénotypiques et plus particulièrement morphologiques, la question de l'existence de propriétés fonctionnelles haplotype-dépendantes au sein de l'espèce *P. roqueforti* s'est par la suite posée. Dans ce contexte, une étude de différentes propriétés fonctionnelles d'un nombre important d'isolats représentatifs de *P. roqueforti* (55 isolats représentant les 28 haplotypes décrits en

première partie) a été réalisée en ciblant des métabolites ayant un impact positif (composés aromatiques) ou négatif (mycotoxines). L'objectif était d'évaluer à la fois l'indice de lipolyse, de protéolyse (2 activités enzymatiques fortement exprimées lors de l'affinage des fromages par cette espèce) mais également la production de métabolites secondaires volatiles et non volatiles.

Dans le cadre de cette partie de l'étude, un milieu « fromager » réalisé à partir d'un rétentat d'ultrafiltration a été utilisé afin de se rapprocher des conditions de production d'un fromage tout en restant en conditions contrôlées de laboratoire. Les cultures réalisées sur ce milieu ont servi par la suite à évaluer la protéolyse par dosage des groupements NH<sub>2</sub> libres au TNBS mais également à déterminer les arômes produits via la méthode HS-Trap couplée à de la GC-MS. Concernant le dosage de métabolites secondaires comprenant des mycotoxines, le milieu synthétique « YES » a été utilisé car décrit comme ayant un rapport C/N élevé supposé favoriser la production de ces métabolites. Les composés produits ont ensuite été détectés et quantifiés par LC-MS/Q-TOF grâce à une méthode développée au cours de cette thèse.

L'étude de l'indice de protéolyse a permis de mettre en évidence une diversité importante parmi les souches criblées. En particulier, un facteur proche de 5 a été déterminé entre la souche démontrant les plus fortes capacités en termes de protéolyse et la souche la moins protéolytique dans les conditions testées. Ces résultats sont en concordance avec de précédentes études démontrant la variabilité entre souches de *P. roqueforti* (Farahat et al., 1990; Larsen et al., 1998; Larsen and Jensen, 1999). Cependant, la comparaison des résultats avec les données de la littérature est rendue difficile du fait de l'emploi d'approches analytiques très souvent différentes et de l'absence de souches communes aux différentes études. En parallèle, la détermination du volatilome des 55 isolats de *P. roqueforti* obtenu sur une même matrice (rétentat d'ultrafiltration) a permis de mettre en évidence 52 molécules volatiles parmi lesquelles 16 méthyl-cétones (représentant une moyenne des aires de pics de 32% par rapport à la fraction totale), 8 acides (23%), 7 composés soufrés (13%), 6 alcools (16%), 5 aldéhydes (8%), 4 pyrazines (7%), 2 alcanes (<1%), 1 ester (<1%), 1 lactone (<1%), 1 phénol (<1%) and 1 terpène (<1%).

Les méthyl-cétones habituellement décrites comme majoritaires (50-75%) en qualité et en quantité au sein de la fraction volatile des fromages à pâte persillée (Dartey and Kinsella, 1971; Day and Anderson, 1965; Gallois and Langlois, 1990) le sont également dans cette étude, même si l'importance relative de ce groupe de composés apparaît plus faible. Pour les autres composés, le constat est le même, l'ordre habituellement observé au sein de fromages à pâte persillée est proche de celui retrouvé pour ces souches pures, mis à part peut-être pour les

composés soufrés présents de manière inattendue en quantité plus importante que dans la littérature (Gallois and Langlois, 1990). Il faut noter que nous avons travaillé avec des souches pures dans des conditions éloignées des conditions fromagères, en particulier en termes de température et d'interactions biotiques (ici faibles avec 1 seul ferment utilisé), ce qui peut expliquer les différences observées.

Afin d'évaluer de possibles liens entre volatilome et haplotypes, des ACP ont été réalisées en prenant en compte les précédents résultats de diversité génétique et plus particulièrement la structure de population. De manière intéressante, parmi les trois populations génétiquement différenciées, les isolats appartenant à la population 1 sont apparus comme étant répartis de manière plus regroupée vis-à-vis des autres populations. Cette répartition pourrait s'expliquer par la plus faible diversité génétique existant au sein de cette population 1. En effet, cette population contient 16 souches représentant 5 haplotypes parmi les 28 identifiés alors que la population 2 contient 34 souches représentant 19 profils génétiques différents. Cette diversité plus importante au sein de la population 2 composée d'isolats d'origine plus variée pourrait également expliquer la plus grande variabilité observée entre les isolats la composant.

A terme, il serait intéressant de se rapprocher encore davantage des conditions de production habituellement pratiquées pour les fromages à pâte persillée. De même, un suivi dynamique pourrait être envisagé ce qui apporterait des informations très intéressantes quant à la production optimale et maximale de certains composés d'intérêt ayant un impact positif ou négatif sur le produit fini. Dans notre cas, le choix de la période d'incubation était motivé par le fait que les périodes d'affinage en températures positives classiquement respectées pour les fromages à pâte persillée sont variables entre types de production et relativement longues dans un contexte expérimental. Dans ce contexte, la température d'incubation de 25°C présentait l'avantage majeur de se placer dans les conditions optimales de croissance concernant *P. roqueforti*. Cela permettait d'obtenir, quel que soit le substrat d'isolement, un développement rapide des différentes souches autorisant l'expression de leur potentiel métabolique sur le milieu testé, dans un temps imparti.

Pour compléter l'étude fonctionnelle, la détermination de la production de métabolites secondaires incluant des mycotoxines a permis de mettre à nouveau en évidence une large diversité fonctionnelle souche-dépendante.

Dans un premier temps, la non-production de patuline et de penitrem A par des souches de *P. roqueforti* a été confirmée. En réalité, ces mycotoxines sont souvent utilisées afin de distinguer les différentes espèces membres de la section *Roquefortorum*. En effet, *P. paneum*, *P. carneum* et *P. psychrosexualis* sont caractérisés par la production de patuline contrairement

à *P. roqueforti* (Houbraken et al., 2010). De même, la production de pénitrème A est caractéristique de l'espèce *P. carneum* même si Nielsen et al. (2006) ont rapportés la production de cette mycotoxine par quelques souches de *P. paneum*. Notre objectif, en particulier concernant la patuline, était de vérifier la non-production de cette mycotoxine par un nombre important de souches de *P. roqueforti* alors que quelques études avaient récemment rapportées une telle production (Cakmakci et al., 2015; Erdogan et al., 2003). Cependant, de l'aveu même des auteurs, l'affiliation des souches à l'espèce *P. roqueforti* l'était au sens large de Raper and Thom (1968) et non au sens maintenant admis de Boysen et al. (1996).

Concernant les autres métabolites, les observations réalisées sont en accord avec les données déjà disponibles dans la littérature. De nouveau, la production d'acide mycophénolique a été caractérisée comme non systématique par les souches de *P. roqueforti* (Fontaine et al., 2015a) contrairement à la roquefortine C ou l'andrastine A qui sont retrouvées en quantités détectables presque systématiquement (Nielsen et al., 2006; O'Brien et al., 2006). De manière intéressante, seuls deux isolats (LCP00148 & LCP02492, non-fromagers) ne produisent pas de roquefortine C en quantités détectables parmi les 55 souches criblées et seulement une souche (UBOCC-A-110052) ne produit pas d'andrastine A, et ce, dans les conditions optimales de culture (milieu YES, incubation de 7 jours à 25°C). De même, certaines souches se distinguent par leur apparente inaptitude, au moins dans les conditions testées, à produire un grand nombre de métabolites parmi ceux recherchés ce qui pourrait permettre aux industriels à l'avenir de disposer d'outils de sélection de souches atoxinogènes ou faiblement toxigènes. Sachant en plus que l'induction de la formation de structures relatives à la reproduction sexuée chez *P. roqueforti* (ascogones, cleistothèces et ascospores) a récemment été mise en évidence (Ropars et al., 2014), le croisement de différentes souches de *P. roqueforti* dans le but d'obtenir des recombinants d'intérêt apparaît donc envisageable. Cette démarche permet bien entendu de s'affranchir de la problématique OGM.

Enfin, en lien avec les résultats présentant la diversité fonctionnelle, et en particulier les différences de potentiel de production de mycotoxines, le troisième objectif de cette thèse a consisté à investiguer la voie de biosynthèse de l'acide mycophénolique, une des mycotoxines majeures produites par cette espèce et retrouvée dans la matrice finale.

Pour cela, une analyse *in silico* a été réalisée sur le génome de *P. roqueforti* FM164 (fourni par le Pr. Joëlle Dupont du MNHN) afin de rechercher l'homologue du cluster de gènes responsable de la production d'acide mycophénolique décrit comme fonctionnel chez *P. brevicompactum* (Hansen et al., 2012; Regueira et al., 2011). Cette analyse a, dans un premier temps, permis de

décrire pour la première fois que ce cluster était présent chez *P. roqueforti*. Une synténie des gènes et des identités élevées au niveau des séquences protéiques (72 à 92%) avec ce qui a été décrit chez *P. brevicompactum*, ont été observées. Le cluster est composé de 7 gènes codant 7 enzymes (MpaA, MpaB, MpaC, MpaDE, MpaF, MpaG, MpaH) dont une protéine de fusion MpaDE. En particulier, on retrouve l'enzyme clé de cette voie de biosynthèse, une polycétide synthase ou PKS, issue de l'expression du gène *mpaC*. Il s'agit de l'enzyme intervenant au tout début de la voie de biosynthèse de l'acide mycophénolique en catalysant la production d'acide 5-methylorsellinique (5-MOA) à partir d'acétyl-CoA, de 3 molécules de malonyl-CoA et de S-adenosyl methionine (Regueira et al., 2011). C'est la raison pour laquelle nous avons décidé de choisir ce gène comme cible dans le but de confirmer l'implication du cluster identifié dans la production d'acide mycophénolique chez *P. roqueforti*. Pour cela, nous avons utilisé une approche d'ARN interférence adaptée aux *Penicillium* spp. et acquise lors d'une mobilité à l'Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC, León, Espagne). Cette stratégie nous a permis de mettre en évidence une réduction significative de la production d'acide mycophénolique chez les transformants par rapport à la souche parentale connue comme fortement productrice de ce métabolite corrélée également à une réduction significative de l'expression, évaluée par RT-qPCR, du gène *mpaC*. Ces observations nous ont permis de conclure que le gène *mpaC* codant l'enzyme MpaC était effectivement impliqué dans la voie de biosynthèse de l'acide mycophénolique chez cette espèce. De même, ces travaux ont permis de révéler que le cluster de 7 gènes impliqué dans cette voie était totalement fonctionnel. C'est la raison pour laquelle nous avons émis l'hypothèse que la voie de biosynthèse de l'acide mycophénolique devait être similaire à celle précédemment décrite chez *P. brevicompactum* (Hansen et al., 2012; Regueira et al., 2011; Zhang et al., 2015).

En parallèle de cette étude, nous nous sommes également intéressés aux bases génétiques pouvant expliquer directement ou indirectement les différences de potentiel de production d'acide mycophénolique observées entre souches à la fois au cours de cette étude mais également précédemment rapportées (Engel et al., 1982; Fernández-Bodega et al., 2009; Fontaine et al., 2015a; Lafont et al., 1979; López-Díaz et al., 1996; Nielsen et al., 2006; O'Brien et al., 2006). L'existence de capacités souche-dépendantes de production d'acide mycophénolique, pourrait être liée à la fois à l'implication de facteurs de régulation ou à l'existence de variations génétiques au niveau de ces régions régulatrices ou des gènes composant le cluster. Dans le but de déterminer si les variations de production observées en fonction des souches étaient liées à des variations au niveau des gènes du cluster précédemment caractérisé, le séquençage du cluster complet de 2 souches (CBS 221.30<sup>NT</sup> et PTX.PR.27.2), en

supplément de la souche FM164, a été entrepris. Ces trois souches ont été sélectionnées sur la base d'une précédente étude (Fontaine et al., 2015a) car présentant des niveaux de production d'acide mycophénolique différents (FM164 faible, CBS 221.30<sup>NT</sup> modéré, PTX.PR.27.2 élevé). La comparaison des séquences du cluster de gènes a permis de mettre en évidence une délétion de 174 pb située au niveau du domaine lipase/estérase du gène *mpaC* chez FM164, souche caractérisée par une très faible production d'acide mycophénolique comparativement aux deux autres souches. De manière intéressante, l'amplification de la région correspondante chez les 55 souches sélectionnées lors de la deuxième partie de cette thèse a révélé que les souches présentant la délétion étaient toutes caractérisées par une non-détection d'acide mycophénolique d'après les dosages réalisés à partir des cultures sur milieu YES. De même, une forte corrélation a été mise en évidence entre les souches présentant la délétion et le substrat d'isolement (fromages à pâte persillée). De plus, les souches correspondantes se sont révélées représenter la quasi-totalité des individus des populations 1 et 3 (parmi les 55 souches criblées) précédemment décrites. Egalement, toutes les souches isolées à partir de substrats non-fromagers et appartenant à la population 2 ont été caractérisées comme ne présentant pas la délétion. Les résultats montrent ainsi que l'altération des gènes composant le cluster de l'acide mycophénolique de *P. roqueforti* pourrait expliquer, au moins en partie, les différences de production observées entre les souches sans que cela n'exclue l'implication de facteurs de régulation et d'éventuelles variations au niveau des gènes concernés.

D'une manière générale, la génomique comparative semble la méthode la plus prometteuse concernant l'élucidation des voies métaboliques menant, entre autres, à la production de métabolites secondaires tels que les arômes ou les mycotoxines.

Au regard de la faible corrélation existante entre les données génétiques et fonctionnelles obtenues lors de ces travaux de thèse en dehors des isolats AOP/IGP, plusieurs hypothèses peuvent être formulées. En effet, la nature neutre des marqueurs ciblés pourrait expliquer, au moins en partie les observations faites. On peut imaginer que le lien structure-fonction aurait été plus fort en ciblant des gènes impliqués dans les activités enzymatiques et les productions de métabolites évaluées. Cependant, à notre connaissance, peu d'études se sont intéressées aux voies de production d'arômes.





## **ANNEXES**



## ORIGINAL ARTICLE

# Induction of sexual reproduction and genetic diversity in the cheese fungus *Penicillium roqueforti*

Jeanne Ropars,<sup>1,2</sup> Manuela López-Villavicencio,<sup>3,\*</sup> Joëlle Dupont,<sup>3</sup> Alodie Snirc,<sup>1,2</sup> Guillaume Gillot,<sup>4</sup> Monika Coton,<sup>4</sup> Jean-Luc Jany,<sup>4</sup> Emmanuel Coton<sup>4</sup> and Tatiana Giraud<sup>1,2,\*</sup>

1 Ecologie, Systématique et Evolution, Université Paris-Sud, Orsay Cedex, France

2 CNRS Orsay Cedex, France

3 Origine, Structure, Evolution de la Biodiversité, UMR 7205 CNRS-MNHN, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris Cedex 05, France

4 Université de Brest, EA 3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne, ESIAB, Technopôle Brest-Iroise, Plouzané, France

## Keywords

*Aspergillus*, domestication, HGT, population structure, sex, wild strains, yeast

## Correspondence

Tatiana Giraud and Manuela López-Villavicencio, Ecologie, Systématique et Evolution, Université Paris-Sud, Batiment 360, 91405 Orsay Cedex, France.

Tel.: +33 1 69 15 56 69;

fax: +33 1 69 15 46 97;

e-mails: Tatiana.giraud@u-psud.fr and

mlopez@mnhn.fr

\*These authors cosupervised the work.

Received: 20 September 2013

Accepted: 22 November 2013

doi:10.1111/eva.12140

## Abstract

The emblematic fungus *Penicillium roqueforti* is used throughout the world as a starter culture in the production of blue-veined cheeses. Like other industrial filamentous fungi, *P. roqueforti* was thought to lack a sexual cycle. However, an ability to induce recombination is of great economic and fundamental importance, as it would make it possible to transform and improve industrial strains, promoting the creation of novel phenotypes and eliminating the deleterious mutations that accumulate during clonal propagation. We report here, for the first time, the induction of the sexual structures of *P. roqueforti* — ascogonia, cleistothecia and ascospores. The progeny of the sexual cycle displayed clear evidence of recombination. We also used the recently published genome sequence for this species to develop microsatellite markers for investigating the footprints of recombination and population structure in a large collection of isolates from around the world and from different environments. Indeed, *P. roqueforti* also occurs in silage, wood and human-related environments other than cheese. We found tremendous genetic diversity within *P. roqueforti*, even within cheese strains and identified six highly differentiated clusters that probably predate the use of this species for cheese production. Screening for phenotypic and metabolic differences between these populations could guide future development strategies.

## Introduction

Cheese is an important foodstuff introduced into the human diet in the early Neolithic Era (Beresford et al. 2001; Salque et al. 2013). Cheese-making increases the quality and duration of milk conservation and the digestibility of lactose (Bennett and Johnston 2004). Two categories of microorganisms are required for cheese-making: primary and secondary flora (Salque et al. 2013). The primary flora consists of lactic acid bacteria, which have been studied in detail (Mounier et al. 2008; Irlinger and Mounier 2009; Douglas and Klaenhammer 2010). The secondary flora develops after the environment has been modified by the primary flora and consists of a mixture of bacteria, yeasts and moulds playing an important role in the texture and flavour of cheeses.

*Penicillium roqueforti* is used in the production of the French cheese Roquefort and in many other blue-veined cheeses around the world, including Italian gorgonzola, Danablu in Denmark, Stilton in United Kingdom and Cabrales in Spain. This species is therefore of great economic importance. In France alone, the total production of Roquefort and other blue cheeses reached almost 57 000 tonnes in 2011 (Martin-Houssart 2012). Indeed, Roquefort cheese is one of the most emblematic cheeses in France, produced and exported in large amounts, and it was the first cheese to obtain the 'Appellation d'Origine Contrôlée' (AOC) label, which guarantees the origin of traditional French products. By contrast to many other industrial species, such as *P. camemberti*, wild strains of *P. roqueforti* can be found, allowing comparisons between industrial and wild strains for understanding the domestication process and history. In addition to its presence in dairy

environments, *P. roqueforti* is a common spoilage agent in refrigerated stored foods, meat, wheat products and silage, and it is even found in forest soil and wood (Pitt and Hocking 2009).

*Penicillium roqueforti*, like other industrial filamentous fungi and an estimated one-fifth of fungal species, was thought to lack a sexual cycle. However, evidence for the occurrence of sexual reproduction has been obtained for many of the supposed 'asexual' species (Burt et al. 1996; Pringle et al. 2005; Rydholm et al. 2006), and indirect evidence of sexual reproduction has recently been reported for *P. roqueforti* (Ropars et al. 2012). Mating type genes (MAT genes), which are involved in gamete recognition and mating in fungi, and other genes involved in meiosis, have been detected in the *P. roqueforti* genome and appear to be subject to strong purifying selection, suggesting that they are still used and functional. Haploid strains of *P. roqueforti* carry a single allele of the MAT gene in their genome, as all heterothallic fungi, meaning that fusion is possible only between gametes with opposing MAT alleles. Population analyses with polymorphic markers have revealed footprints of recombination and both MAT alleles have been detected. Other indirect evidence for the occurrence of sex in *P. roqueforti* includes the detection of RIP (repeat-induced point mutation) footprints (Ropars et al. 2012), a phenomenon in which repeated sequences are mutated and which occurs in fungi exclusively during the dikaryotic phase between syngamy and meiosis.

However, sexual structures have never been observed in *P. roqueforti*, in either natural or controlled conditions. Industrial strains are maintained by ferment producers and are replicated clonally. As for other industrial species, efforts to identify novel traits have thus been based purely on random mutagenesis and screening (Pöggeler 2001). The possibility of inducing a sexual cycle would be of considerable interest for industrial purposes, as it would facilitate the generation, by recombination, and selection of interesting new traits, in terms of colour, growth rate and metabolite production, for example. It would also make it possible to correct and prevent the degeneration generally observed in clonal species (Pöggeler 2001; Bruggeman et al. 2003). Sexual cycles have recently been successfully triggered in laboratory conditions in close relatives of *P. roqueforti*, such as *Aspergillus fumigatus* (O'Gorman et al. 2009), *A. lentulus* (Swilaiman et al. 2013) and *P. chrysogenum* (Böhm et al. 2012).

Here, we report the successful induction of a sexual cycle in *P. roqueforti*, using individuals from different environments that had previously been screened for mating type (Ropars et al. 2012). We also used the recently published genome sequence for this species (Cheeseman et al. 2014) to develop microsatellite markers and found recombination footprints, a tremendous diversity and a strong population

structure in a large collection of 114 isolates from different environments and locations (Table S1).

## Materials and methods

### Fungal isolates

We used 114 strains of *P. roqueforti* described in a previous study (Ropars et al. 2012) (Table S1). All these strains are kept in the collection of the Natural History Museum in Paris or the LUBEM collection. The fungal strains were of industrial origin or obtained from silage and natural habitats. Single-spore isolation was systematically carried out by a dilution method to guarantee that colonies originated from a single genotype.

### DNA extraction

Genomic DNA was extracted from fresh mycelium of the isolates listed in Table S1 grown for 3–5 days on malt agar. The Qiagen DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Ltd. Crawley, UK) was used for DNA extraction and purification. We used the 5' end of the  $\beta$ -tubulin gene (oligonucleotide primer set Bt2a/Bt2b; Glass and Donaldson 1995) to type strains, to ensure that they belonged to the *P. roqueforti* species (Samson et al. 2004).

### Induction of sex

Eight *P. roqueforti* isolates were crossed in all possible pairwise MAT1-1 (four strains) and MAT1-2 (four strains) combinations, in duplicate, following the protocol recently published for *P. chrysogenum* (Böhm et al. 2012). Two different media culture were used, oatmeal agar (Böhm et al. 2012) and goat-cheese agar media (Decker and Nielsen 2005), both supplemented with biotin (6.4  $\mu$ g/L) after autoclaving (Böhm et al. 2012). Petri dishes were sealed with Parafilm and incubated at 15 or 25°C in the dark. For each isolate, spore suspensions containing  $1 \times 10^5$  conidia per mL were prepared (O'Gorman et al. 2009), from seven-day-old cultures. On each plate, 5  $\mu$ L of a given spore suspension was used to inoculate sections of agar at opposite sites of the plate, located perpendicular to sections inoculated with aliquots of conidia of the opposite mating type (O'Gorman et al. 2009). Crosses were examined with a binocular loupe and an optical microscope, to check for cleistothecia, periodically over a period of 4 weeks. Photographs were taken with a Nikon D300 camera, on a luminescence microscope (Nikon France, Champigny-sur-Marne, France).

### Recombination and segregation in the progeny

For genotyping the sexual progeny, we tried to recover ascospores by rolling cleistothecia as previously described

(O’Gorman et al. 2009). This protocol, however, failed to eliminate enough conidia because the thin walls of the cleistothecia made their manipulation difficult. We therefore tried eliminating the asexual conidia surrounding the cleistothecia, by heating (Houbraken et al. 2008). We tested the resistance of the conidia to heating by placing suspensions of conidia in water in a dry heat bain-marie at different temperatures, ranging from 30 to 90°C for 5, 10 and 15 min. Suspensions were then plated on malt agar and incubated for 3 days at 25°C, and the colonies formed were counted. This experiment revealed that conidia survived heating for up to 10 min at temperatures below 80°C. No growth was observed for conidia heated at 80, 85 and 90°C. We then picked several cleistothecia from the original Petri dishes of the LCP 4111 × LCP 3914 crosses with a needle and suspended them in 1 mL of sterilized water supplemented with Tween. The cleistothecia were then heated at 80 and 85°C for 10 and 15 min to eliminate conidia. Heated suspensions were plated on malt agar and incubated for 5 days, after the cleistothecia had been ground. The colonies growing at high temperatures were presumed to result exclusively from sexual ascospore germination. Single-spore isolation was carried out with a dilution method, to guarantee the presence of a single individual on malt agar Petri dishes. After 5 days of growth at 25°C, seven individuals were picked and plated on other Petri dishes for growth at 25°C, for DNA extraction and segregation tests.

### Population genetics analyses

#### *Design of polymorphic microsatellite markers*

We looked for microsatellite motifs in the genomic sequence of FM164 (Cheeseman et al. 2014) and designed 94 primer pairs binding to the regions flanking these motifs (Table S2). We selected the polymorphic markers in a multiplex analysis (Cryer et al. 2005). Amplifications were performed in a Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France) DNA Engine Peltier Thermal cycler using a touchdown program with 35 cycles of 30 s at 94°C, a decreasing of 1°C every 30 s from 60 to 50°C, and 60 s at 72°C. The PCR program was followed by a final 7 min extension step at 72°C.

Using six isolates for a first screening of polymorphism, we pooled unlabelled PCR amplicons and ligated them into standard cloning vectors. PCR was then performed with a labelled universal primer binding to the region flanking the plasmid insert and unlabelled locus-specific primers. The previously used touchdown programme was reused for DNA amplification. Electrophoresis genotyping by capillary fractionation was carried out at INRA Clermont-Ferrand (*Plateforme Stratégique INRA*, Ibis 2009, ISO9001:2008). The profiles obtained for the six isolates were analysed with GENEMAPPER Software Version 4.0 (Applied Biosystem, Ville-

bon-sur-Yvette, France). This led to the selection of 11 polymorphic loci, *that is*, loci at which two different alleles (Table S2) were identified in the six isolates tested. The physical independence of these 11 loci was checked by their localization within the reference genome (see scaffold names in Table S2). The whole collection was then screened using these 11 polymorphic microsatellite markers. Only a few ascospores were genotyped, with a subset of the markers, as only a few recombination events between parental genotypes were required to show that the ascospores actually resulted from meioses.

### Genetic analyses

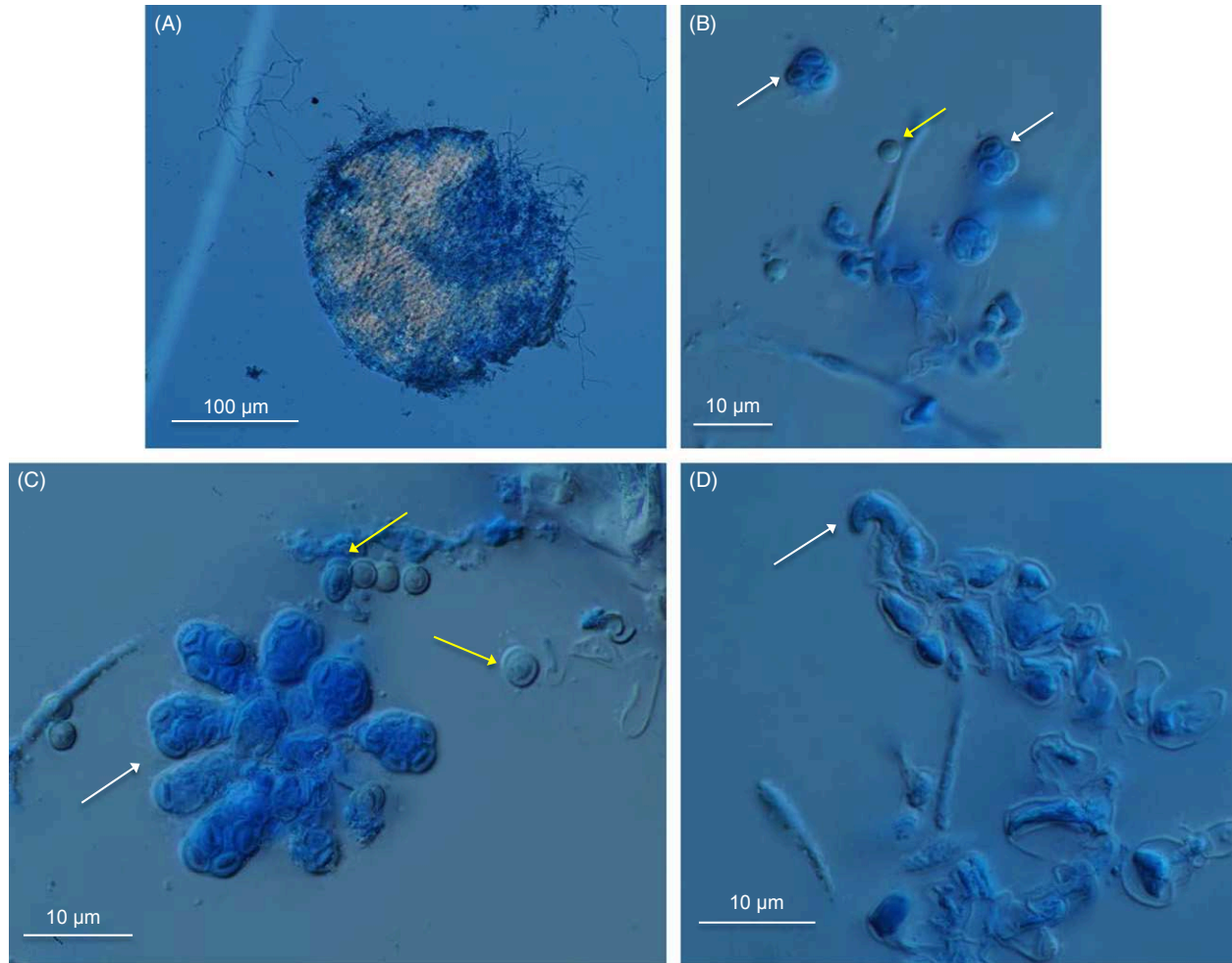
A splitstree was inferred with SPLITSTREE 4 software (Huson and Bryant 2006) (<http://www.splitstree.org/>). Factorial correspondence analyses (FCA) were performed with GENETIX v4.05 (Belkhir et al. 1996–2004). Linkage disequilibrium among the 11 markers and population differentiation were assessed with GENEPOP on the Web (Raymond and Rousset 1995) (<http://genepop.curtin.edu.au/>).

We used the individual-based Bayesian clustering methods implemented in STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard et al. 2000) to infer population structure. STRUCTURE makes use of Markov Chain Monte Carlo (MCMC) simulations to infer the proportion of ancestry of genotypes from  $K$  distinct clusters. The underlying algorithms attempt to minimize deviations from Hardy–Weinberg and linkage disequilibria. Ten independent analyses were carried out for each number of clusters, from  $K = 2$  to  $K = 10$ , using admixture models and 500 000 MCMC iterations, after a burn in of 50 000 steps. The output was processed using CLUMPP v1.1.2 (Jakobsson and Rosenberg 2007), to identify clustering solutions in replicated runs for each value of  $K$ . Population structure was then displayed graphically with DISTRUCT v1.1 (Rosenberg 2004). We implemented the Evanno method (Evanno et al. 2005) via the Structure Harvester website (Earl and VonHoldt 2012) (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>), to identify the  $K$  value corresponding to the strongest structure.

## Results

### Induction of sexual reproduction

Twelve crosses between individuals previously screened for mating type and isolated from industrial and ‘natural’ environments (i.e. noncheese environments) were grown on biotin-supplemented oatmeal medium or biotin-supplemented cheese medium at 25 or 15°C, in the dark. After 3 weeks of culture, nine of the crosses growing on oatmeal medium at 25°C produced fruiting bodies (cleistothecia), which, for one of these crosses [LCP 03914 (MAT1-1) × LCP 04111 (MAT1-2)], contained mature



**Figure 1** Sexual structures of *Penicillium roqueforti*. (A) One cleistothecium. (B–C) White arrows show asci-containing ascospores (sexual spores), whereas yellow ones show conidia (asexual spore). (D) Ascogonia (female sexual structures).

asci with ascospores (Fig. 1). In this cross, we were also able to observe female sexual structures, ascogonia (Fig. 1D, Table 1A). Cleistothecia were also formed on oatmeal medium at 15°C, but no mature ascospores could be isolated from fungi grown at this temperature. Cleistothecia failed to develop on cheese medium.

We checked for recombination, by isolating seven ascospores from mature LPC 03914 × LCP 04111 asci and investigating segregation at 11 microsatellite markers for which alleles differed between the parental strains and at loci for mating type genes. We found clear evidence of recombination in the progeny (Table 1B).

#### Genetic diversity and population structure in *Penicillium roqueforti*

A large collection of *P. roqueforti* isolates ( $N = 114$ ) was genotyped. Isolates were collected from dairy environments

( $N = 101$ ), silage ( $N = 2$ ), wood ( $N = 1$ ) or other non-cheese environments, such as stewed fruit, the inside wall of a fridge, brioche packaging or the atmosphere of a brewery ( $N = 10$ ). A Splitree and a NJ tree were constructed from the distance matrix generated from the 11 microsatellite markers (Fig. 2 and Figure S1). Footprints of clonal propagation were found in industrial isolates, with some isolates having identical genotypes for all 11 markers (Fig. 2, several F and FM strains, in red, on the same tip). By contrast, no isolates belonging to the same clone were observed among noncheese isolates (Fig. 2, noncheese strains, represented in black, on different branches).

The trees revealed the existence of two clusters (Fig. 2 and Figure S1), which encompassed strains with contrasted features and origins. The A cluster contained only cheese strains, most of which carried *Wallaby*, a large genomic region (ca. 500 kb), which was recently shown to have been transferred horizontally between different *Penicillium*

**Table 1.** Induction of sex in *Penicillium roqueforti*. (A) Results of 16 crosses tested for sex induction in *Penicillium roqueforti*. A 'x' indicates that no sexual structure was observed. (B) Evidence of recombination in *Penicillium roqueforti* ascospores isolated from cleistothecia obtained in the LCP 03914 × LCP 04111 cross.

(A)		MAT1-2			
		LCP00146	LCP02939	LCP03914	F14.1
MAT1-1					
LCP00148	Cleistothecia Empty	x	Cleistothecia Empty	Cleistothecia Empty	Cleistothecia Empty
LCP04111	Cleistothecia Empty	Cleistothecia Empty	Cleistothecia Asci, ascospores	Cleistothecia Empty	Cleistothecia Empty
F28.3	Cleistothecia Empty	x	x	x	x
FM223	Cleistothecia Empty	Cleistothecia Empty	x	Cleistothecia A few young asci	

(B)			Loci														
	LCP03914	LCP04111	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
ROQ12	183	185	185	185	183	183	183	183	183	183	183	183	183	183	183	183	183
PROQ13	191	189	189	189	189	189	189	189	189	191	NA	191	191	191	191	191	191
PROQ77	197	195	195	195	195	195	195	NA	195	195	195	195	195	195	195	195	195
PROQ74	163	157	NA	163	157	157	157	157	157	163	163	NA	163	163	163	163	163
PROQ80	182	176	176	176	176	176	176	176	176	176	176	176	176	176	176	176	176
PROQ88	176	182	176	176	182	182	182	182	182	176	176	176	176	176	182	176	176
PROQ93	177	165	165	165	165	165	165	NA	177	177	177	NA	177	177	165	177	177
MAT	1-2	1-1	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2	1-1	1-1	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2

Values in the table corresponded to the length of the microsatellite alleles and colours illustrate recombination: yellow-coloured cells represent microsatellite alleles inherited from the LCP03914 parent while orange-coloured ones represent alleles inherited from the LCP04111 parent. Only microsatellite alleles that differ between the two parents are shown.

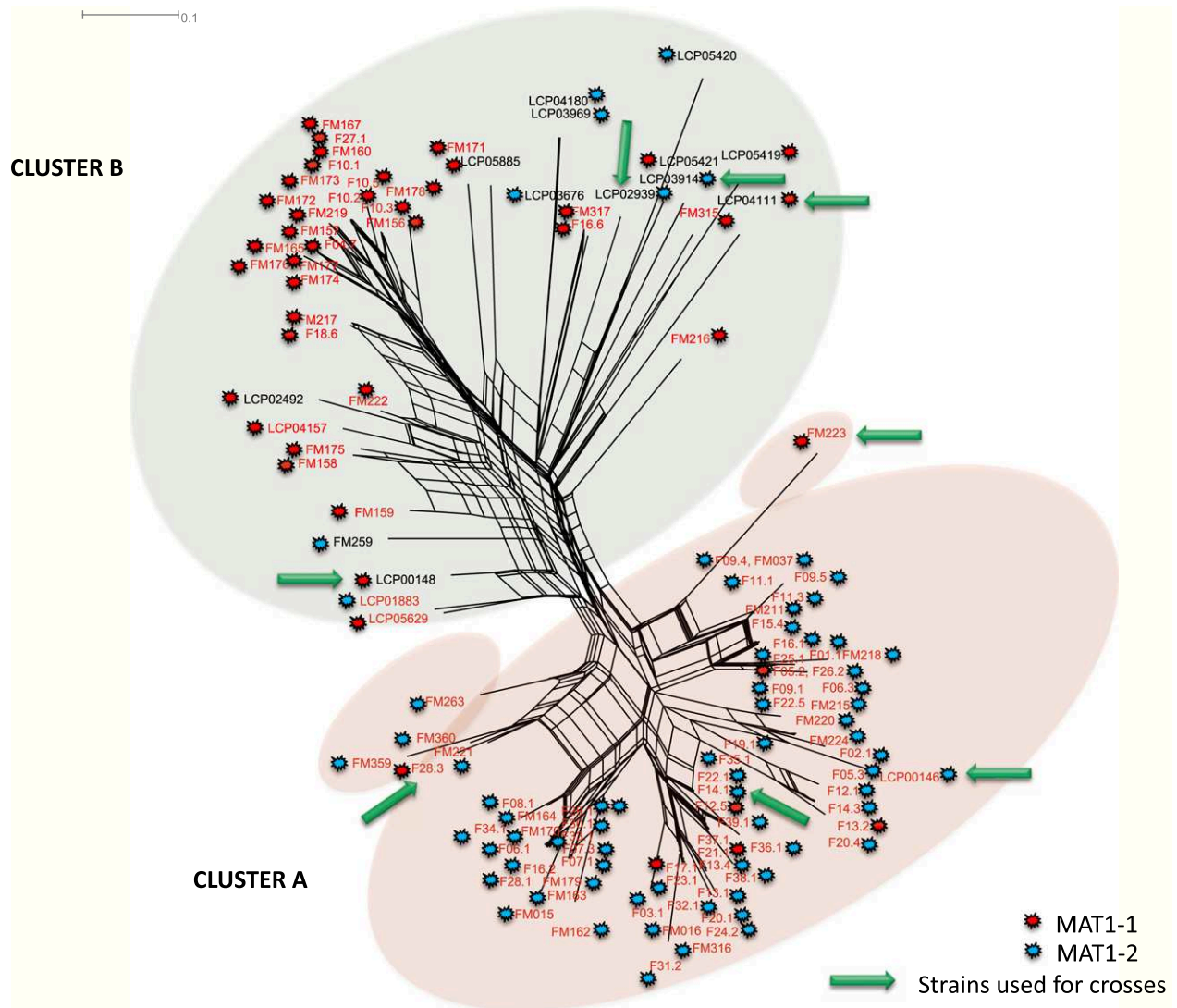
species from the cheese environment (Cheeseman et al. 2014). There were four exceptions, the industrial 'F' strains F07.1, F09.5, F13.1 and F22.5, in which *Wallaby* was not detected with our primer pairs (Cheeseman et al. 2014). By contrast, cluster B included strains isolated from diverse environments, such as wood, silage and cheese, and none of the strains of this cluster carried *Wallaby* (Fig. 2). The  $F_{ST}$  value of 0.55 between the two clusters indicates a very high level of differentiation. The presence of cheese strains in both clusters indicates that there are major genetic differences between industrial strains that probably predate the domestication of this species for cheese production, given the high level of divergence. The strains in the two clusters also differed in terms of their mating types: the A cluster contained mostly MAT1-2 (91%) strains, whereas the B cluster contained mostly MAT1-1 strains (82%). Overall, the ratio of MAT1-1 to MAT1-2 strains was balanced, with no significant deviation from a 1:1 ratio ( $\chi^2 = 0.27$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0.6$ ), whereas there was a significant departure from the 1:1 ratio within each cluster ( $\chi^2 = 56.9$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0.001$ ).

We investigated the population structure of *P. roqueforti* further, with the STRUCTURE program. STRUCTURE yielded well-defined clusters at  $K$  values of up to 6 (Fig. 3 and Figure S2), indicating the existence of six genetically differentiated clusters. For the values of  $K$  of 7 and above,

each new cluster included only admixed genotypes, indicating a lack of further structure. At  $K = 2$ , the structure identified corresponded precisely to that in the split tree, with the strains separated according to the presence/absence of *Wallaby*. The deltaK value confirmed that this split was the strongest structure in the data set (Figure S3). At  $K = 6$ , the two clusters defined previously were each split into three well-delimited populations, with some hybrids between populations 2 and 3. Within cluster B, most of the cheese strains (20 of the 32) clustered in population 1, whereas most noncheese strains (10 of the 13) were included in population 3. Moreover, all the cheese strains of population 1 were MAT1-1 strains, whereas population 3 included both mating types, in equal proportions (seven strains of each). Population 2 included mostly MAT1-1 strains from diverse environments (10 MAT1-1 and 1 MAT1-2 strains). No other obvious features, such as geographic origin or type of cheese, could account for the observed population structure.

We performed factorial correspondence analysis to obtain further support for the existence of the six populations from a method assuming no particular population model. The analysis including all 114 strains and 12 loci (the 11 microsatellite markers and the MAT locus) confirmed the differentiation of the three populations identified within cluster B, as these populations did not overlap





**Figure 2** Splitstree of *Penicillium roqueforti*. Splitstree4 diagram for 114 *Penicillium roqueforti* strains from different collections and isolated from cheeses worldwide based on 11 microsatellite locus. Reticulation indicates likely occurrence of recombination.

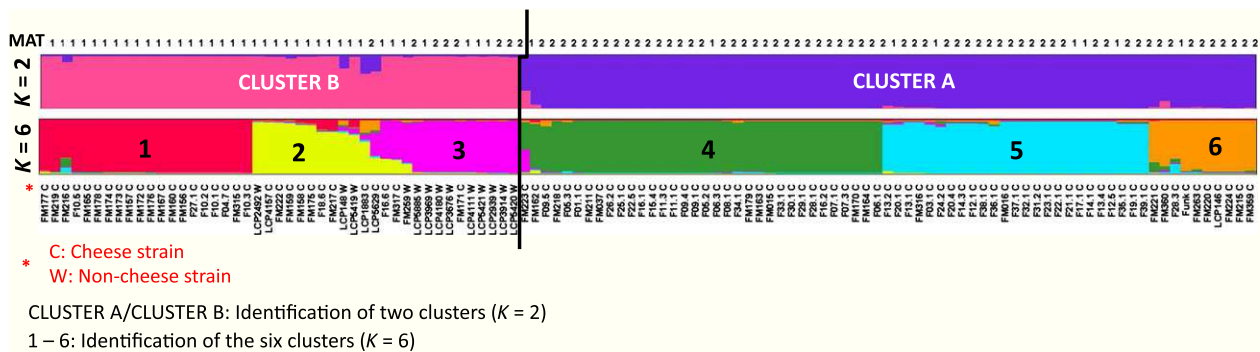
(Figure S4a, with 12.97% and 9.24% of the variance explained by axes 1 and 2, respectively). Within cluster A, the three populations overlapped when we considered the entire data set and the first two axes (Figure S4a). In an analysis including only the 69 cheese strains belonging to cluster A, it was possible to visualize the differentiation of the three populations identified above by STRUCTURE (13.77% and 12.12% of the variance explained for axes 1 and 2, respectively; Figure S4b).

The existence of six genetically divergent populations was further confirmed by the calculation of  $F_{ST}$ . Within cluster A, including only cheese strains, fixation indices ( $F_{ST}$ ) were systematically greater than 0.4, confirming the very high degree of genetic differentiation between the three populations (Table S3). Within cluster B,  $F_{ST}$  values

were greater than 0.5 between populations 1 and 2, and lower (of 0.35) between populations 2 and 3 (Table S3), as expected given the STRUCTURE bar plots indicating the presence of hybrids.

### Recombination footprints in populations

We then investigated the footprints of sex in our population data set. We first performed a split decomposition analysis, showing recombination events as reticulations. SplitsTree analysis yielded a network, with some reticulations but also with long branches (Fig. 2). This pattern is indicative of pervasive clonality with occasional recombination events, within the clusters in particular, and much less frequently between clusters.



**Figure 3** Population structure of *Penicillium roqueforti*. The structure has been inferred by STRUCTURE for  $K = 2$  and  $K = 6$  (see Figure S2 for the barplots corresponding to other  $K$  values). The STRUCTURE program could form well-defined clusters up to  $K = 6$ , indicating the existence of six genetically differentiated clusters. The strongest structure appeared at  $K = 2$ , with strains split according to a genomic island called *Wallaby*, previously shown to have been horizontally transferred between several *Penicillium* cheese species. CLUSTER A/CLUSTER B: identification of two clusters ( $K = 2$ ); 1–6: identification of the six clusters ( $K = 6$ ).

When we considered only two genetic groups ( $K = 2$ ), linkage disequilibrium was significant within both clusters, probably due to a Wahlund effect resulting from the genetic structure (Table S4). When six populations were considered, significant linkage disequilibrium was observed only for population 3 within cluster B, but not for the other five populations. Thus, linkage disequilibrium analyses were consistent with the separation of the strains into six groups and the occurrence of recombination within populations.

## Discussion

### Occurrence of sex and recombination

We report here, for the first time, the production of all the typical sexual structures of ascomycete fungi, including ascogonia, cleistothecia, asci and recombinant ascospores, by the ascomycete *P. roqueforti*, as well as a method for recovering ascospores. Sexual structures were produced only on oatmeal agar medium supplemented with biotin, as reported for *P. chrysogenum*, a close relative of *P. roqueforti* (Böhm et al. 2012). This indicates that this protocol may be largely useful for inducing sex in a wide range of related species including several of industrial importance, such as *P. camemberti*.

Sexual fruiting bodies were abundant in almost all the crosses, regardless of the presence or absence of the *Wallaby* horizontally transferred region, the origin of the strain and its mate. Thus, such structures were observed even in crosses between strains from clusters A and B. Nevertheless, we found mature ascospores in only one of the 16 crosses, in which both parental strains were isolated from non-cheese environments (stewed fruit and wood in France) and belonged to population 3 of cluster B. This may reflect strain variability in the time or medium required for ascospore development, or lower levels of fertility in

domesticated clonal strains, as suggested for other ascomycetes, such as *A. fumigatus* or *P. chrysogenum* (Dyer and Paoletti 2005; O’Gorman et al. 2009; Böhm et al. 2012; Swilaiman et al. 2013). Further development of the protocol may thus be needed to produce ascospores from cheese strains, but the presence of cleistothecia in most crosses is promising. No sexual structures were observed on the goat-cheese medium, a nutrient-rich environment. This finding is consistent with theoretical expectations and observations that sexual reproduction is often induced in harsh environments rather than in rich, stable medium (Burt et al. 1996; Goddard et al. 2005; Schoustra et al. 2010). This may have been selected for increasing the speed of adaptation to new environments and/or for the production of sexual structures that are often resistant (Houbraken et al. 2008).

Footprints of recombination were also found in our collection of populations. In particular, in A cluster, which included only cheese strains, none of the three populations identified by STRUCTURE displayed significant linkage disequilibrium and reticulation was observed in the Splits-Tree network, indicating the occurrence of recombination between cheese strains. The RIP-like footprints detected in the reference sequenced genome FM164, from a cheese strain carrying *Wallaby* (Cheeseman et al. 2014), and the finding of both mating types in both clusters provide further support for this hypothesis. These footprints of recombination may result from events predating the domestication of the species, which began around the six millennium BC (Salque et al. 2013). Alternatively, recombinant strains from other environments may be regularly introduced in the cheese-making industry. This hypothesis is plausible because *P. roqueforti* is commonly found in dairy-related environments (such as silage) and even in the caves in which the cheese is left to mature, as it tolerates many environmental variations such as cold temperatures,

low oxygen concentrations, alkaline and weak acid preservatives (Samson et al. 2004; Pitt and Hocking 2009). However, the frequencies of mating types were not balanced in the different clusters. This may be a consequence of the rarity of sex events, leading to a decrease in the frequency of one mating type by genetic drift. A very low frequency of sexual recombination is consistent with the shape of the SplitsTree diagram, which displays terminal branches without reticulations.

### Population diversity and structure

In this study, we developed 11 new polymorphic microsatellite markers providing unprecedented insight into the population structure and diversity of the cheese fungus *P. roqueforti*. Our analyses revealed the existence of six highly differentiated populations. Such a high genetic differentiation and the few reticulations present between clades on the splits tree together indicate that gene flow has been limited for long between the clusters.

Some cheese strains appeared to belong to clonal lineages, whereas all noncheese strains carried unique genotypes. Cheese strains were found in five of the six populations but, interestingly, the populations split most clearly into two clusters defined on the basis of the presence or absence of *Wallaby*, a large horizontally transferred region thought to provide a competitive advantage against other micro-organisms in cheese (Cheeseman et al. 2014). After an initial horizontal transfer event in *P. roqueforti*, *Wallaby* may have spread rapidly within populations that were still recombining (i.e. within cluster A), provided that it conferred an advantage. This further indicates that recombination is no longer occurring between clusters A and B. The clusters also appeared to harbour different frequencies of MAT alleles, which are probably due to the lack of gene flow between clusters associated with drift within clusters, because of infrequent sexual reproduction.

The very high level of differentiation suggests that cheese strains in the different clusters may have different metabolic properties, generating different aromas or flavours, for example. It will be interesting to investigate this aspect further, to improve our understanding of the differences between types of blue cheeses and for the development of new flavours. This differentiation may also help to ensure food safety, by facilitating the tracking of strains and the determination of cheese origin.

### Conclusion

We were thus able to induce a sexual cycle under laboratory conditions in the cheese species *P. roqueforti*, for which no sexual structure had ever been observed. This is of great industrial and fundamental importance, as it could

facilitate the development of a transformation method for this species, the creation of novel phenotypes by recombination and the purging of deleterious mutations accumulated during clonal propagation. We also provided evidence of a high degree of genetic diversity within the species, and even within cheese strains, with the existence of six populations, probably predating the development of cheese-making, given the high level of differentiation observed. Screening for phenotypic and metabolic differences between these populations could potentially guide future development strategies.

### Acknowledgements

We thank Yves Brygoo, John Taylor, Fabienne Malagnac and Ricardo Rodríguez de la Vega for helpful discussions, Dario de Franceschi for helping with the micrographs, Yann Dussert for helping with the analyses, Mathilde Delanay for technical assistance with microsatellite amplification. This study was funded by the ERC starting grant, GenomeFun 309403, awarded to TG and by the ATM Microorganisms-MNHN 2013 to MLV.

### Data archiving statement

Raw data for this manuscript are available from the Dryad Digital Repository: <http://dx.doi.org/10.5061/dryad.t53k5>.

### Literature cited

- Belkhir, K., P. Borsa, L. Chikhi, N. Raufaste, and F. Bonhomme. 1996–2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations.
- Bennett, R. J., and K. A. Johnston 2004. General aspects of cheese technology. In: P. F. Fox, L. H. McSweeney, T. M. Cogan, and T. P. Guinee, eds. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Major Cheese Groups, vol 2, pp. 23–50., 7 Academic Press, San Diego, CA.
- Beresford, T. P., N. A. Fitzsimons, N. L. Brennan, and T. M. Cogan 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* 11:259–274.
- Böhm, J., B. Hoff, C. M. O’Gorman, S. Wolfers, V. Klix, D. Binger, I. Zadra et al. 2012. Sexual reproduction and mating-type-mediated strain development in the penicillin-producing fungus *Penicillium chrysogenum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:1476–1481.
- Bruggeman, J., A. J. M. Debets, P. J. Wijngaarden, J. A. G. M. de Visser, and R. F. Hoekstra 2003. Sex slows down the accumulation of deleterious mutations in the homothallic fungus *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 164:479–485.
- Burt, A., D. A. Carter, G. L. Koenig, T. J. White, and J. W. Taylor 1996. Molecular markers reveal cryptic sex in the human pathogen *Coccidioides immitis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:770–773.
- Cheeseman, K., J. Ropars, P. Renault, J. Dupont, J. Gouzy, A. Branca, A.-L. Abraham et al. 2014. Multiple recent horizontal transfers of

- a large genomic region in cheesemaking fungi. *Nature Communications*.
- Cryer, N. C., D. R. Butler, and M. J. Wilkinson 2005. High throughput, high resolution selection of polymorphic microsatellite loci for multiplex analysis. *Plant Methods* 1:3.
- Decker, M., and P. V. Nielsen 2005. The inhibitory effect of *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* on the associated fungi of white mould cheese. *International Journal of Food Microbiology* 104:51–60.
- Douglas, G. L., and T. R. Klaenhammer 2010. Genomic Evolution of Domesticated Microorganisms. *Annual Review of Food Science and Technology* 1:397–414.
- Dyer, P. S., and M. Paoletti 2005. Reproduction in *Aspergillus fumigatus*: sexuality in a supposedly asexual species? *Medical Mycology* 43: S7–S14.
- Earl, D., and B. M. VonHoldt 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4:359–36.
- Evanno, G., S. Regnaut, and J. Goudet 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611–2620.
- Glass, N. L., and G. C. Donaldson 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61:1323–1330.
- Goddard, M. R., H. Godfray, and A. Burt 2005. Sex increases the efficacy of natural selection in experimental yeast populations. *Nature* 434:636–640.
- Houbraken, J., J. Varga, E. Rico-Munoz, S. Johnson, and R. A. Samson 2008. Sexual reproduction as the cause of heat resistance in the food spoilage fungus *Byssosclamyces spectabilis* (anamorph *Paecilomyces variotii*). *Applied and Environmental Microbiology* 74:1613–1619.
- Huson, D. H., and D. Bryant 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution* 23:254–267.
- Irlinger, F., and J. Mounier 2009. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology* 20:142–148.
- Jakobsson, M., and N. Rosenberg 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23:1801–1806.
- Martin-Houssart, G. 2012. Résultats de l'enquête annuelle laitière 2011. *Agreste Primeur* 290:8–11.
- Mounier, J., C. Monnet, T. Vallaeys, R. Arditi, A.-S. Sarthou, A. Hélias, and F. Irlinger 2008. Microbial interactions within a cheese microbial community. *Applied and Environmental Microbiology* 74:172–181.
- O'Gorman, C. M., H. T. Fuller, and P. S. Dyer 2009. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 457:471–474.
- Pitt, J. I., and A. D. Hocking 2009. *Fungi and Food Spoilage*. Springer, New York.
- Pöggeler, S. 2001. Mating-type genes for classical strain improvements of ascomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56:589–601.
- Pringle, A., D. M. Baker, J. L. Platt, J. P. Wares, J. P. Latgé, and J. W. Taylor 2005. Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Evolution* 59:1886–1899.
- Pritchard, J. K., M. Stephens, and P. Donnelly 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959.
- Raymond, M., and F. Rousset 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *The Journal of Heredity* 86:248–249.
- Ropars, J., J. Dupont, E. Fontanillas, R. Rodríguez de la Vega, F. Malagnac, M. Coton, T. Giraud et al. 2012. Sex in cheese: evidence for sexuality in the fungus *Penicillium roqueforti*. *PLoS ONE* 7:e49665.
- Rosenberg, N. 2004. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4:137–138.
- Rydholm, C., G. Szakacs, and F. Lutzoni 2006. Low genetic variation and no detectable population structure in *Aspergillus fumigatus* compared to closely related *Neosartorya* species. *Eukaryotic Cell* 5:650–657.
- Salque, M., P. I. Bogucki, J. Pyzel, I. Sobkowiak-Tabaka, R. Grygiel, M. Szmyt, and R. P. Evershed 2013. Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium BC in northern Europe. *Nature* 493:522–525.
- Samson, R. A., K. A. Seifert, A. F. A. Kuijpers, J. A. M. P. Houbraken, and J. C. Frisvad 2004. Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial  $\beta$ -tubulin sequences. *Studies in Mycology* 49:175–200.
- Schoustra, S., H. D. Rundle, R. Dali, and R. Kassen 2010. Fitness-associated sexual reproduction in a filamentous fungus. *Current Biology* 20:1350–1355.
- Swilaiman, S. S., C. M. O'Gorman, S. A. Balajee, and P. S. Dyer 2013. Discovery of a sexual cycle in *Aspergillus lentulus*, a close relative of *A. fumigatus*. *Eukaryotic Cell* 12:962–969.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Figure S1.** Neighbour-joining network showing the genetic clustering in *Penicillium roqueforti* according to the presence or absence of the 'Wallaby' genomic island, previously shown to have been horizontally transferred between several *Penicillium* cheese species.

**Figure S2.** Coefficients of membership in the various gene pools inferred by the STRUCTURE program, based on the 11 polymorphic microsatellite markers for all the 114 *Penicillium roqueforti* strains, from  $K = 2$  to  $K = 9$ .

**Figure S3.** Implementation of the Evanno method for detecting the number of  $K$  groups for which the subsequent increase in  $K$  yield less information.

**Figure S4.** Factorial Correspondence Analyses (FCA) illustrating the differentiation of the six populations of *Penicillium roqueforti*.

**Table S1.** List of the 114 isolates of *Penicillium roqueforti* used in this study.

**Table S2.** Names, motif, primer sequences and genome localization of the 11 microsatellites loci used in this study.

**Table S3.** Fixation indexes ( $F_{ST}$ ) between pairs of the six *Penicillium roqueforti* populations defined as in the Figure 2.

**Table S4.** Linkage disequilibrium within the two main clusters, A and B, defined for  $K = 2$  (see Figure 2), and within the six populations ( $K = 6$ , Figure 2) of *Penicillium roqueforti*.

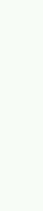
Cheese strains

Non-cheese strains

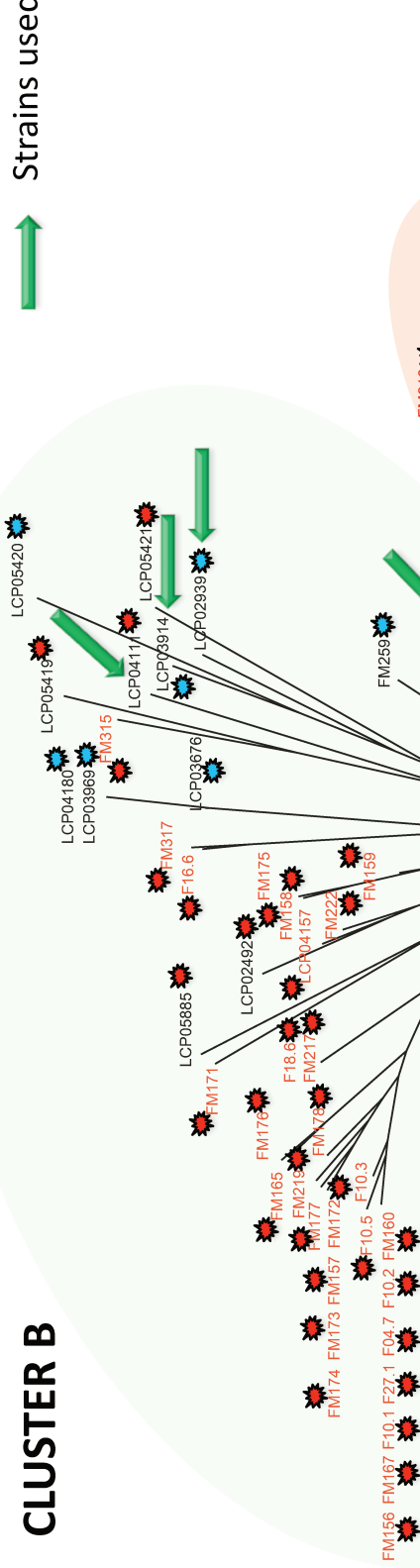
Strains used for crosses

● MAT1-1

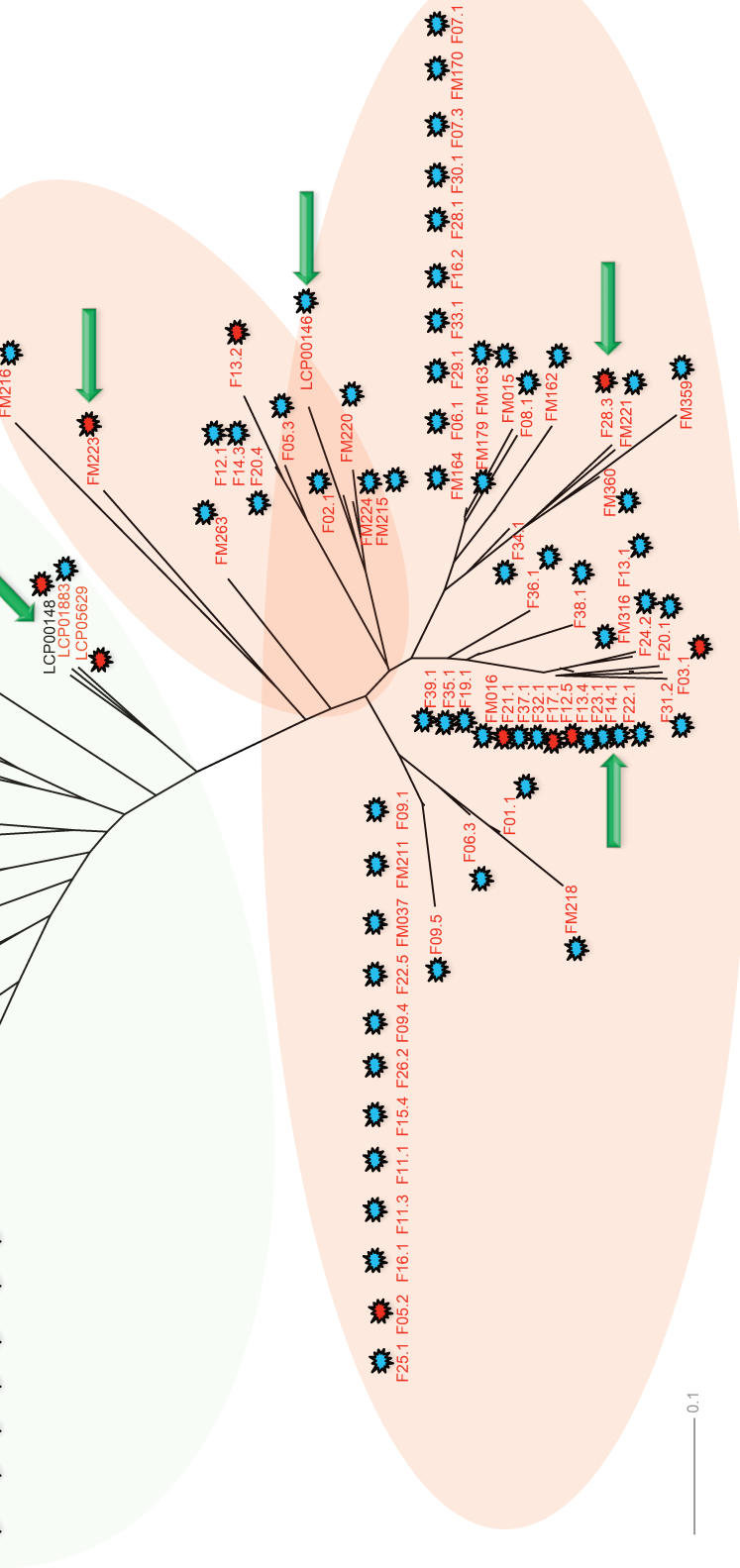
● MAT1-2



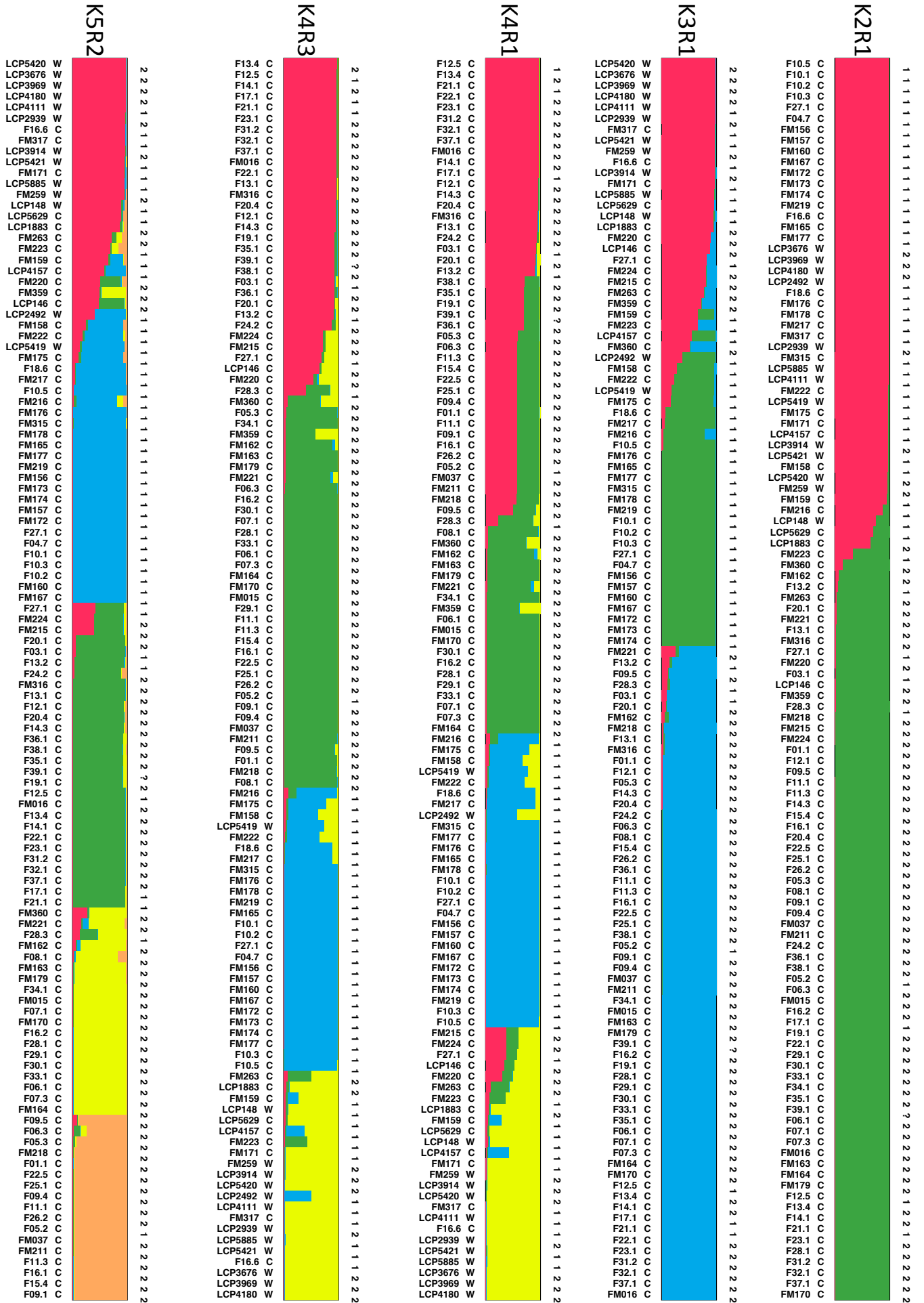
# CLUSTER B



# CLUSTER A



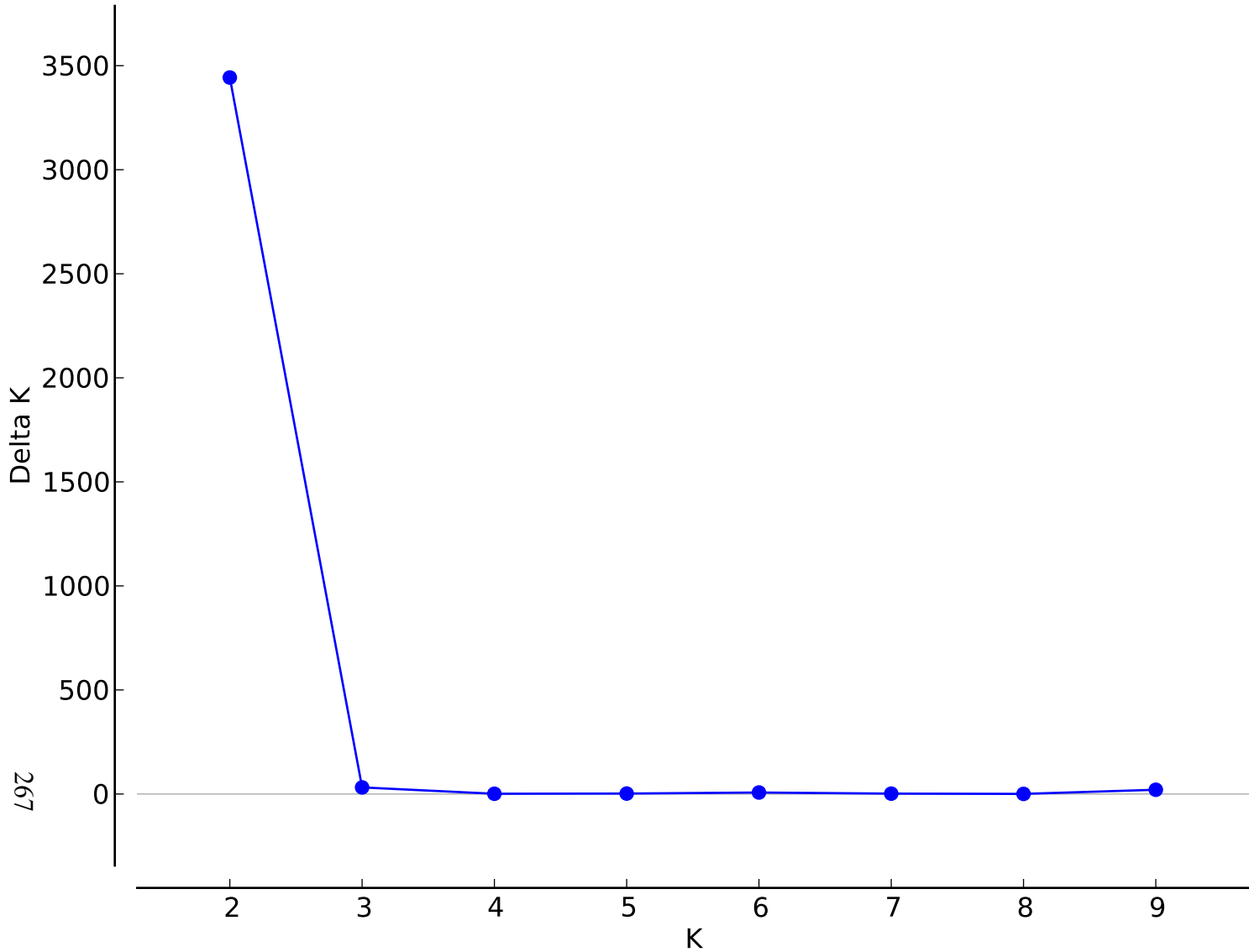
0.1





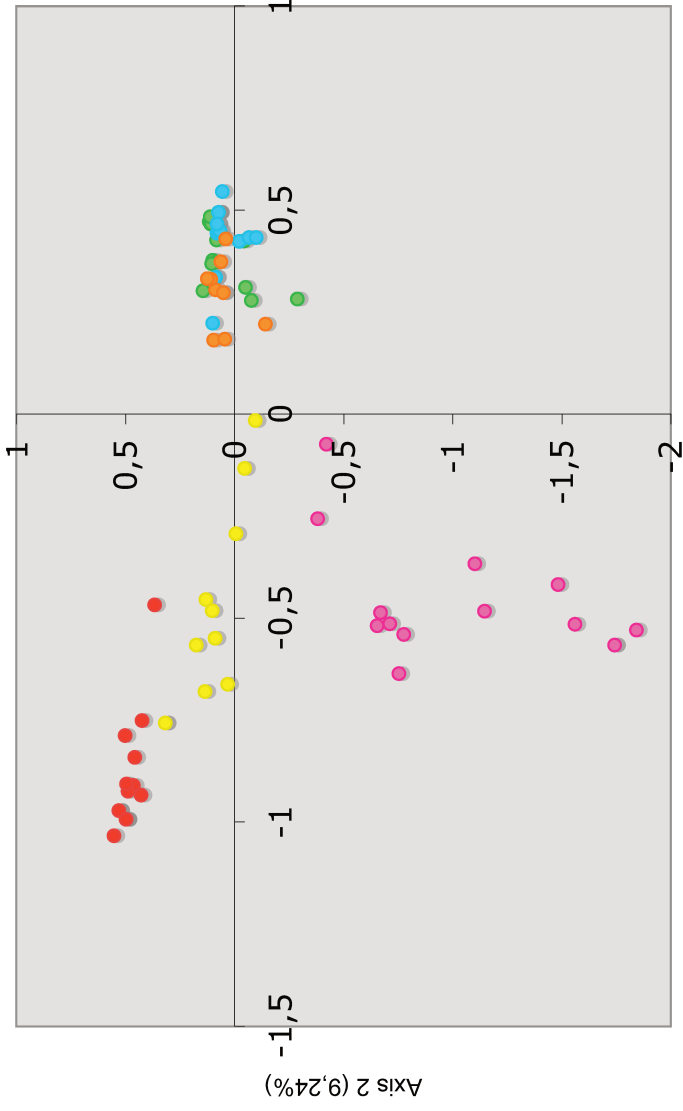


$$\text{DeltaK} = \text{mean}(|L''(K)|) / \text{sd}(L(K))$$



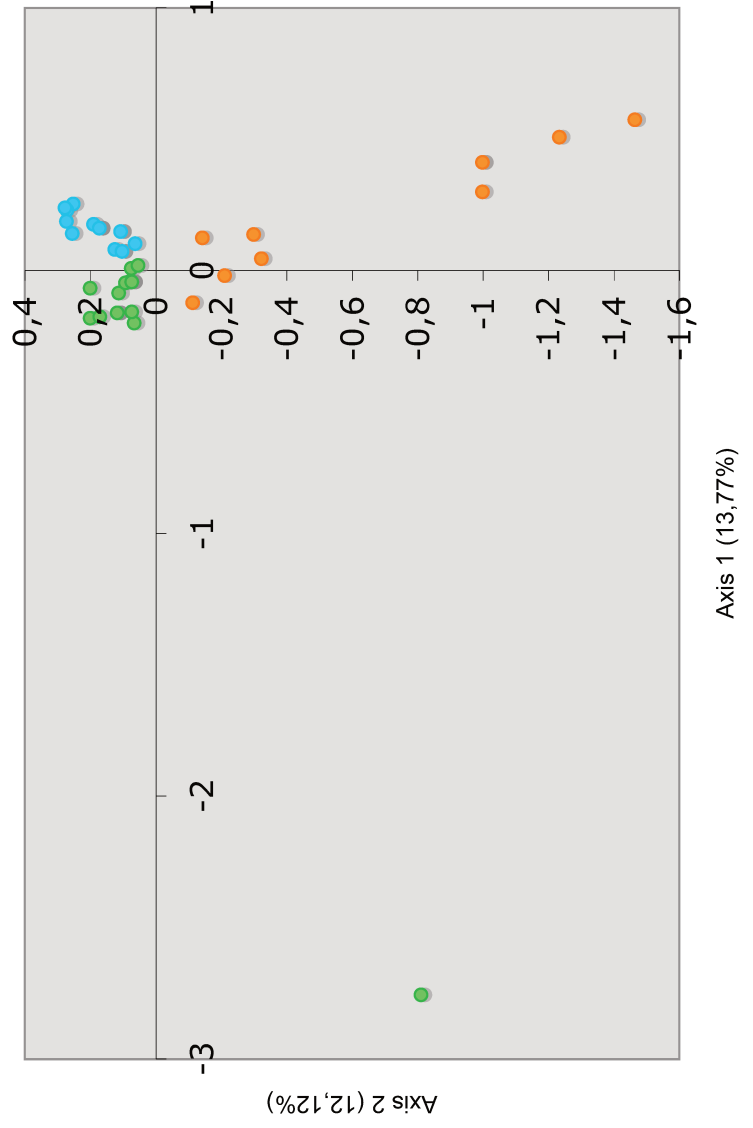


a) 114 taxa



- Population 1
- Population 2
- Population 3
- Population 4
- Population 5
- Population 6

b) 69 taxa (only cluster A included)





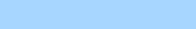
	Isolate number	Substrate	Origin	MAT 1-1	MAT 1-2	Wallaby
FM collection	FM 015	Cheese environment	France	-	+	+
	FM016	Cheese environment	France	-	+	+
	FM 037	Cheese environment	France	-	+	+
	FM 156	Cheese environment	France	+	-	-
	FM 157	Cheese environment	France	+	-	-
	FM 158	Cheese environment	France	+	-	-
	FM 159	Cheese environment	France	+	-	-
	FM 160	Cheese environment	France	+	-	-
	FM 162	Cheese environment	France	-	+	+
	FM 163	Cheese environment	France	-	+	+
	FM 164	Gorgonzola cheese	France	-	+	+
	FM 165	Cheese environment	France	+	-	-
	FM 167	Cheese environment	France	+	-	-
	FM 170	Cheese environment	France	-	+	+
	FM 171	Cheese environment	France	+	-	-
	FM 172	Cheese environment	France	+	-	-
	FM 173	Cheese environment	France	+	-	-
	FM 174	Cheese environment	France	+	-	-
	FM 175	Cheese environment	France	+	-	-
	FM 176	Cheese environment	France	+	-	-
	FM 177	Cheese environment	France	+	-	-
	FM 178	Cheese environment	France	+	-	-
	FM 179	Cheese environment	France	-	+	+
	FM 211	Cheese environment	France	-	+	+
	FM 215	Cheese environment	France	-	+	+
	FM 216	Cheese environment	France	+	-	-
	FM 217	Cheese environment	France	+	-	-
	FM 218	Cheese environment	France	-	+	+
	FM 219	Cheese environment	France	+	-	-
	FM 220	Cheese environment	France	-	+	+
	FM 221	Cheese environment	France	-	+	+
	FM 222	Cheese environment	France	+	-	-
	FM 223	Cheese environment	France	+	-	+
	FM 224	Cheese environment	France	-	+	+
	FM 259	Silage	France	-	+	-
	FM 263	Cheese environment	France	-	+	+
FM 315	Cheese environment	France	+	-	-	
FM 316	Cheese environment	France	-	+	+	
FM 317	Cheese environment	France	+	-	-	
FM 359	Gorgonzola cheese	France	-	+	+	
FM 360	Gorgonzola cheese	France	-	+	+	
Public collections	LCP 00146	Roquefort cheese	France	-	+	+
	LCP 00148	Brewery atmosphere	Unknown	+	-	-
	LCP 01883	Cheese	Unknown	-	+	-
	LCP 02492	Unknown	Unknown	+	-	-
	LCP 02939	Packing brioche	France	-	+	-
	LCP 03676	Stewed fruit	France	-	+	-
	LCP 03914	Stewed fruit	France	-	+	-
	LCP 03969	Stewed fruit	France	-	+	-
	LCP 04111	Wood	France	+	-	-
	LCP 04157	IMI 024313T Roquefort cheese	Unknown	+	-	-
	LCP 04180	Strawberry sorbet	France	-	+	-
	LCP 05419	Fridge inner wall	France	+	-	-
	LCP 05420	Fridge inner wall	France	-	+	-
	LCP 05421	Fridge inner wall	France	+	-	-
	LCP 05885	Silage	France	+	-	-
	LCP 05629	CBS 449.78 Cheddar cheese	Unknown	-	+	-
	F01.1	Blue cheese	Canada	-	+	+

Isolate number	Substrate	Origin	MAT 1-1	MAT 1-2	Wallaby
F02.1	Blue cheese	Canada	-	+	+
F03.1	Blue cheese	Canada	-	+	+
F04.7	Blue cheese	Canada	+	-	-
F05.2	Fourme d'Ambert	France	+	-	+
F05.3	Fourme d'Ambert	France	-	+	+
F06.1	Gorgonzola	Italy	-	+	+
F06.3	Gorgonzola	Italy	-	+	+
F07.1	Gorgonzola	Italy	-	+	-
F07.3	Gorgonzola	Italy	-	+	+
F08.1	Gorgonzola	Italy	-	+	+
F09.1	Fourme d'Ambert	France	-	+	+
F09.4	Fourme d'Ambert	France	-	+	+
F09.5	Fourme d'Ambert	France	-	+	-
F10.1	Bleu d'Auvergne	France	+	-	-
F10.2	Bleu d'Auvergne	France	+	-	-
F10.3	Bleu d'Auvergne	France	+	-	-
F10.5	Bleu d'Auvergne	France	+	-	-
F11.1	Carré Aurillac	France	-	+	+
F11.3	Carré Aurillac	France	-	+	+
F12.1	Pigme	France	-	+	+
F12.5	Pigme	France	+	-	+
F13.1	Carré Auvergne	France	-	+	-
F13.2	Carré Auvergne	France	+	-	+
F13.4	Carré Auvergne	France	-	+	+
F14.1	Gorgonzola	Argentina	-	+	+
F14.3	Gorgonzola	Argentina	-	+	+
F15.4	Blue cheese	Brazil	-	+	+
F16.1	Picon Hoja	Spain	-	+	+
F16.2	Picon Hoja	Spain	-	+	+
F16.6	Picon Hoja	Spain	+	-	-
F17.1	Peña Santa	Spain	+	-	+
F18.6	Tresviso	Spain	+	-	-
F19.1	Peral	Spain	-	+	+
F20.1	Cabrales	Spain	-	+	+
F20.4	Cabrales	Spain	-	+	+
F21.1	Blue cheese	Spain	+	-	+
F22.1	Blue cheese	Netherlands	-	+	+
F22.5	Blue cheese	Netherlands	-	+	-
F23.1	Blue cheese	Netherlands	-	+	+
F24.2	Blue cheese	Netherlands	-	+	+
F25.1	Blue cheese	Netherlands	-	+	+
F26.2	Blue cheese	Netherlands	-	+	+
F27.1	Blue cheese	USA	+	-	-
F28.1	Blue cheese	Latvia	-	+	+
F28.3	Blue cheese	Latvia	+	-	+
F29.1	Blue cheese	Denmark	-	+	+
F30.1	Blue cheese	Poland	-	+	+
F31.2	Blue cheese	Latvia	-	+	+
F32.1	Blue cheese	Denmark	-	+	+
F33.1	Blue cheese	Germany	-	+	+
F34.1	Blue cheese	Estonia	-	+	+
F35.1	Blue cheese	Germany	-	+	+
F36.1	Blue cheese	Germany	-	+	+
F37.1	Blue cheese	Germany	-	+	+
F38.1	Blue cheese	Germany	-	+	+
F39.1	Blue cheese	Germany	-	+	+

LUBEM Brest collection (directly isolated from various blue cheeses)

Primer name	Repetition pattern	Primer Forward		Primer Reverse	
		Sequence	Position on the reference genome	Sequence	Position on the reference genome
PROQ12	AT	ATCAATGAAACCGCGAAAAG	Proq06 395871 - 395890	GCTCGGGATTATCAGGTTTG	Proq06 396057 - 396038
PROQ13	AT	TGTGCCTATCGGATTTGATG	Proq06 1099272 - 1099291	ACGTCACAGCCAAGTTAGGG	Proq06 1099454 - 1099435
PROQ73	TTC	GAGCACGGCATGAGTCTGTA	Proq03 1674326 - 1674345	CTGACGCATTATCGCTTGAA	Proq03 1674507 - 1674488
PROQ74	TTC	ATGCACACTAACCGGGAAAA	Proq07 451954 - 451973	GCCTGGAATTGAGCCACTTA	Proq07 452109 - 452090
PROQ75	TTC	GCTCGCTTCTGAGATGGACT	Proq16 38357 - 38376	CCATGGCCCTGGTAATAATG	Proq16 38511 - 38492
PROQ77	CTC	ACGACCAGTCGCGTTAATCT	Proq04 1071562 - 1071581	GGTGTGAACAGTTTGCGGTA	Proq04 1071758 - 1071739
PROQ78	ACT	CGGGTTGCCTTAGGCTCT	Proq03 968614 - 968631	CGCTAATTGGAAATGCTGAC	Proq03 968812 - 968793
PROQ80	CTG	AGACTTATCGCCCGTGACAG	Proq07 268923 - 268942	TGAGCACTCGGTTGTACCAG	Proq07 269115 - 269096
PROQ81	CTG	GCGGGAGTTAGAGGACGAAT	Proq12 110107 - 110126	GTGCCAGACAACAACAGCAG	Proq12 110291 - 110272
PROQ88	AAC	CAGGAACAGCAGCAATTTCA	Proq07 400257 - 400276	GCGATTGTCTCTCGAAGGTG	Proq07 400439 - 400420
PROQ93	AAG	CGGTCTATGCAATAACAAGC	Proq12 420089 - 420109	CCTCGCTCCTTTTTCTCTC	Proq12 420264 - 420245

		CLUSTER B			CLUSTER A	
		Population 1	Population 2	Population 3	Population 4	Population 5
CLUSTER B	Population 2	0.5950				
	Population 3	0.5951	0.3450			
	Population 4	0.8336	0.6991	0.6024		
CLUSTER A	Population 5	0.9013	0.7869	0.6739	0.5127	
	Population 6	0.7945	0.5798	0.4156	0.4001	0.5314

-  Genetic differentiation between cluster A and cluster B
-  Genetic differentiation within cluster A
-  Genetic differentiation within cluster B

**K=2**

	Couples in linkage disequilibrium		Invalid data	
	Individuals	%	Individuals	%
CLUSTER B	28/66	42.42	21/64	32.81
CLUSTER A	7/66	10.60	25/66	37.88

**K = 6**

		Couples in linkage disequilibrium		Invalid data	
		Individuals	%	Individuals	%
CLUSTER B	Population 1	1/66	1.55	60/66	90.9
	Population 2	1/66	1.55	45/66	68.18
	Population 3	9/66	13.64	21/66	31.82
CLUSTER A	Population 4	3/66	4.55	38/66	57.58
	Population 5	0/66	0	55/66	83.33
	Population 6	1/66	1.55	40	66.67



## **VALORISATIONS SCIENTIFIQUES**





## Articles :

**Gillot G.**, Jany J.-L., Poirier E., Maillard M.-B., Debaets S., Thierry A., Coton E., Coton M. Functional diversity within the *Penicillium roqueforti* species (A soumettre au journal Applied and Environmental Microbiology).

**Gillot G.**, Jany J.-L., Domínguez-Santos R., Poirier E., Hidalgo P.I., Ullán R.V., Coton E., Coton M. Genetic basis for mycophenolic acid production and strain-dependent production variability in *Penicillium roqueforti* (A soumettre au journal Applied Microbiology and Biotechnology).

**Gillot G.**, Jany J.-L., Coton M., Le Floch G., Debaets S., Ropars J., López-Villavicencio M., Dupont J., Branca A., Giraud T. & Coton E. (2015). Insights into *Penicillium roqueforti* morphological and genetic diversity. PloS one, 10(6), e0129849. doi:10.1371/journal.pone.0129849

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

## Communications affichées :

**Gillot G.**, Jany J.-L., Coton M., Le Floch G., Debaets S., Maillard M.-B., Ropars J., López-Villavicencio M., Gagnaire V., Dupont J., Branca A., Thierry A., Giraud T., Coton E. Insights into *Penicillium roqueforti* morphological, genetic and functional diversity. International Dairy Federation (IDF) World Dairy Summit, 20-24 septembre 2015, Vilnius, Lituanie.

**Gillot G.**, Jany J.-L., Coton M., Debaets S., Ropars J., López-Villavicencio M., Dupont J., Giraud T., Coton E. Genetic diversity within *Penicillium roqueforti* species. Journée de Doctorants de l'École Doctorale SICMA, 25 Septembre 2014, Brest, France.

**Gillot G.**, Jany J.-L., Coton M., Debaets S., Ropars J., López-Villavicencio M., Dupont J., Giraud T., Coton E. Genetic diversity within *Penicillium roqueforti* species. FoodMicro 2014, 1-4 septembre 2014, Nantes, France.

**Gillot G.**, Jany J.-L., Coton M., Debaets S., Ropars J., López-Villavicencio M., Dupont J., Giraud T., Coton E. Fifty shades of blue: Insights into *Penicillium roqueforti* genetic diversity. ECFG12 (12<sup>th</sup> European Conference on Fungal Genetics), 23-27 mars 2014, Séville, Espagne.

**Gillot G.**, Jany J.-L., Coton M., Debaets S., Coton E. Fifty shades of blue. Journée des Doctorants de l'École Doctorale SICMA, 26 septembre 2013, Brest, France.

## **Prix et autres valorisations :**

**Gillot G.**, Decourcelle N., Dauer G., Barbier G., Coton E., Delmail D., Mounier J. (2016). 1-octanol, a self-inhibitor of spore germination in *Penicillium camemberti*. *Food Microbiology*, 57, 1–7. doi:10.1016/j.fm.2015.12.008

Lauréat 2014 de la bourse FIL (Fédération Internationale du Lait) France

# Insights into *Penicillium roqueforti* morphological, genetic and functional diversity



Guillaume Gillot<sup>1\*</sup>, Monika Coton<sup>1</sup>, Jean-Luc Jany<sup>1</sup>, Marie-Bernadette Maillard<sup>5,6</sup>, Gaétan Le Floch<sup>1</sup>, Stella Debaets<sup>1</sup>, Jeanne Ropars<sup>2,3,4</sup>, Manuela López-Villavicencio<sup>2</sup>, Valérie Gagnaire<sup>5,6</sup>, Joëlle Dupont<sup>2</sup>, Antoine Branca<sup>3,4</sup>, Tatiana Giraud<sup>3,4</sup>, Anne Thierry<sup>5,6</sup>, Emmanuel Coton<sup>1\*</sup>.

1- Université de Brest, EA 3882 Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Écologie Microbienne, ESIAB, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France  
 2- Origine, Structure, Evolution de la Biodiversité, UMR 7205 CNRS-MNHN, Muséum National d'Histoire Naturelle, CP39, 57 rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France  
 3- Ecologie, Systématique et Evolution, Université Paris-Sud, F-91405 Orsay cedex, France  
 4- CNRS, F-91405 Orsay cedex, France  
 5- INRA, UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, 65 rue de Saint Brieuc, 35000 Rennes, France  
 6- AGROCAMPIUS OUEST, UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, 65 rue de Saint Brieuc, 35000 Rennes, France  
 \*Email: guillaume-gillot@hotmail.fr/emmanuel.coton@univ-brest.fr



## Introduction

*Penicillium roqueforti*, an ascomycete fungus encountered in numerous substrates, is well-known for the typical appearance and flavor it gives to blue ripened cheeses such as Roquefort, Gorgonzola, Stilton or Danablu. From a taxonomic point of view, *P. roqueforti* is currently recognized as a single species although great phenotypic differences have been observed and several technological names used. This study investigated an unprecedented large worldwide *P. roqueforti* collection from 120 blue-veined cheeses and 21 other substrates in order to test (i) whether *P. roqueforti* phenotypic diversity corresponds to a complex of species, (ii) what is the *P. roqueforti* intraspecific diversity and population structure, and (iii) whether the assessed differentiated populations correspond to distinct functional traits (lipolytic and proteolytic activities, metabolite production including aromas and mycotoxins).

## A worldwide *P. roqueforti* collection was established... (18 countries, 120 cheeses, >180 isolates)

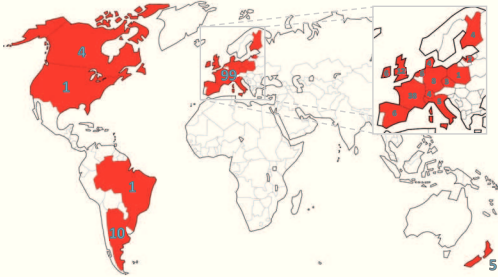


Figure 1: Origins and numbers of cheese samples.

+ 27 isolates from 21 other substrates (silage, wood, fruit, bread, meat, etc.)

## ... revealing a high morphological variability.

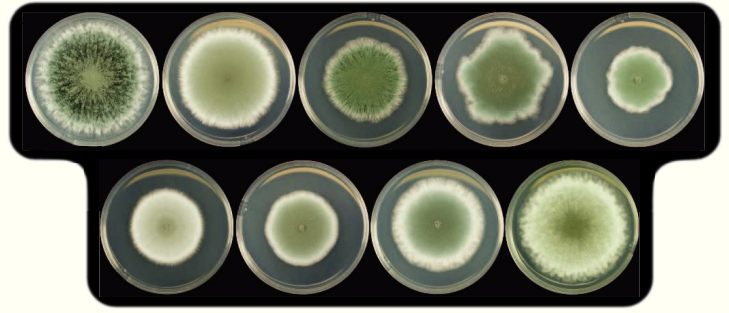


Figure 2: *P. roqueforti* morphotypes after 7-day culture at 25°C on Potato Dextrose Agar (PDA) medium. Nine distinct morphotypes were observed within the collection.

## Multiple gene genealogies did not reveal cryptic species...

A 5 gene sequencing approach (Genealogical Concordance - Phylogenetic Species Recognition) was carried out on 145 *P. roqueforti* isolates (126 from cheese, 19 from other sources) and 26 *Penicillium* spp..

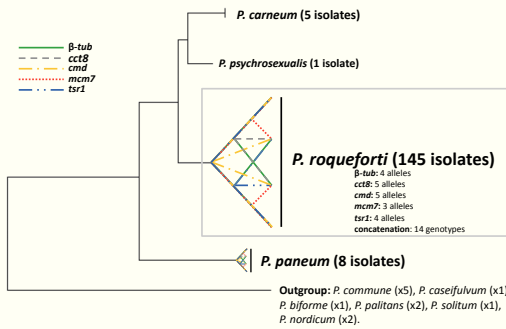


Figure 3: Schematic representation of the different tree topologies resulting from the 5 gene phylogenetic analyses.

As shown on Figure 3, incongruences among the five tree topologies have been detected. Moreover, due to the low phylogenetic signal of these genes usually used for fungal taxonomic positioning, three more polymorphic DNA fragments were investigated. Still, no cryptic species could be recognized.

## ... but microsatellites unraveled a strong population structure.

Microsatellite markers ( $n = 4$ ) were used to analyze diversity and structure of the worldwide *P. roqueforti* collection. 28 haplotypes were detected among 164 isolates. Three highly genetically differentiated clusters were detected (Figure 4).

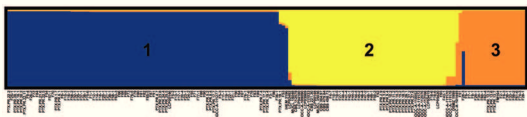


Figure 4: *P. roqueforti* population structure.

## Biochemical analyses revealed functional diversity...

Based on the previous genetic study, 55 representative *P. roqueforti* isolates were screened using diverse biochemical methods (Figure 5).

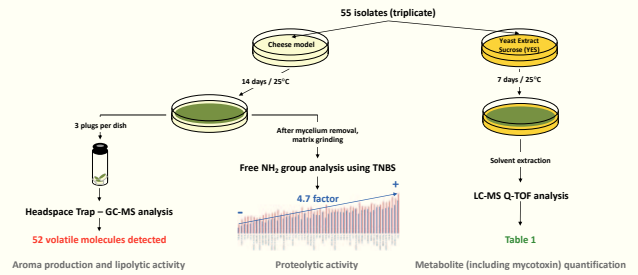


Figure 5: Experimental design to assess some metabolic properties.

Table 1: Metabolite (including mycotoxin) concentrations (ng/g/cm<sup>2</sup> mycelium) in YES medium after 7-day culture at 25°C.

	Fumigaclavine A	Eremofortin B	Roquefortine C	Eremofortin A	PR toxin	Mycophenolic acid	Andrastin A
Number of positive samples <sup>a</sup>	52 (43)	30 (22)	53 (53)	15 (5)	48 (32)	46 (23)	54 (54)
Range	8-241	5-58	18-237	5-25	3-330	4-57	17-220
Mean ± SD <sup>b</sup>	57 ± 47	15 ± 11	81 ± 39	11 ± 7	59 ± 88	16 ± 13	62 ± 41

<sup>a</sup> Number of positive samples with a concentration above Detection Limit (above Quantification Limit).

<sup>b</sup> Mean levels ± Standard Deviation (SD) of metabolite contents in positive samples above Quantification Limit

## ... and a noteworthy distribution for isolates originating from PDO/PGI cheeses was observed.

Concatenation of metabolic data (lipolytic and proteolytic activities, metabolite production including aromas and mycotoxins) revealed that isolates ( $n = 15$ ) originating from a given Protected Designation of Origin (PDO) or Protected Geographical Indication (PGI) cheese type were systematically associated to the same cluster (Figure 6), as previously described with genetic data (Figure 4).

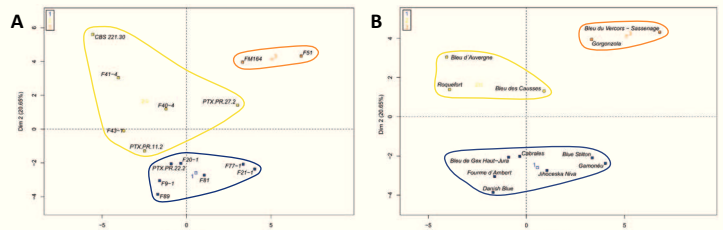


Figure 6: Correspondence analysis individual factor map representing isolates (A) and corresponding cheese (B) designations. Numbers (1, 2 & 3) refer to the previously described clusters (Figure 4).

## Conclusions

High genetic diversity was detected and biochemical analyses revealed contrasted functional diversity. No clear relationships were observed between genetic and functional data except for isolates originating from PDO/PGI cheeses. In the future, microsatellite markers could be used for strain selection in the cheese industry.

# Genetic diversity within *Penicillium roqueforti* species



Guillaume Gillot<sup>1</sup>, Jean-Luc Jany<sup>1</sup>, Monika Coton<sup>1</sup>, Stella Debaets<sup>1</sup>, Jérôme Mounier<sup>1</sup>, Jeanne Ropars<sup>2</sup>, Manuela López-Villavicencio<sup>3</sup>, Joëlle Dupont<sup>3</sup>, Tatiana Giraud<sup>2</sup>, Emmanuel Coton<sup>1</sup>



<sup>1</sup>Université de Brest, EA 3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Écologie Microbienne, ESIAB, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

<sup>2</sup>Ecologie, Systématique et Evolution, Université Paris-Sud, F-91405 Orsay cedex, France ; CNRS F-91405 Orsay cedex, France

<sup>3</sup>Origine, Structure, Evolution de la Biodiversité, UMR 7205 CNRS-MNHN, Muséum National d'Histoire Naturelle, CP39, 57 rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France

E-mail : guillaume.gillot@univ-brest.fr

## Introduction

*Penicillium roqueforti*, an ascomycete fungus encountered in numerous substrates, is mainly known for the typical appearance and flavor it gives to blue ripened cheeses such as Roquefort, Gorgonzola, Stilton or Danablu. From a taxonomic point of view, *P. roqueforti* is currently recognized as a single species although several distinct technological species names have been used and important morphological differences have been reported. This study investigated a large collection of *P. roqueforti* isolates from different cheeses worldwide, as well as from other substrates, in order to (i) determine whether *P. roqueforti* is indeed a single species and (ii) assess the intraspecific diversity and population structure.

## A worldwide collection was established... (18 countries, 120 cheeses, >200 isolates)

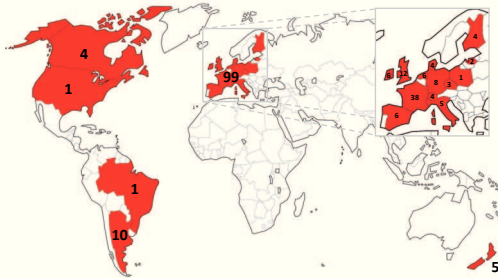


Figure 1: Origins and numbers of cheese samples.

+ other substrates (silage, wood, fruit, bread, meat, etc.)

## ...revealing a high morphological variability.

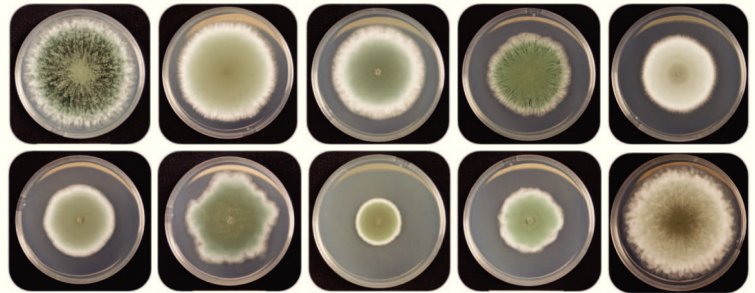


Figure 2: Examples of *P. roqueforti* morphotypes.

Ten distinct morphotypes were observed within the collection.

## Multiple gene genealogies did not reveal cryptic species...

A 5 gene sequencing approach (Genealogical Concordance - Phylogenetic Species Recognition) was carried out on 145 *P. roqueforti* isolates (126 from cheese, 19 from other sources) and 28 *Penicillium* spp..

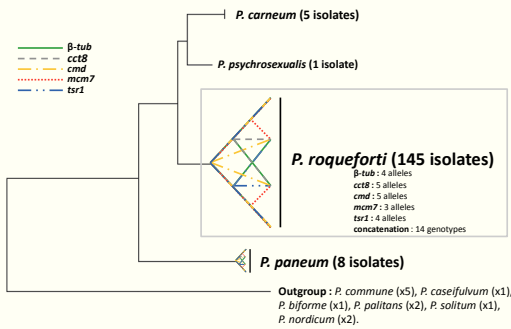


Figure 3: Schematic representation of the different tree topologies resulting from the 5 gene phylogenetic analyses.

As shown on Figure 3, incongruences among the five tree topologies have been detected. Moreover, due to the low phylogenetic signal of these genes usually used for fungal taxonomic positioning, three more polymorphic DNA fragments were investigated (Figure 4). Still, no cryptic species could be recognized.

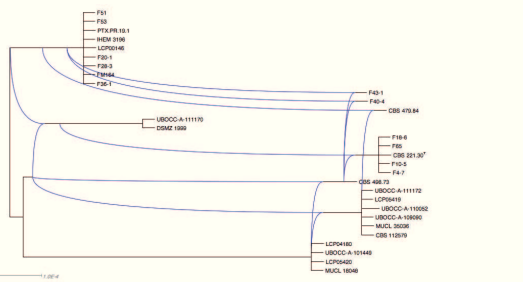


Figure 4: Cluster network consensus of the three bayesian trees for 30 isolates. Hardwire network shows incongruences between clades.

## ...but microsatellites unraveled a strong population structure.

Microsatellite markers (4) were used in order to analyze the diversity and structure of the worldwide *P. roqueforti* collection. 31 haplotypes were detected among 164 isolates. Three highly genetically differentiated clusters were detected (Figure 5-6 and Table 1).

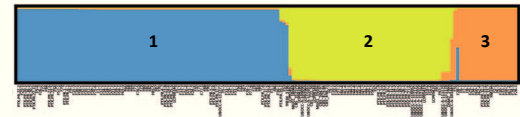


Figure 5: *P. roqueforti* population structure.

Strains isolated from a given Protected Designation of Origin (PDO) or Protected Geographical Indication (PGI) cheese type were systematically associated to the same cluster (Figure 7).

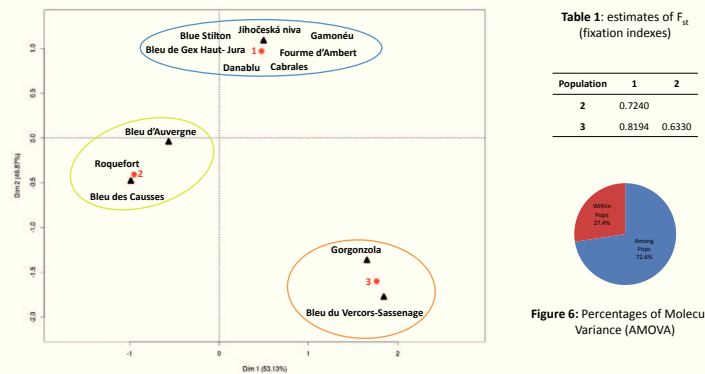


Table 1: estimates of  $F_{st}$  (fixation indexes)

Population	1	2
2	0.7240	
3	0.8194	0.6330

Figure 6: Percentages of Molecular Variance (AMOVA)

Figure 7: Correspondence analysis individual factor map (PDO/PGI cheeses & clusters as obtained by STRUCTURE). Red numbers refer to the corresponding clusters (Figure 5). (The authors are thankful to G. Le Floch for his help with CA analysis).

The high diversity within clusters and the strong divergence between populations, given the human time-scale of domestication suggest that humans have probably further differentiated pre-existing differentiated populations.

## Perspectives

Further physiological and metabolic studies are now needed to test for the presence of a link between *P. roqueforti* diversity and structure described in the present study and putative functional diversity. The microsatellite markers developed here could represent potential markers for selecting strains of interest for the cheese industry.







# Fifty shades of blue

## Introduction

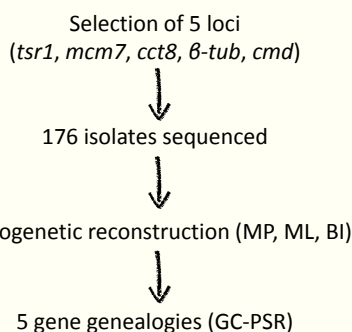
While *Penicillium roqueforti*, an Ascomycete fungus, can be encountered in numerous substrates, it is mainly known for the appearance and flavor it gives to blue ripened cheeses such as Roquefort, Gorgonzola, Stilton or Danablu. From a taxonomic point of view, *P. roqueforti* is currently recognized as a single species although important morphological differences have been reported. In some cases, this has led to the occurrence of several distinct technological species names. This study investigates for the first time a large collection of *Penicillium roqueforti* morphotypes isolated from different cheeses worldwide as well as from other substrates in order to (i) determine whether *Penicillium roqueforti* is a single species and (ii) assess the intraspecific diversity and structure of *P. roqueforti* which could have been impacted by domestication due to cheesemaking.

## Material and Methods

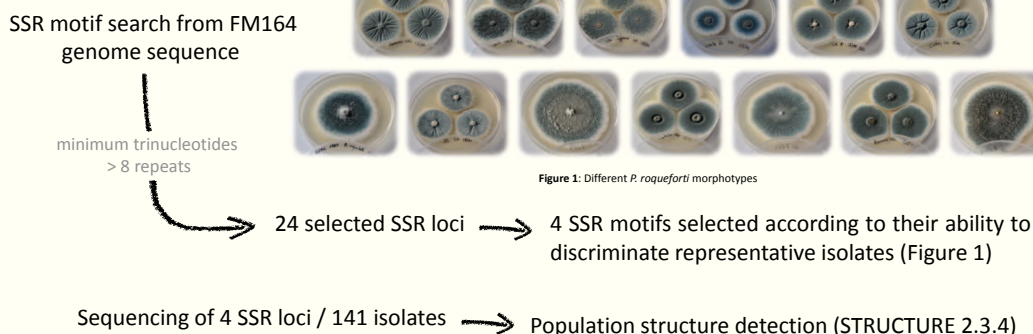
### Collection

A worldwide collection was created from 116 cheeses originating from 20 different countries. Overall, more than 200 isolates composed the collection including isolates from others substrates like silage, fruit, bread, meat, cocoa, human sputum, cork, syrups, etc.

### GC-PSR



### SSR



## Results

### GC-PSR

A five gene sequencing approach was carried out on 145 *P. roqueforti* isolates (126 from cheese, 19 from other substrates and collections) and 31 *Penicillium* spp.. The GC-PSR analysis (Figure 2) is currently in progress.

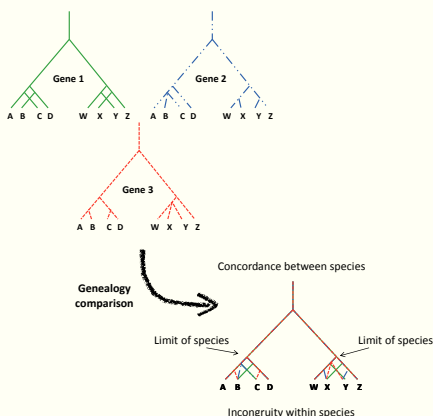


Figure 2: GC-PSR principle (Taylor et al., 2000)

Preliminary results suggest that the 145 isolates belong to a single species.

### SSR

Table 1: Diversity parameters observed for four SSR loci among 141 isolates

Locus	Allele	Motif repeats	Allele frequency	N <sup>a</sup>	PIC <sup>b</sup>			
Proq16	A	10	0,007	8	0,453			
	B	11	0,206					
	C	12	0,007					
	D	16	0,709					
	E	17	0,014					
	F	18	0,021					
	G	19	0,021					
	H	20	0,014					
	putative null allele	-	-			-	-	
Proq17	A	12	0,248	3	0,574			
	B	13	0,589					
	C	14	0,128					
	putative null allele	-	0,035			-	-	
	Proq12_2	A	4			0,007	10	0,613
	B	6	0,007					
	C	9	0,199					
	D	17	0,007					
	E	22	0,014					
	F	23	0,028					
	G	27	0,007					
H	28	0,007						
I	30	0,574						
J	31	0,128						
putative null allele	-	0,021	-	-				
Proq11_3	A	0	0,014	8	0,609			
	B	7	0,057					
	C	9	0,014					
	D	11	0,163					
	E	12	0,043					
	F	13	0,589					
	G	14	0,113					
	H	15	0,007					
	putative null allele	-	-			-	-	

<sup>a</sup> No. number of alleles  
<sup>b</sup> PIC, polymorphism information content

SSR markers were developed for *Penicillium roqueforti* and allowed to look at the structure of the worldwide *P. roqueforti* collection (Table 1). 21 haplotypes were detected among 141 isolates.

The population structure analysis suggests that the worldwide *P. roqueforti* collection could be structured into 3 clusters (Figures 3 & 4). Indeed, K=3 is the most probable number of clusters according to an analysis performed with Structure (Pritchard, 2009).

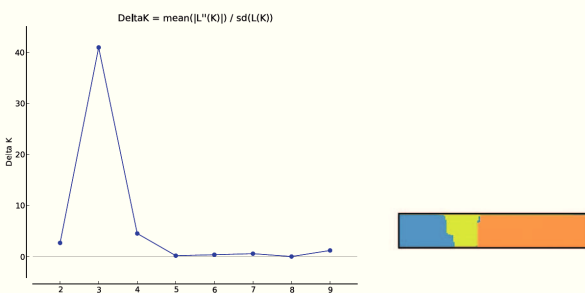


Figure 3: Implementation of the Evanno method for detecting the number of K groups for which the subsequent increase in K yields less information.

Figure 4: Coefficients of membership in the various gene pools inferred by the STRUCTURE program, based on the 4 polymorphic microsatellite markers for all the 141 *Penicillium roqueforti* strains.

Further analyses are currently in progress and will allow to determine which haplotypes compose each of the 3 clusters. Different hypotheses will be investigated in order to detect (i) if cheese isolates and isolates from other substrates are intermingled or not ; (ii) if the genetic structure is correlated with the geographic origin or technological data.

## Conclusion and Perspectives

By creating a large worldwide *P. roqueforti* collection (isolates originating from various substrates and more specifically a large panel of blue ripened cheeses) and by developing specific SSR markers, the intraspecific genetic diversity within *P. roqueforti* is being described for the first time. In the future, these data will be correlated to functional diversity properties by evaluating strain-dependent metabolic traits such as aroma or mycotoxin production.



FRANCE

# FIL FRANCE INFOS

N° 39 > 29 AOUT 2014

## SOMMAIRE

- **Annulation du Sommet Mondial 2014**
- Nouvelle Stratégie FIL
- Méthodes d'analyse de la matière grasse laitière
- Réactivation du CCMMP
- Résultats de la Bourse FIL France
- Publication
- Événement

## ANNULATION DU SOMMET MONDIAL 2014

### FIL France accueille les Comités Permanents et les réunions statutaires à Paris du 1<sup>e</sup> au 5 décembre

En raison de la situation politique actuelle en Israël, le Comité d'organisation et la FIL ont pris la décision d'annuler le Sommet Mondial qui devait se tenir à Tel Aviv du 27 au 31 octobre.

Les réunions de travail des Stan-

ding Committees et les réunions statutaires (Assemblée générale, SPCC, réunion des Secrétaires nationaux,...) de la FIL, qui se déroulent habituellement avant le Sommet, doivent malgré tout avoir lieu afin que le travail de la FIL

progresses normalement.

Les experts internationaux se réuniront finalement à Paris, et pour la plupart d'entre eux à la Maison du Lait à Paris, du 1 au 5 décembre.

Le planning des réunions sera arrêté prochainement.

## NOUVELLE STRATÉGIE FIL

### La FIL revoit sa stratégie et ses domaines de travail prioritaires

La FIL est un lieu d'échanges entre les acteurs du monde laitier, leur permettant de définir des messages communs et de les porter d'une seule voix.

Cependant, ses ressources sont limitées et son programme de travail est large. Aussi, il a semblé nécessaire de prioriser les travaux dans le cadre d'une vision stratégique bien identifiée: aider à nourrir le monde avec des produits laitiers sûrs et durables.

Le rôle de la FIL en tant que source d'expertise scientifique pour le secteur laitier mondial, et de porte-parole des messages du secteur auprès des organisations internationales et des parties prenantes a été réaffirmé.

Quatre domaines prioritaires ont ainsi été identifiés:

- Les normes
- La durabilité
- La nutrition
- La sécurité des aliments

Priorité sera donc donnée aux projets entrant dans l'un de ces 4 domaines. Les autres sujets seront traités en fonction des ressources et du temps disponibles.

La FIL, par l'intermédiaire de ses comités nationaux, s'efforcera de continuer à renforcer son expertise en intégrant de nouveaux experts pour contribuer à ses travaux.

## MÉTHODES D'ANALYSE DE LA MATIÈRE GRASSE

### Les méthodes d'analyse de la matière grasse laitière restent sectorielles

On observe une tendance de fond au sein de l'ISO pour une « horizontalisation » des méthodes, c'est-à-dire des méthodes applicables à une grande variété de produits.

Ceci s'illustre notamment dans le cadre du développement de la norme ISO 12966-4 "Animal and vegetable fats and oils — Determination of methyl esters of fatty acids". Le groupe d'experts "corps gras" de l'ISO, en charge de l'élaboration de cette norme, y avait inclus le lait et les produits laitiers.

Le secteur laitier a toujours fait valoir les spécificités de sa matrice, et la nécessité de maintenir des normes « verticales » spécifiques de ces produits.

La matière grasse laitière, dont l'extraction est un point critique d'un point de vue analytique, est particulièrement concernée.

A la demande de la France, la FIL a relayé la demande d'exclusion du lait et des produits laitiers du domaine d'application de cette nouvelle norme auprès de l'ISO. En

effet, la FIL travaille à l'élaboration de méthodes d'analyse conjointes FIL-ISO spécifiques du lait et des produits laitiers.

Cette demande a été entendue, et le secrétariat de l'ISO a demandé au groupe « Corps gras » d'exclure le lait et les produits laitiers de leurs travaux en cours et à venir. En cas de besoin, les groupes d'experts ISO/FIL se chargeront de l'élaboration des méthodes d'analyse relatives à la matière grasse laitière.



## CODEX

### Le CCMMP réactivé pour traiter des poudres de perméat de lactosérum et des fromages fondus

Le numéro 38 de FIL France Infos consacrait un article à la proposition de projet de norme Codex sur les poudres de perméat de lactosérum.

Le projet a été présenté par le Danemark, pour la Communauté Européenne, lors de la réunion de la Commission du Codex Alimentarius (CAC) qui a eu lieu en juillet à Genève.

Un groupe de travail électronique a été créé, présidé par le Danemark, sous la responsabilité du Comité Codex pour le Lait et les Produits laitiers (CCMMP).

Par le passé, le CCMMP avait reçu l'assistance de la FIL dans le développement de normes laitières, et la FIL proposera à nouveau son aide active au développement de cette norme. Les experts français intéressés par le sujet sont invités à contacter FIL France.

Par ailleurs, le projet de norme sur les fromages fondus a été relancé. Malgré les efforts déployés pendant 10 ans, les travaux sur le sujet n'ont jamais abouti à un consensus en raison de différences notables entre les pays dans la défini-

tion de « fromage fondu ».

Cependant, la CAC a décidé de réactiver le CCMMP, qui travaillera par correspondance à l'élaboration d'un nouveau projet de norme. Un groupe de travail physique, présidé par la Nouvelle Zélande, se réunira fin 2014/ début 2015 afin de rédiger un premier document.

Là encore, la FIL suivra les travaux et apportera son expertise technique sur tous les points où cela s'avèrera possible et nécessaire. FIL France suivra activement ce dossier.

## BOURSE FIL FRANCE

### Un sujet sur *P.Roqueforti* récompensé

Cette année, c'est le dossier de Guillaume Gillot, doctorant au LUBEM, qui a été retenu. Il travaille sur la diversité structurale et fonctionnelle au sein de l'espèce *Penicillium roqueforti*. Le premier objectif de la thèse était de définir les limites d'espèces au sein des *Penicillium* des fromages à pâte persillée. La méthode GC-PSR a permis de mettre en évidence que l'espèce actuelle *P. roqueforti* ne renfermait a priori qu'une seule espèce

phylogénétique. Dans un deuxième temps, la diversité intraspécifique a été étudiée par le biais de marqueurs génétiques. La prochaine étape permettra d'évaluer l'existence de potentialités métaboliques souches-dépendantes.

Ce projet qui se terminera en septembre 2015 permettra de générer des données génétiques et métaboliques sur une espèce peu étudiée malgré son importance en production fromagère. Les résultats

pourront être exploités pour permettre une meilleure maîtrise des procédés de production, en particulier en proposant aux industriels fromagers des outils pertinents de sélection d'isolats présentant des rapports bénéfiques/risques les plus intéressants.

Le Sommet de Tel Aviv étant annulé, il est proposé au boursier d'assister au Sommet 2015 à Vilnius.

## PUBLICATIONS FIL

### Guide FIL/FAO/IFCN sur les systèmes d'alimentation des animaux laitiers dans le monde

Pour la première fois, un guide rassemble des informations sur les systèmes d'alimentation des animaux laitiers pour plus de 65 pays sur 5 continents.

Issu de la collaboration entre la FIL, la FAO et l'IFCN, ce guide a pour objectif de servir de référence pour d'autres projets, tels que la réduction de l'empreinte carbone de la filière, l'impact de l'alimentation animale sur la composition du lait, mais aussi sur la santé et le bien être animal ou la productivité.

La collaboration entre les 3 organisations

permet au guide d'apporter des informations selon 3 approches: La FIL a apporté des données détaillées sur les différentes pratiques d'alimentation, sur la base de la consultation de ses membres. L'IFCN a fourni des données sur un régime type, accompagné de données économiques par pays. La FAO a quant à elle choisi l'approche du « feeding basket », qui indique le pourcentage de chaque constituant dans la ration globale.

La publication de ce rapport est l'aboutis-

sement d'un projet proposé par la France et sur lequel se sont largement investis les experts français et internationaux.

Il est prévu que ce document soit mis à jour régulièrement afin qu'il reste une source de données de référence.

Le rapport complet peut être téléchargé gratuitement sur le site internet de la FIL [www.fil-idf.org](http://www.fil-idf.org)

Par ailleurs, un site internet dédié a été créé: [www.dairyfeedingsystems.org](http://www.dairyfeedingsystems.org)

## EVENEMENT

### 7e symposium FIL « Sheep, Goat and other non-Cow Milk 2015 »

Ce symposium se déroulera du 23 au 25 mars 2015 à Limasol (Chypre). Il s'adresse aux scientifiques et professionnels s'intéressant aux laits de chèvres, brebis et laits autres que vache.

L'appel à posters est prolongé jusqu'au **1e octobre 2014**. toutes les informations sont disponibles sur le site: [www.idfsheepandgoat.org](http://www.idfsheepandgoat.org)

Retrouvez-nous  
sur le Web :  
[www.fil-france.fr](http://www.fil-france.fr)  
[filfrance@cniel.com](mailto:filfrance@cniel.com)

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



- Abbas, A., Dobson, A.D.W., 2011. Yeasts and Molds: *Penicillium roqueforti*, in: Fuquay, J.W. (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press, San Diego, pp. 772–775.
- Adler-Nissen, J., 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.* 27, 1256–1262. doi:10.1021/jf60226a042
- Ainsworth, G.C., 1973. Introduction and keys to higher taxa, in: Ainsworth, G.C., Sparrow, F.K., Sussman, A.S. (Eds.), *The Fungi: An Advanced Treatise*. Academic Press, London, pp. 1–7.
- Alastruey-Izquierdo, A., Hoffmann, K., Hoog, G.S. de, Rodriguez-Tudela, J.L., Voigt, K., Bibashi, E., Walther, G., 2010. Species recognition and clinical relevance of the zygomycetous genus *Lichtheimia* (syn. *Absidia* Pro Parte, *Mycoclados*). *J. Clin. Microbiol.* 48, 2154–2170. doi:10.1128/JCM.01744-09
- Albillos, S.M., García-Estrada, C., Martín, J.-F., 2011. Spanish blue cheeses: functional metabolites, in: Foster, R.D. (Ed.), *Cheese: Types, Nutrition and Consumption*. Nova Science Publishers, Inc, pp. 89–105.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M., 1996. *Introductory mycology*. John Wiley & Sons, New York, p. 869 pp.
- Ali, H., Ries, M.I., Nijland, J.G., Lankhorst, P.P., Hankemeier, T., Bovenberg, R.A.L., Vreeken, R.J., Driessen, A.J.M., 2013. A branched biosynthetic pathway is involved in production of roquefortine and related compounds in *Penicillium chrysogenum*. *PLoS ONE* 8, e65328. doi:10.1371/journal.pone.0065328
- Almena-Aliste, M., Mietton, B., 2014. Cheese classification, characterization, and categorization: a global perspective, in: Donnelly, C.W. (Ed.), *Cheese and Microbes*. ASM Press, Washington, pp. 39–71.
- Alonso, L., Juarez, M., Ramose, M., Martin-Alvarez, P.J., 1987. Overall composition, nitrogen fractions and fat characteristics of Cabrales cheese during ripening. *Z. Für Lebensm.-Unters. Forsch.* 185, 481–486. doi:10.1007/BF01042813
- Alonso, V.A., Pereyra, C.M., Keller, L.A.M., Dalcero, A.M., Rosa, C.A.R., Chiacchiera, S.M., Cavaglieri, L.R., 2013. Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *J. Appl. Microbiol.* doi:10.1111/jam.12178
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Anderson, J.B., Kohn, L.M., 1998. Genotyping, gene genealogies and genomics bring fungal population genetics above ground. *Trends Ecol. Evol.* 13, 444–449. doi:10.1016/S0169-5347(98)01462-1
- Anderson, J.B., Ullrich, R.C., 1979. Biological species of *Armillaria mellea* in North America. *Mycologia* 71, 402. doi:10.2307/3759160
- Ardö, Y., 2011. Cheese: blue mold cheese, in: Fuquay, J.W. (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 767–772.
- Arnold, A.E., Lutzoni, F., 2007. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* 88, 541–549. doi:10.1890/05-1459
- Arnold, D.L., Scott, P.M., McGuire, P.F., Harwig, J., Nera, E.A., 1978. Acute toxicity studies on roquefortine and PR toxin, metabolites of *Penicillium roqueforti*, in the mouse. *Food Cosmet. Toxicol.* 16, 369–371. doi:10.1016/S0015-6264(78)80009-1
- Auerbach, H., Oldenburg, E., Weissbach, F., 1998. Incidence of *Penicillium roqueforti* and roquefortine C in silages. *J. Sci. Food Agric.* 76, 565–572. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199804)76:4<565::AID-JSFA990>3.0.CO;2-6

- Avise, J.C., Ball, R.M.J., 1990. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Oxf. Surv. Evol. Biol.* 7, 45–67.
- Avise, J.C., Wollenberg, K., 1997. Phylogenetics and the origin of species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 7748–7755.

## -B-

---

- Baldauf, S.L., 2008. An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. *J. Syst. Evol.* 46, 263–273.
- Baldauf, S.L., Doolittle, W.F., 1997. Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 12007–12012.
- Baldauf, S.L., Roger, A.J., Wenk-Siefert, I., Doolittle, W.F., 2000. A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science* 290, 972–977. doi:10.1126/science.290.5493.972
- Ballester, A.-R., Marcet-Houben, M., Levin, E., Sela, N., Selma-Lázaro, C., Carmona, L., Wisniewski, M., Droby, S., González-Candelas, L., Gabaldón, T., 2015. Genome, transcriptome, and functional analyses of *Penicillium expansum* provide new insights into secondary metabolism and pathogenicity. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 28, 232–248. doi:10.1094/MPMI-09-14-0261-FI
- Barłowska, J., Sz wajkowska, M., Litwińczuk, Z., Król, J., 2011. Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 10, 291–302. doi:10.1111/j.1541-4337.2011.00163.x
- Bass, D., Richards, T.A., 2011. Three reasons to re-evaluate fungal diversity “on Earth and in the ocean.” *Fungal Biol. Rev.* 25, 159–164. doi:10.1016/j.fbr.2011.10.003
- Bentley, R., 2000. Mycophenolic acid: a one hundred year odyssey from antibiotic to immunosuppressant. *Chem. Rev.* 100, 3801–3826. doi:10.1021/cr990097b
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M., 2001. Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.* 11, 259–274. doi:10.1016/S0958-6946(01)00056-5
- Beresford, T., Williams, A., 2004. The microbiology of cheese ripening, in: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier Academic Press, London, pp. 287–317.
- Besl, H., Bresinsky, A., 1997. Chemosystematics of Suillaceae and Gomphidiaceae (suborder Suillineae). *Plant Syst. Evol.* 206, 223–242. doi:10.1007/BF00987949
- Birch, A.J., English, R.J., Massy-Westropp, R.A., Slaytor, M., Smith, H., 1958. 67. Studies in relation to biosynthesis. Part XIV. The origin of the nuclear methyl groups in mycophenolic acid. *J. Chem. Soc.* 365–368. doi:10.1039/JR9580000365
- Birch, A.J., English, R.J., Massywestropp, R., Smith, H., 1957. The origin of the terpenoid structures in mycelianamide and mycophenolic acid. Mevalonic acid as an irreversible precursor in terpene biosynthesis. *Proc. Chem. Soc.* 233–234.
- Birkinshaw, J.H., Bracken, A., Morgan, E.N., Raistrick, H., 1948. Studies in the biochemistry of micro-organisms. 78. The molecular constitution of mycophenolic acid, a metabolite of *Penicillium brevi-compactum* Dierckx. II. Possible structural formulae for mycophenolic acid. *Biochem J* 43, 216–223.
- Blackwell, M., 2011. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am. J. Bot.* 98, 426–438. doi:10.3732/ajb.1000298
- Bolton, M.D., Secor, G.A., Rivera, V., Weiland, J.J., Rudolph, K., Birla, K., Rengifo, J., Campbell, L.G., 2012. Evaluation of the potential for sexual reproduction in field populations of *Cercospora beticola* from USA. *Fungal Biol.* 116, 511–521. doi:10.1016/j.funbio.2012.01.011

- Borroto-Esoda, K., Myrick, F., Feng, J., Jeffrey, J., Furman, P., 2004. In vitro combination of amdoxovir and the nosine monophosphate dehydrogenase inhibitors mycophenolic acid and ribavirin demonstrates potent activity against wild-type and drug-resistant variants of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4387–4394. doi:10.1128/AAC.48.11.4387-4394.2004
- Boysen, M.E., Jacobsson, K.-G., Schnürer, J., 2000. Molecular identification of species from the *Penicillium roqueforti* group associated with spoiled animal feed. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1523–1526. doi:10.1128/AEM.66.4.1523-1526.2000
- Boysen, M., Skouboe, P., Frisvad, J., Rossen, L., 1996. Reclassification of the *Penicillium roqueforti* group into three species on the basis of molecular genetic and biochemical profiles. *Microbiology* 142, 541–549. doi:10.1099/13500872-142-3-541
- Brock, N.L., Dickschat, J.S., 2013. PR toxin biosynthesis in *Penicillium roqueforti*. *ChemBioChem* 14, 1189–1193. doi:10.1002/cbic.201300254
- Bugeja, H.E., Hynes, M.J., Andrianopoulos, A., 2010. The RFX protein RfxA is an essential regulator of growth and morphogenesis in *Penicillium marneffeii*. *Eukaryot. Cell* 9, 578–591. doi:10.1128/EC.00226-09
- Bullerman, L.B., 1984. Effects of potassium sorbate on growth and patulin production by *Penicillium patulum* and *Penicillium roqueforti*. *J. Food Prot.* 47, 312–320.
- Burgaud, G., Hué, N.T.M., Arzur, D., Coton, M., Perrier-Cornet, J.M., Jebbar, M., Barbier, G., 2015. Effects of hydrostatic pressure on yeasts isolated from deep-sea hydrothermal vents. *Res. Microbiol.* 1–10. doi:10.1016/j.resmic.2015.07.005

---

-C-

---

- Cakmakci, S., Cetin, B., Gurses, M., Dagdemir, E., Hayaloglu, A.A., 2012. Morphological, molecular, and mycotoxigenic identification of dominant filamentous fungi from Moldy Civil Cheese. *J. Food Prot.* 75, 2045–2049. doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-107
- Cakmakci, S., Gurses, M., Hayaloglu, A.A., Cetin, B., Sekerci, P., Dagdemir, E., 2015. Mycotoxin production capability of *Penicillium roqueforti* in strains isolated from mould-ripened traditional Turkish civil cheese. *Food Addit. Contam. Part A* 32, 245–249. doi:10.1080/19440049.2014.997808
- Callon, C., Delbès, C., Duthoit, F., Montel, M.-C., 2006. Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 172–180. doi:10.1016/j.syapm.2005.07.008
- Calvert, M.J., Ashton, P.R., Allemann, R.K., 2002. Germacrene A is a product of the aristolochene synthase-mediated conversion of farnesylpyrophosphate to aristolochene. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 11636–11641. doi:10.1021/ja020762p
- Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W., Keller, N.P., 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 447–459. doi:10.1128/MMBR.66.3.447-459.2002
- Canonica, L., Kroszczyński, W., Ranzi, B.M., Rindone, B., Santaniello, E., Scolastico, C., 1972. Biosynthesis of mycophenolic acid. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* 2639–2643. doi:10.1039/P19720002639
- Cantor, M.D., van den Tempel, T., Hansen, T.K., Ardö, Y., 2004. Blue cheese, in: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier Academic Press, London, pp. 175–198.
- Cavalier-Smith, T., 2004. Only six kingdoms of life. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 271, 1251–1262. doi:10.1098/rspb.2004.2705

- Cavalier-Smith, T., 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev.* 73, 203–266. doi:10.1111/j.1469-185X.1998.tb00030.x
- Cepeda-García, C., Domínguez-Santos, R., García-Rico, R.O., García-Estrada, C., Cajiao, A., Fierro, F., Martín, J.F., 2014. Direct involvement of the CreA transcription factor in penicillin biosynthesis and expression of the pcbAB gene in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 7113–7124. doi:10.1007/s00253-014-5760-1
- Cerning, J., Gripon, J.C., Lamberet, G., Lenoir, J., 1987. Les activités biochimiques des *Penicillium* utilisés en fromagerie. *Le Lait* 67, 3–39. doi:10.1051/lait:198711
- Chalmers, A.A., Jesus, A.E. de, Gorst-Allman, C.P., Steyn, P.S., 1981. Biosynthesis of PR toxin by *Penicillium roqueforti*. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* 2899–2903. doi:10.1039/P19810002899
- Chang, S.-C., Cheng, M.-K., Wei, Y.-H., 2004. Production of PR-imine, PR-acid, and PR-amide relative to the metabolism of PR toxin by *Penicillium roqueforti*. *Fungal Sci.* 19, 39–45.
- Chang, S.-C., Lei, W.-Y., Tsai, Y.-C., Wei, Y.-H., 1998. Isolation, purification, and characterization of the PR oxidase from *Penicillium roqueforti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 5012–5015.
- Chang, S.C., Lu, K.L., Yeh, S.F., 1993. Secondary metabolites resulting from degradation of PR toxin by *Penicillium roqueforti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 981–986.
- Chang, S.-C., Yeh, S.-F., Li, S.-Y., Lei, W.-Y., Chen, M.-Y., 1996. A novel secondary metabolite relative to the degradation of PR toxin by *Penicillium roqueforti*. *Curr. Microbiol.* 32, 141–146. doi:10.1007/s002849900025
- 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. doi:10.1038/ncomms3876
- Chen, H., Patterson, N., Reich, D., 2010. Population differentiation as a test for selective sweeps. *Genome Res.* 20, 393–402. doi:10.1101/gr.100545.109
- Chung, Y., 2012. Inference of gene tree discordance and recombination. M.Sc. Thesis, University of Wisconsin-Madison.
- Ciccarelli, F.D., Doerks, T., Mering, C. von, Creevey, C.J., Snel, B., Bork, P., 2006. Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science* 311, 1283–1287. doi:10.1126/science.1123061
- Cline, E., 2005. Implications of changes to Article 59 of the International Code of Botanical Nomenclature enacted at the Vienna congress. *Inoculum* 56, 3–5.
- CNIEL, 2015. L'économie laitière en chiffres, Edition 2015, CNIEL.
- CNIEL, 2014. L'économie laitière en chiffres, Edition 2014, CNIEL.
- Coghill, D., 1979. The ripening of blue vein cheese: a review. *Aust. J. Dairy Technol.* 34, 72–75.
- Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G., 2004. Lipolysis and catabolism of fatty acids in cheese, in: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier Academic Press, London, pp. 373–389.
- Colombo, L., Gennari, C., Potenza, D., Scolastico, C., Aragozzini, F., Gualandris, R., 1982. 6-Farnesyl-5,7-dihydroxy-4-methylphthalide oxidation mechanism in mycophenolic acid biosynthesis. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* 365–373. doi:10.1039/P19820000365
- Cracraft, J., 1983. Species concepts and speciation analysis, in: Johnston, R.F. (Ed.), *Current Ornithology*. Springer US, pp. 159–187.

Cronin, D.A., Ward, M.K., 1971. The characterisation of some mushroom volatiles. *J. Sci. Food Agric.* 22, 477–479. doi:10.1002/jsfa.2740220912

## -D-

---

- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9, 772–772. doi:10.1038/nmeth.2109
- Dartey, C.K., Kinsella, J.E., 1971. Rate of formation of methyl ketones during blue cheese ripening. *J. Agric. Food Chem.* 19, 771–774. doi:10.1021/jf60176a029
- Day, E.A., Anderson, D.F., 1965. Cheese flavor, gas chromatographic and mass spectral identification of neutral components of aroma fraction and blue cheese. *J. Agric. Food Chem.* 13, 2–4. doi:10.1021/jf60137a001
- Deacon, J.W., 2006. *Fungal biology*, 4th ed. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
- De Frutos, M., Sanz, J., Martinez-Castro, I., 1991. Characterization of artisanal cheeses by GC and GC/MS analysis of their medium volatility (SDE) fraction. *J. Agric. Food Chem.* 39, 524–530. doi:10.1021/jf00003a019
- Degnan, J.H., Rosenberg, N.A., 2009. Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. *Trends Ecol. Evol.* 24, 332–340. doi:10.1016/j.tree.2009.01.009
- De Llano, D.G., Polo, M.C., Ramos, M., 1995. Study of proteolysis in artisanal cheeses: high performance liquid chromatography of peptides. *J. Dairy Sci.* 78, 1018–1024. doi:10.3168/jds.S0022-0302(95)76717-0
- Dettman, J.R., Jacobson, D.J., Turner, E., Pringle, A., Taylor, J.W., 2003. Reproductive isolation and phylogenetic divergence in *Neurospora*: comparing methods of species recognition in a model eukaryote. *Evolution* 57, 2721–2741. doi:10.1111/j.0014-3820.2003.tb01515.x
- Dettman, J.R., Sirjusingh, C., Kohn, L.M., Anderson, J.B., 2007. Incipient speciation by divergent adaptation and antagonistic epistasis in yeast. *Nature* 447, 585–588. doi:10.1038/nature05856
- Diamond, M.S., Zachariah, M., Harris, E., 2002. Mycophenolic acid inhibits dengue virus infection by preventing replication of viral RNA. *Virology* 304, 211–221. doi:10.1006/viro.2002.1685
- Diezhandino, I., Fernández, D., González, L., McSweeney, P.L.H., Fresno, J.M., 2015. Microbiological, physico-chemical and proteolytic changes in a Spanish blue cheese during ripening (Valdeón cheese). *Food Chem.* 168, 134–141. doi:10.1016/j.foodchem.2014.07.039
- Domínguez-Santos, R., García-Estrada, C., Kosalková, K., Prieto, C., Santamarta, I., Martín, J.-F., 2015. PcFKH1, a novel regulatory factor from the forkhead family, controls the biosynthesis of penicillin in *Penicillium chrysogenum*. *Biochimie* 115, 162–176. doi:10.1016/j.biochi.2015.05.015
- Domínguez-Santos, R., Martín, J.-F., Kosalková, K., Prieto, C., Ullán, R.V., García-Estrada, C., 2012. The regulatory factor PcRFX1 controls the expression of the three genes of  $\beta$ -lactam biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genet. Biol.* 49, 866–881. doi:10.1016/j.fgb.2012.08.002
- Driehuis, F., Spanjer, M.C., Scholten, J.M., te Giffel, M.C., 2008. Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes. *J. Dairy Sci.* 91, 4261–4271. doi:10.3168/jds.2008-1093



- Dubeuf, J.-P., Boyazoglu, J., 2009. An international panorama of goat selection and breeds. *Livest. Sci., Special Issue: Animal Genetic Resources* 120, 225–231. doi:10.1016/j.livsci.2008.07.005
- Dumay, R., 1982. *Le Roquefort. Perspectives Aveyronnaises/Montalba, Rodez/Paris.*

---

## -E-

---

- Earl, D.A., vonHoldt, B.M., 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4, 359–361. doi:10.1007/s12686-011-9548-7
- EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), 2013. Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). *EFSA J.* 11(11):3449, 106 pp. doi:10.2903/j.efsa.2013.3449
- Eitenmiller, R.R., Vakil, J.R., Shahani, K.M., 1970. Production and properties of *Penicillium roqueforti* lipase. *J. Food Sci.* 35, 130–133. doi:10.1111/j.1365-2621.1970.tb12121.x
- Engel, G., Milczewski, K.E. von, Prokopek, D., Teuber, M., 1982. Strain-specific synthesis of mycophenolic acid by *Penicillium roqueforti* in blue-veined cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 1034–1040.
- Engel, G., Teuber, M., 1978. Simple aid for the identification of *Penicillium roqueforti* Thom. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6, 107–111. doi:10.1007/BF00500862
- Epinette, W.W., Parker, C.M., Jones, E.L., Greist, M.C., 1987. Mycophenolic acid for psoriasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 17, 962–971. doi:10.1016/S0190-9622(87)70285-0
- Erdogan, A., Gurses, M., Sert, S., 2003. Isolation of moulds capable of producing mycotoxins from blue mouldy Tulum cheeses produced in Turkey. *Int. J. Food Microbiol.* 85, 83–85. doi:10.1016/S0168-1605(02)00485-3
- Erwin, D.C., Ribeiro, O.K., 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. *Am. Phytopathol. Soc.*
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611–2620. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479–491.

---

## -F-

---

- Farahat, S.M., Rabie, A.M., Farag, A.A., 1990. Evaluation of the proteolytic and lipolytic activity of different *Penicillium roqueforti* strains. *Food Chem.* 36, 169–180. doi:10.1016/0308-8146(90)90052-6
- Farnworth, E.R. (Ed), 2003. *Handbook of fermented functional foods.* CRC Press.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G., Bult, C., 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10, 315–319. doi:10.1111/j.1096-0031.1994.tb00181.x
- Fay, J.C., Benavides, J.A., 2005. Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 1, e5. doi:10.1371/journal.pgen.0010005
- Fernández-Bodega, M.A., Mauriz, E., Gómez, A., Martín, J.F., 2009. Proteolytic activity, mycotoxins and andrastin A in *Penicillium roqueforti* strains isolated from Cabrales, Valdeón and Bejes–Tresviso local varieties of blue-veined cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 136, 18–25. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.014

- Finoli, C., Vecchio, A., Galli, A., Dragoni, I., 2001. Roquefortine C occurrence in blue cheese. *J. Food Prot.* 64, 246–251.
- Finol, M.L., Marth, E.H., Lindsay, R.C., 1982. Depletion of sorbate from different media during growth of *Penicillium* species. *J. Food Prot.* 45, 398–494.
- Flórez, A.B., Mayo, B., 2006. Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *Int. J. Food Microbiol.* 110, 165–171. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.016
- Fontaine, K., 2015. Production de métabolites secondaires chez *Penicillium roqueforti* : incidence des facteurs abiotiques et évaluation de l'innocuité. Université de Bretagne Occidentale, Brest.
- Fontaine, K., Hymery, N., Lacroix, M.Z., Puel, S., Puel, O., Rigalma, K., Gaydou, V., Coton, E., Mounier, J., 2015a. Influence of intraspecific variability and abiotic factors on mycotoxin production in *Penicillium roqueforti*. *Int. J. Food Microbiol.* doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.021
- Fontaine, K., Mounier, J., Coton, E., Hymery, N., 2015. Individual and combined effects of roquefortine C and mycophenolic acid on human monocytic and intestinal cells. *World Mycotoxin J.* 1–11. doi:10.3920/WMJ2014.1861
- Fontaine, K., Passeró, E., Vallone, L., Hymery, N., Coton, M., Jany, J.-L., Mounier, J., Coton, E., 2015b. Occurrence of roquefortine C, mycophenolic acid and aflatoxin M1 mycotoxins in blue-veined cheeses. *Food Control* 47, 634–640. doi:10.1016/j.foodcont.2014.07.046
- Fournier, E., Giraud, T., Albertini, C., Brygoo, Y., 2005. Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia* 97, 1251–1267. doi:10.3852/mycologia.97.6.1251
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., 2004. Cheese: an overview, in: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier Academic Press, London, pp. 1–18.
- Freedman, R.B., Radda, G.K., 1968. The reaction of 2, 4, 6-trinitrobenzenesulphonic acid with amino acids, peptides and proteins. *Biochem. J.* 108, 383–391.
- Frisvad, J.C., Filtenborg, O., 1990. Secondary metabolites as consistent criteria in *Penicillium* taxonomy and a synoptic key to *Penicillium* subgenus *Penicillium*, in: Samson, R.A., Pitt, J.I. (Eds.), *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification*, NATO ASI Series. Springer US, pp. 373–384.
- Frisvad, J.C., Filtenborg, O., 1989. Terverticillate *Penicillia*: chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycologia* 81, 837–861. doi:10.2307/3760103
- Frisvad, J.C., Filtenborg, O., 1983. Classification of terverticillate penicillia based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 1301–1310.
- Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* - A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Stud. Mycol.* 49, 1–174.
- Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Larsen, T.O., Samson, R.A., 2004. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Stud. Mycol.* 49, 201–241.

## -G-

- 
- Gallois, A., Langlois, D., 1990. New results in the volatile odorous compounds of French cheeses. *Le Lait* 70, 89–106. doi:10.1051/lait:199028

- García-Estrada, C., Ullán, R.V., Albillos, S.M., Fernández-Bodega, M.Á., Durek, P., von Döhren, H., Martín, J.F., 2011. A single cluster of coregulated genes encodes the biosynthesis of the mycotoxins roquefortine C and meleagrín in *Penicillium chrysogenum*. *Chem. Biol.* 18, 1499–1512. doi:10.1016/j.chembiol.2011.08.012
- Gargas, A., Taylor, J.W., 1992. Polymerase Chain Reaction (PCR) primers for amplifying and sequencing nuclear 18S rDNA from lichenized fungi. *Mycologia* 84, 589. doi:10.2307/3760327
- Geisen, R., Cantor, M.D., Hansen, T.K., Holzappel, W.H., Jakobsen, M., 2001. Characterization of *Penicillium roqueforti* strains used as cheese starter cultures by RAPD typing. *Int. J. Food Microbiol.* 65, 183–191. doi:10.1016/S0168-1605(00)00514-6
- Geiser, D.M., Jiménez-Gasco, M. del M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T.J., Zhang, N., Kuldau, G.A., O'Donnell, K., 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*, in: Mulè, G., Bailey, J.A., Cooke, B.M., Logrieco, A. (Eds.), *Molecular Diversity and PCR-Detection of Toxigenic Fusarium Species and Ochratoxigenic Fungi*. Springer Netherlands, pp. 473–479.
- Gelperin, D., Horton, L., Beckman, J., Hensold, J., Lemmon, S.K., 2001. Bms1p, a novel GTP-binding protein, and the related Tsr1p are required for distinct steps of 40S ribosome biogenesis in yeast. *RNA* 7, 1268–1283.
- Gente, S., Durand-Poussereau, N., Fevre, M., 1997. Controls of the expression of *aspA*, the aspartyl protease gene from *Penicillium roqueforti*. *Mol. Gen. Genet.* 256, 557–565.
- Gente, S., Larpin, S., Cholet, O., Guéguen, M., Vernoux, J.-P., Desmasures, N., 2007. Development of primers for detecting dominant yeasts in smear-ripened cheeses. *J. Dairy Res.* 74, 137–145. doi:10.1017/S0022029906002226
- Germond, J.-E., Lapierre, L., Delley, M., Mollet, B., Felis, G.E., Dellaglio, F., 2003. Evolution of the bacterial species *Lactobacillus delbrueckii*: a partial genomic study with reflections on prokaryotic species concept. *Mol. Biol. Evol.* 20, 93–104. doi:10.1093/molbev/msg012
- Gibbons, J.G., Rinker, D.C., 2015. The genomics of microbial domestication in the fermented food environment. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 35, 1–8. doi:10.1016/j.gde.2015.07.003
- Gibbons, J.G., Salichos, L., Slot, J.C., Rinker, D.C., McGary, K.L., King, J.G., Klich, M.A., Tabb, D.L., McDonald, W.H., Rokas, A., 2012. The evolutionary imprint of domestication on genome variation and function of the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Curr. Biol.* 22, 1403–1409. doi:10.1016/j.cub.2012.05.033
- Gillot, G., Jany, J.-L., Coton, M., Le Floch, G., Debaets, S., Ropars, J., López-Villavicencio, M., Dupont, J., Branca, A., Giraud, T., Coton, E., 2015. Insights into *Penicillium roqueforti* morphological and genetic diversity. *PLoS ONE* 10, e0129849. doi:10.1371/journal.pone.0129849
- Giraud, F., Giraud, T., Aguilera, G., Fournier, E., Samson, R., Cruaud, C., Lacoste, S., Ropars, J., Tellier, A., Dupont, J., 2010. Microsatellite loci to recognize species for the cheese starter and contaminating strains associated with cheese manufacturing. *Int. J. Food Microbiol.* 137, 204–213. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.014
- Giraud, T., Refrégier, G., Le Gac, M., de Vienne, D.M., Hood, M.E., 2008. Speciation in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 45, 791–802. doi:10.1016/j.fgb.2008.02.001
- Gladieux, P., Ropars, J., Badouin, H., Branca, A., Aguilera, G., de Vienne, D.M., Rodríguez de la Vega, R.C., Branco, S., Giraud, T., 2014. Fungal evolutionary genomics provides insight into the mechanisms of adaptive divergence in eukaryotes. *Mol. Ecol.* 23, 753–773. doi:10.1111/mec.12631
- Glass, N.L., Donaldson, G.C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1323–1330.

- Goarin, A., Silar, P., Malagnac, F., 2014. Gene replacement in *Penicillium roqueforti*. *Curr. Genet.* 61, 203–210. doi:10.1007/s00294-014-0456-8
- Gobbetti, M., Burzigotti, R., Smacchi, E., Corsetti, A., De Angelis, M., 1997a. Microbiology and biochemistry of gorgonzola cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 7, 519–529. doi:10.1016/S0958-6946(97)00047-2
- Gobbetti, M., Burzigotti, R., Smacchi, E., Corsetti, A., De Angelis, M., 1997b. Microbiology and biochemistry of gorgonzola cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 7, 519–529. doi:10.1016/S0958-6946(97)00047-2
- Gock, M.A., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Poulos, P.G., 2003. Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. *Int. J. Food Microbiol.* 81, 11–19. doi:10.1016/S0168-1605(02)00166-6
- Gonzales De Llano, D., Ramos, M., Polo, C., Sanz, J., Martinez-Castro, I., 1990. Evolution of the volatile components of an artisanal blue cheese during ripening. *J. Dairy Sci.* 73, 1676–1683. doi:10.3168/jds.S0022-0302(90)78842-X
- González de Llano, D., Ramos, M., Rodriguez, A., Montilla, A., Juarez, M., 1992. Microbiological and physicochemical characteristics of Gamonedo blue cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 2, 121–135. doi:10.1016/0958-6946(92)90005-7
- Goudéranche, H., Camier-Caudron, B., Gassi, J.-Y., Schuck, P., 2002. Procédés de transformation fromagère (partie 3). *Techniques de l'Ingénieur.*
- Goudéranche, H., Camier-Caudron, B., Gassi, J.-Y., Schuck, P., 2001a. Procédés de transformation fromagère (partie 1). *Techniques de l'Ingénieur.*
- Goudéranche, H., Camier-Caudron, B., Gassi, J.-Y., Schuck, P., 2001b. Procédés de transformation fromagère (partie 2). *Techniques de l'Ingénieur.*
- Greer, D.L., 1978. Basidiomycetes as agents of human infections: a review. *Mycopathologia* 65, 133–139. doi:10.1007/BF00447184
- Gripon, J.C., 1999. Mould-ripened cheeses, in: Fox, P.F. (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Springer US, pp. 111–136.
- Grünig, C.R., Brunner, P.C., Duò, A., Sieber, T.N., 2007. Suitability of methods for species recognition in the *Phialocephala fortinii*–*Acephala applanata* species complex using DNA analysis. *Fungal Genet. Biol.* 44, 773–788. doi:10.1016/j.fgb.2006.12.008
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696–704. doi:10.1080/10635150390235520
- Guinee, T.P., Fox, P.F., 2004. Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects, in: Patrick F. Fox, P.L.H.M. Timothy M. Cogan and Timothy P. Guinee (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*. Academic Press, pp. 207–259.

## -H-

- 
- Haeckel, E.H.P.A., 1894. *Systematische phylogenie*. Verlag von Georg Reimer, Berlin.
- Haeckel, E.H.P.A., 1866. *Generelle morphologie der organismen: allgemeine Grundzüge der organischen Formen-Wissenschaft, mechanisch begründet durch die von Charles Darwin reformirte Descendenz-Theorie*. Verlag von Georg Reimer, Berlin.
- Hägglblom, P., 1990. Isolation of roquefortine C from feed grain. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2924–2926.
- Han, B.-Z., Rombouts, F.M., Nout, M.J.R., 2001. A Chinese fermented soybean food. *Int. J. Food Microbiol.* 65, 1–10. doi:10.1016/S0168-1605(00)00523-7

- Hansen, B.G., Genee, H.J., Kaas, C.S., Nielsen, J.B., Regueira, T.B., Mortensen, U.H., Frisvad, J.C., Patil, K.R., 2011. A new class of IMP dehydrogenase with a role in self-resistance of mycophenolic acid producing fungi. *BMC Microbiol.* 11, 202. doi:10.1186/1471-2180-11-202
- Hansen, B.G., Mnich, E., Nielsen, K.F., Nielsen, J.B., Nielsen, M.T., Mortensen, U.H., Larsen, T.O., Patil, K.R., 2012. Involvement of a natural fusion of a cytochrome P450 and a hydrolase in mycophenolic acid biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4908–4913. doi:10.1128/AEM.07955-11
- Hansen, T.K., Jakobsen, M., 2001. Taxonomical and technological characteristics of *Saccharomyces* spp. associated with blue veined cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 69, 59–68. doi:10.1016/S0168-1605(01)00573-6
- Hawksworth, D.L., 2011. A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. *IMA Fungus* 2, 155–162. doi:10.5598/imafungus.2011.02.02.06
- Hawksworth, D.L., 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.* 105, 1422–1432. doi:10.1017/S0953756201004725
- Hawksworth, D.L., 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Res.* 95, 641–655. doi:10.1016/S0953-7562(09)80810-1
- Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C., Pegler, D.N., 1995. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*, 8th ed. CABI, Oxon.
- Hawksworth, D.L., Rossman, A.Y., 1997. Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology* 87, 888–891. doi:10.1094/PHYTO.1997.87.9.888
- Hermet, A., Méheust, D., Mounier, J., Barbier, G., Jany, J.-L., 2012. Molecular systematics in the genus *Mucor* with special regards to species encountered in cheese. *Fungal Biol.* 116, 692–705. doi:10.1016/j.funbio.2012.04.002
- Hesseltine, C.W., 1983. Microbiology of oriental fermented food. *Annu. Rev. Microbiol.* 37, 575–601. doi:10.1146/annurev.mi.37.100183.003043
- Hey, J., 2006. On the failure of modern species concepts. *Trends Ecol. Evol.* 21, 447–450. doi:10.1016/j.tree.2006.05.011
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lücking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P.B., McLaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dai, Y.-C., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Ironside, J.E., Kõljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K.-H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miądlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.-M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schüßler, A., Sugiyama, J., Thorn, R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M.M., Winka, K., Yao, Y.-J., Zhang, N., 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 111, 509–547. doi:10.1016/j.mycres.2007.03.004
- Hibbett, D.S., Fukumasa-Nakai, Y., Tsuneda, A., Donoghue, M.J., 1995. Phylogenetic diversity in shiitake inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 87, 618. doi:10.2307/3760806
- Hidalgo, P.I., Ullán, R.V., Albillos, S.M., Montero, O., Fernández-Bodega, M.Á., García-Estrada, C., Fernández-Aguado, M., Martín, J.-F., 2014. Molecular characterization of the PR-toxin gene cluster in *Penicillium roqueforti* and *Penicillium chrysogenum*: cross talk of secondary metabolite pathways. *Fungal Genet. Biol.* 62, 11–24. doi:10.1016/j.fgb.2013.10.009

- Hong, S.-B., Go, S.-J., Shin, H.-D., Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2005. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia* 97, 1316–1329. doi:10.3852/mycologia.97.6.1316
- Houbraken, J., Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2011. Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA Fungus Glob. Mycol. J.* 2, 87–95. doi:10.5598/imafungus.2011.02.01.12
- Houbraken, J., Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2010. Sex in *Penicillium* series *Roqueforti*. *IMA Fungus* 1, 171–180.
- Houbraken, J., Samson, R.A., 2011. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Stud. Mycol.* 70, 1–51. doi:10.3114/sim.2011.70.01
- Houbraken, J., Spierenburg, H., Frisvad, J.C., 2012. *Rasamsonia*, a new genus comprising thermotolerant and thermophilic *Talaromyces* and *Geosmithia* species. *Antonie Van Leeuwenhoek* 101, 403–421. doi:10.1007/s10482-011-9647-1
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754–755. doi:10.1093/bioinformatics/17.8.754
- Huson, D.H., Richter, D.C., Rausch, C., DeZulian, T., Franz, M., Rupp, R., 2007. Dendroscope: an interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics* 8, 460. doi:10.1186/1471-2105-8-460
- Huson, D.H., Scornavacca, C., 2012. Dendroscope 3: an interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks. *Syst. Biol.* 0, 1–7. doi:10.1093/sysbio/sys062
- Hymery, N., Vasseur, V., Coton, M., Mounier, J., Jany, J.-L., Barbier, G., Coton, E., 2014. Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 13, 437–456. doi:10.1111/1541-4337.12069

---

## -I-

---

ICH Harmonized Tripartite Guideline, 2005. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1).

---

## -J-

- 
- Jacques, N., Mallet, S., Casaregola, S., 2009. Delimitation of the species of the *Debaryomyces hansenii* complex by intron sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1242–1251. doi:10.1099/ijms.0.004325-0
- Jahn, T.L., Jahn, F.F., 1949. How to know the protozoa, Brown Co. ed. Dubuque, Iowa.
- Jakobsson, M., Rosenberg, N.A., 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23, 1801–1806. doi:10.1093/bioinformatics/btm233
- James, T.Y., Letcher, P.M., Longcore, J.E., Mozley-Standridge, S.E., Porter, D., Powell, M.J., Griffith, G.W., Vilgalys, R., 2006. A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia* 98, 860–871. doi:10.3852/mycologia.98.6.860
- Jard, G., Liboz, T., Mathieu, F., Guyonvarc'h, A., Lebrhi, A., 2011. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Addit. Contam. Part A* 28, 1590–1609. doi:10.1080/19440049.2011.595377

- Jeleń, H.H., 2002. Volatile sesquiterpene hydrocarbons characteristic for *Penicillium roqueforti* strains producing PR toxin. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6569–6574.
- Johnson, J.A., Harrington, T.C., Engelbrecht, C.J.B., 2005. Phylogeny and taxonomy of the North American clade of the *Ceratocystis fimbriata* complex. *Mycologia* 97, 1067–1092. doi:10.3852/mycologia.97.5.1067
- Jurjevic, Z., Peterson, S.W., Horn, B.W., 2012. *Aspergillus* section *Versicolores*: nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny. *IMA Fungus* 3, 59–79. doi:10.5598/imafungus.2012.03.01.07

## -K-

- 
- Kaplan, N.L., Hudson, R.R., Langley, C.H., 1989. The “hitchhiking effect” revisited. *Genetics* 123, 887–899.
- Karlshøj, K., Larsen, T.O., 2005. Differentiation of species from the *Penicillium roqueforti* group by volatile metabolite profiling. *J. Agric. Food Chem.* 53, 708–715. doi:10.1021/jf0485887
- Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780. doi:10.1093/molbev/mst010
- Kauff, F., Lutzoni, F., 2002. Phylogeny of the Gyalectales and Ostropales (Ascomycota, Fungi): among and within order relationships based on nuclear ribosomal RNA small and large subunits. *Mol. Phylogenet. Evol.* 25, 138–156. doi:10.1016/S1055-7903(02)00214-2
- Kavanagh, F., 1947. Activities of twenty-two antibacterial substances against nine species of bacteria. *J. Bacteriol.* 54, 761–766.
- Kearsey, S.E., Labib, K., 1998. MCM proteins: evolution, properties, and role in DNA replication. *Biochim. Biophys. Acta* 1398, 113–136.
- Kenrick, P., Crane, P.R., 1997. The origin and early evolution of plants on land. *Nature* 389, 33–39. doi:10.1038/37918
- Kim, S., Willison, K.R., Horwich, A.L., 1994. Cytosolic chaperonin subunits have a conserved ATPase domain but diverged polypeptide-binding domains. *Trends Biochem. Sci.* 19, 543–548. doi:10.1016/0968-0004(94)90058-2
- Kinsella, J.E., Hwang, D.H., 1976. Enzymes of *Penicillium roqueforti* involved in the biosynthesis of cheese flavor. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 8, 191–228.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A., 2008. *Dictionary of the Fungi*, 10th ed. CAB International, Wallingford.
- Knowles, L.L., 2009. Estimating species trees: methods of phylogenetic analysis when there is incongruence across genes. *Syst. Biol.* 58, 463–467. doi:10.1093/sysbio/syp061
- Kofler, R., Schlötterer, C., Lelley, T., 2007. SciRoKo: a new tool for whole genome microsatellite search and investigation. *Bioinformatics* 23, 1683–1685. doi:10.1093/bioinformatics/btm157
- Kokkonen, M., Jestoi, M., Rizzo, A., 2005. Determination of selected mycotoxins in mould cheeses with liquid chromatography coupled to tandem with mass spectrometry. *Food Addit. Contam.* 22, 449–456. doi:10.1080/02652030500089861
- Koressaar, T., Remm, M., 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23, 1289–1291. doi:10.1093/bioinformatics/btm091
- Korhonen, K., 1978. Infertility and clonal size in the *Armillariella mellea* complex. *Karstenia* 18, 31–42.
- Kosalková, K., Domínguez-Santos, R., Coton, M., Coton, E., García-Estrada, C., Liras, P., Martín, J.F., 2015. A natural short pathway synthesizes roquefortine C but not meleagrín

- in three different *Penicillium roqueforti* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1–12. doi:10.1007/s00253-015-6676-0
- Koufopanou, V., Burt, A., Szaro, T., Taylor, J.W., 2001. Gene genealogies, cryptic species, and molecular evolution in the human pathogen *Coccidioides immitis* and relatives (Ascomycota, Onygenales). *Mol. Biol. Evol.* 18, 1246–1258.
- Kozlovskii, A.G., Reshetilova, T.A., Medvedeva, T.N., Arinbasarov, M.U., Sakharovskii, V.G., 1979. Intracellular and extracellular alkaloids of *Penicillium roqueforti*. *Biokhimiia* 44, 1691–1700.
- Kwon-Chung, K.J., 2012. Taxonomy of fungi causing mucormycosis and entomophthoromycosis (Zygomycosis) and nomenclature of the disease: molecular mycologic perspectives. *Clin. Infect. Dis.* 54, S8–S15. doi:10.1093/cid/cir864
- Kwon-Chung, K.J., Sugui, J.A., 2009. Sexual reproduction in *Aspergillus* species of medical or economical importance: why so fastidious? *Trends Microbiol.* 17, 481–487. doi:10.1016/j.tim.2009.08.004

## -L-

- 
- Lafont, P., Debeaupuis, J.P., Gaillardin, M., Payen, J., 1979a. Production of mycophenolic acid by *Penicillium roqueforti* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 365–368.
- Lafont, P., Siriwardana, M.G., Combemale, I., Lafont, J., 1979b. Mycophenolic acid in marketed cheeses. *Food Cosmet. Toxicol.* 17, 147–149. doi:10.1016/0015-6264(79)90214-1
- Lamberet, G., Menassa, A., 1983. Purification and properties of an acid lipase from *Penicillium roqueforti*. *J. Dairy Res.* 50, 459–468. doi:10.1017/S0022029900032696
- Lamberet, G., Menassa, A., 1983. Détermination et niveau des activités lipolytiques dans les fromages à pâte persillée. *Le Lait* 63, 333–344. doi:10.1051/lait:1983629-63020
- Larsen, M.D., Jensen, K., 1999. The effects of environmental conditions on the lipolytic activity of strains of *Penicillium roqueforti*. *Int. J. Food Microbiol.* 46, 159–166. doi:10.1016/S0168-1605(98)00191-3
- Larsen, M.D., Kristiansen, K.R., Hansen, T.K., 1998. Characterization of the proteolytic activity of starter cultures of *Penicillium roqueforti* for production of blue veined cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 43, 215–221. doi:10.1016/S0168-1605(98)00114-7
- Law, B.A., Tamime, A.Y., 2010. *Technology of cheesemaking*, 2nd ed. John Wiley & Sons, Chichester.
- Le Bars, J., Le Bars, P., 1989. Espèces fongiques des ensilages de maïs. Risques mycotoxiques. *Rec Med Vet* 165, 433–439.
- Lee, S.C., Ni, M., Li, W., Shertz, C., Heitman, J., 2010. The evolution of sex: a perspective from the fungal kingdom. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 298–340. doi:10.1128/MMBR.00005-10
- Le Gac, M., Hood, M.E., Fournier, E., Giraud, T., 2007b. Phylogenetic evidence of host-specific cryptic species in the anther smut fungus. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 61, 15–26. doi:10.1111/j.1558-5646.2007.00002.x
- Léger-Silvestre, I., Milkereit, P., Ferreira-Cerca, S., Saveanu, C., Rousselle, J.-C., Choesmel, V., Guinefoleau, C., Gas, N., Gleizes, P.-E., 2004. The ribosomal protein Rps15p is required for nuclear exit of the 40S subunit precursors in yeast. *EMBO J.* 23, 2336–2347. doi:10.1038/sj.emboj.7600252
- Legras, J.-L., Merdinoglu, D., Cornuet, J.-M., Karst, F., 2007. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Mol. Ecol.* 16, 2091–2102. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03266.x



- Leistner, L., 1995. Stable and safe fermented sausages world-wide, in: Campbell-Platt, G., Cook, P.E. (Eds.), *Fermented Meats*. Springer US, pp. 160–175.
- Le Tacon, F., Selosse, M.-A., 1997. Le rôle des mycorhizes dans la colonisation des continents et la diversification des écosystèmes terrestres. *Rev. For. Fr.* 49 (sp), 15–24.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451–1452. doi:10.1093/bioinformatics/btp187
- Liewen, M.B., Marth, E.H., 1984. Inhibition of *Penicillia* and *Aspergilli* by potassium sorbate. *J. Food Prot.* 47, 554–556.
- Liti, G., Carter, D.M., Moses, A.M., Warringer, J., Parts, L., James, S.A., Davey, R.P., Roberts, I.N., Burt, A., Koufopanou, V., Tsai, I.J., Bergman, C.M., Bensasson, D., O’Kelly, M.J.T., van Oudenaarden, A., Barton, D.B.H., Bailes, E., Nguyen Ba, A.N., Jones, M., Quail, M.A., Goodhead, I., Sims, S., Smith, F., Blomberg, A., Durbin, R., Louis, E.J., 2009. Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature* 458, 337–341. doi:10.1038/nature07743
- Liu, Y.J., Whelen, S., Hall, B.D., 1999. Phylogenetic relationships among Ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol. Biol. Evol.* 16, 1799–1808.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Llanos, A., François, J.M., Parrou, J.-L., 2015. Tracking the best reference genes for RT-qPCR data normalization in filamentous fungi. *BMC Genomics* 16, 71. doi:10.1186/s12864-015-1224-y
- López-Díaz, T.M., Román-Blanco, C., García-Arias, M.T., García-Fernández, M.C., García-López, M.L., 1996. Mycotoxins in two spanish cheese varieties. *Int. J. Food Microbiol.* 30, 391–395. doi:10.1016/0168-1605(96)00957-9
- López-Díaz, T. m., Santos, J., Otero, A., García, M. I., Moreno, B., 1996. Some technological properties of *Penicillium roqueforti* strains isolated from a home-made blue cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 23, 5–8. doi:10.1111/j.1472-765X.1996.tb00017.x

## -M-

- 
- Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K.-I., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., Abe, K., Gomi, K., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Takeuchi, M., Denning, D.W., Galagan, J.E., Nierman, W.C., Yu, J., Archer, D.B., Bennett, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Fedorova, N.D., Gotoh, O., Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarashi, R., Iwashita, K., Juvvadi, P.R., Kato, M., Kato, Y., Kin, T., Kokubun, A., Maeda, H., Maeyama, N., Maruyama, J., Nagasaki, H., Nakajima, T., Oda, K., Okada, K., Paulsen, I., Sakamoto, K., Sawano, T., Takahashi, M., Takase, K., Terabayashi, Y., Wortman, J.R., Yamada, O., Yamagata, Y., Anazawa, H., Hata, Y., Koide, Y., Komori, T., Koyama, Y., Minetoki, T., Suharnan, S., Tanaka, A., Isono, K., Kuhara, S., Ogasawara, N., Kikuchi, H., 2005. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* 438, 1157–1161. doi:10.1038/nature04300
- Maddison, W., Maddison, D., 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis.
- Madkor, S., Fox, P.F., Shalabi, S.I., Metwalli, N.H., 1987. Studies on the ripening of stilton cheese: proteolysis. *Food Chem.* 25, 13–29. doi:10.1016/0308-8146(87)90050-1
- Madkor, S., Fox, P.F., Shalabi, S.I., Metwalli, N.H., 1987. Studies on the ripening of stilton cheese: lipolysis. *Food Chem.* 25, 93–109. doi:10.1016/0308-8146(87)90058-6
- Magan, N., Aldred, D., 2007. Why do fungi produce mycotoxins? *Mycol. Ser.* 25, 121.

- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.-H., Díaz-Muñiz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., Mills, D., 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 15611–15616. doi:10.1073/pnas.0607117103
- Manhart, J.R., McCourt, R.M., 1992. Molecular data and species concepts in the algae. *J. Phycol.* 28, 730–737. doi:10.1111/j.0022-3646.1992.00730.x
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 1st ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York.
- Mansfield, M.A., Jones, A.D., Kulda, G.A., 2008. Contamination of fresh and ensiled maize by multiple *Penicillium* mycotoxins. *Phytopathology* 98, 330–336. doi:10.1094/PHYTO-98-3-0330
- Marcos, A., Esteban, M.A., León, F., Fernández-Salguero, J., 1979. Electrophoretic patterns of european cheeses: comparison and quantitation. *J. Dairy Sci.* 62, 892–900. doi:10.3168/jds.S0022-0302(79)83345-7
- Margulis, L., Schwartz, K.V., 1998. *Five kingdoms: an illustrated guide to the phyla of life on earth*, 3rd ed. W H Freeman and Company, New-York.
- Marsh, A.J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R.P., Cotter, P.D., 2014. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiol.* 38, 171–178. doi:10.1016/j.fm.2013.09.003
- Martin, G.W., 1960. The systematic position of the Myxomycetes. *Mycologia* 52, 119. doi:10.2307/3756254
- Martín, J.F., Coton, M., 2015. Blue cheese: microbiota and fungal metabolites, in: Frias, J., Martínez-Villaluenga, C., Peñas, E. (Eds.), *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*. Elsevier, New York (In press).
- Mase, T., Matsumiya, Y., Matsuura, A., 1995. Purification and characterization of *Penicillium roqueforti* IAM 7268 lipase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 329–330. doi:10.1271/bbb.59.329
- Mata, J., Nurse, P., 1998. Discovering the poles in yeast. *Trends Cell Biol.* 8, 163–167. doi:10.1016/S0962-8924(98)01224-0
- Mau, J. en.-L., Beelman, R. ober. B., Ziegler, G. regor. R., 1992. 1-octen-3-ol in the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *J. Food Sci.* 57, 704–706. doi:10.1111/j.1365-2621.1992.tb08077.x
- Mayden, R.L., 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. 381-424.
- Mayr, E., 1940. Speciation phenomena in birds. *Am. Nat.* 74, 249–278. doi:10.1086/280892
- McIntyre, M., Breum, J., Arnau, J., Nielsen, J., 2002. Growth physiology and dimorphism of *Mucor circinelloides* (syn . *racemosus*) during submerged batch cultivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 495–502. doi:10.1007/s00253-001-0916-1
- McNeill, J., Barrie, F.R., Buck, W.R., Demoulin, V., Greuter, W., Hawksworth, D.L., Herendeen, P.S., Knapp, S., Marhold, K., Prado, J., Prud'homme van Reine, W.F., Smith, G.F., Wiersema, J.H., Turland, N.J., 2012. *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code) adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011*. Koeltz Scientific Books, Königstein, Germany.

- McSweeney, P.L.H., 2004. Biochemistry of cheese ripening: introduction and overview, in: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier Academic Press, London, pp. 347–360.
- McSweeney, P.L.H., Ottogalli, G., Fox, P.F., 2004. Diversity of cheese varieties: an overview, in: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier Academic Press, London, pp. 1–22.
- McSweeney, P.L.H., Sousa, M.J., 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: a review. *Le Lait* 80, 293–324. doi:10.1051/lait:2000127
- Megléczy, E., Costedoat, C., Dubut, V., Gilles, A., Malausa, T., Pech, N., Martin, J.-F., 2010. QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 26, 403–404. doi:10.1093/bioinformatics/btp670
- Meirmans, P.G., Van Tienderen, P.H., 2004. GENOTYPE and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Mol. Ecol. Notes* 4, 792–794. doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00770.x
- Menassa, A., Lamberet, G., 1982. Contribution à l'étude du système lipolytique de *Penicillium roqueforti*. Caractères comparés de deux activités exocellulaires. *Le Lait* 62, 32–43. doi:10.1051/lait:1982611-6122
- Miller, A.N., Huhndorf, S.M., 2004. Using phylogenetic species recognition to delimit species boundaries within *Lasiochaetia*. *Mycologia* 96, 1106–1127.
- Moio, L., Piombino, P., Addeo, F., 2000. Odour-impact compounds of Gorgonzola cheese. *J. Dairy Res.* 67, 273–285. doi:10.1017/S0022029900004106
- Monnet, C., Loux, V., Gibrat, J.-F., Spinnler, E., Barbe, V., Vacherie, B., Gavory, F., Gourbeyre, E., Siguier, P., Chandler, M., Elleuch, R., Irlinger, F., Vallaëys, T., 2010. The *Arthrobacter arilaitensis* Re117 genome sequence reveals its genetic adaptation to the surface of cheese. *PLoS ONE* 5, e15489. doi:10.1371/journal.pone.0015489
- Moreau, C., 1980. Le *Penicillium roqueforti*, morphologie, physiologie, intérêt en industrie fromagère, mycotoxines. *Le Lait* 60, 254–271. doi:10.1051/lait:1980595-59615
- Moreau, S., Lablache-Combier, A., Biguet, J., 1980. Production of eremofortins A, B, and C relative to formation of PR toxin by *Penicillium roqueforti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 770–776.
- Munsell Color Company, 2009. *Munsell Soil Color Charts 2009 Revised Edition*. X-Rite America, Grand Rapids, Michigan.
- Muth, W.L., Nash, C.H., 1975. Biosynthesis of mycophenolic acid: purification and characterization of S-Adenosyl-l-methionine: demethylmycophenolic acid O-methyltransferase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 8, 321–327. doi:10.1128/AAC.8.3.321

## -N-

- 
- Nguyen Van Long, N., Dantigny, P., 2016. Fungal contamination in packaged food, in: Barros-Velazquez, J. (Ed.), *Antimicrobial Food Packaging*. Elsevier, pp. 45–64.
- Nicoletti, R., De Stefano, M., De Stefano, S., Trincone, A., Marziano, F., 2004. Antagonism against *Rhizoctonia solani* and fungitoxic metabolite production by some *Penicillium* isolates. *Mycopathologia* 158, 465–474. doi:10.1007/s11046-004-3712-5
- Nielsen, K.F., Dalsgaard, P.W., Smedsgaard, J., Larsen, T.O., 2005. Andrastins A–D, *Penicillium roqueforti* metabolites consistently produced in blue-mold-ripened cheese. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2908–2913. doi:10.1021/jf047983u

- Nielsen, K.F., Sumarah, M.W., Frisvad, J.C., Miller, J.D., 2006. Production of metabolites from the *Penicillium roqueforti* complex. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3756–3763.
- Norvell, L.L., 2011. Fungal nomenclature. 1. Melbourne approves a new code. *Mycotaxon* 116, 481–490. doi:10.5248/116.481
- Novo, M., Bigey, F., Beyne, E., Galeote, V., Gavory, F., Mallet, S., Cambon, B., Legras, J.-L., Wincker, P., Casaregola, S., Dequin, S., 2009. Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 16333–16338. doi:10.1073/pnas.0904673106
- Nylander, J.A.A., Wilgenbusch, J.C., Warren, D.L., Swofford, D.L., 2008. AWTY (are we there yet?): a system for graphical exploration of MCMC convergence in Bayesian phylogenetics. *Bioinformatics* 24, 581–583. doi:10.1093/bioinformatics/btm388

---

**-O-**

- O'Brien, M., Egan, D., O'kiely, P., Forristal, P.D., Doohan, F.M., Fuller, H.T., 2008. Morphological and molecular characterisation of *Penicillium roqueforti* and *P. paneum* isolated from baled grass silage. *Mycol. Res.* 112, 921–932. doi:10.1016/j.mycres.2008.01.023
- O'Brien, M., Nielsen, K.F., O'Kiely, P., Forristal, P.D., Fuller, H.T., Frisvad, J.C., 2006. Mycotoxins and other secondary metabolites produced in vitro by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *J. Agric. Food Chem.* 54, 9268–9276. doi:10.1021/jf0621018
- O'Donnell, K., Ward, T.J., Geiser, D.M., Corby Kistler, H., Aoki, T., 2004. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genet. Biol.* 41, 600–623. doi:10.1016/j.fgb.2004.03.003
- Ohmomo, S., Kitamoto, H.K., Nakajima, T., 1994. Detection of roquefortines in *Penicillium roqueforti* isolated from moulded maize silage. *J. Sci. Food Agric.* 64, 211–215. doi:10.1002/jsfa.2740640210
- Omura, S., Inokoshi, J., Uchida, R., Shiomi, K., Masuma, R., Kawakubo, T., Tanaka, H., Iwai, Y., Kosemura, S., Yamamura, S., 1996. Andrastins A-C, new protein farnesyltransferase inhibitors produced by *Penicillium* sp. FO-3929. I. Producing strain, fermentation, isolation, and biological activities. *J. Antibiot. (Tokyo)* 49, 414–417. doi:10.7164/antibiotics.49.414
- O'Sullivan, O., O'Callaghan, J., Sangrador-Vegas, A., McAuliffe, O., Slattery, L., Kaleta, P., Callanan, M., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P., Beresford, T., 2009. Comparative genomics of lactic acid bacteria reveals a niche-specific gene set. *BMC Microbiol.* 9, 50. doi:10.1186/1471-2180-9-50
- Overy, D.P., Nielsen, K.F., Smedsgaard, J., 2005. Roquefortine/oxaline biosynthesis pathway metabolites in *Penicillium* ser. *Corymbifera*: in planta production and implications for competitive fitness. *J. Chem. Ecol.* 31, 2373–2390. doi:10.1007/s10886-005-7107-y

---

**-P-**

- Paulet, J.-J., 1793. *Traité des champignons*. Imprimerie Nationale Exécutive du Louvre, Paris.
- Pavlic, D., Slippers, B., Coutinho, T.A., Wingfield, M.J., 2009. Multiple gene genealogies and phenotypic data reveal cryptic species of the *Botryosphaeriaceae*: a case study on the

- Neofusicoccum parvum*/N. *ribis* complex. *Mol. Phylogenet. Evol.* 51, 259–268. doi:10.1016/j.ympev.2008.12.017
- Perrone, G., Stea, G., Epifani, F., Varga, J., Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2011. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. *Fungal Biol.* 115, 1138–1150. doi:10.1016/j.funbio.2011.07.008
- Peterson, S.W., 2008. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia* 100, 205–226. doi:10.3852/mycologia.100.2.205
- Peterson, S.W., 2004. Multilocus DNA sequence analysis shows that *Penicillium biourgeianum* is a distinct species closely related to *P. brevicompactum* and *P. olsonii*. *Mycol. Res.* 108, 434–440. doi:10.1017/S0953756204009761
- Peterson, S.W., Orchard, S.S., Menon, S., 2011. *Penicillium menonorum*, a new species related to *P. pimateouiense*. *IMA Fungus* 2, 121–125. doi:10.5598/imafungus.2011.02.02.02
- Pitt, J.I., 1988. A laboratory guide to common *Penicillium* species, 2nd ed. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing, CSIRO Food Research Laboratory, P.O. Box 52, North Ryde, N.S.W. 2113, Australia.
- Pitt, J.I., 1979. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London.
- Pitt, J.I., Cruickshank, R.H., Leistner, L., 1986. *Penicillium commune*, *P. camembertii*, the origin of white cheese moulds, and the production of cyclopiazonic acid. *Food Microbiol.* 3, 363–371. doi:10.1016/0740-0020(86)90022-5
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2009. *Fungi and Food Spoilage*, 3rd ed. Springer, London.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 1997. *Fungi and Food Spoilage*, 2nd ed. Blackie Academic & Professional, London.
- Pogačić, T., Maillard, M.-B., Leclerc, A., Hervé, C., Chuat, V., Yee, A.L., Valence, F., Thierry, A., 2015. A methodological approach to screen diverse cheese-related bacteria for their ability to produce aroma compounds. *Food Microbiol.* 46, 145–153. doi:10.1016/j.fm.2014.07.018
- Prieto, B., Franco, I., Fresno, J.M., Bernardo, A., Carballo, J., 2000. Picón Bejes-Tresviso blue cheese: an overall biochemical survey throughout the ripening process. *Int. Dairy J.* 10, 159–167. doi:10.1016/S0958-6946(00)00032-7
- Pringle, A., Baker, D.M., Platt, J.L., Wares, J.P., Latgé, J.P., Taylor, J.W., 2005. Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Evolution* 59, 1886–1899. doi:10.1111/j.0014-3820.2005.tb01059.x
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.
- Proctor, R.H., Hohn, T.M., 1993. Aristolochene synthase. Isolation, characterization, and bacterial expression of a sesquiterpenoid biosynthetic gene (*Ari1*) from *Penicillium roqueforti*. *J. Biol. Chem.* 268, 4543–4548.

---

## -Q-

- Queiroz, K.D., 2007. Species concepts and species delimitation. *Syst. Biol.* 56, 879–886. doi:10.1080/10635150701701083

---

## -R-

- Raper, K.B., Thom, C., 1949. *A manual of the Penicillia*. Williams and Wilkins Co., Baltimore.

- Rasmussen, R.R., Rasmussen, P.H., Larsen, T.O., Bladt, T.T., Binderup, M.L., 2011. In vitro cytotoxicity of fungi spoiling maize silage. *Food Chem. Toxicol.* 49, 31–44. doi:10.1016/j.fct.2010.09.007
- Rasmussen, R.R., Storm, I.M.L.D., Rasmussen, P.H., Smedsgaard, J., Nielsen, K.F., 2010. Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 765–776. doi:10.1007/s00216-010-3545-7
- Rattray, F.P., Eppert, I., 2011. Cheese: secondary cultures, in: Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Second Edition. Academic Press, San Diego, pp. 567–573.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86, 248–249.
- R Core Team, 2014. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Regueira, T.B., Kildegaard, K.R., Hansen, B.G., Mortensen, U.H., Hertweck, C., Nielsen, J., 2011. Molecular basis for mycophenolic acid biosynthesis in *Penicillium brevicompactum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3035–3043. doi:10.1128/AEM.03015-10
- Rehner, S.A., Samuels, G.J., 1994. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycol. Res.* 98, 625–634. doi:10.1016/S0953-7562(09)80409-7
- Reshetilova, T.A., Vinokurova, N.G., Khmelenina, V.N., Kozlovskii, A.G., 1995. The role of roquefortine in the synthesis of alkaloids meleagrine, glandicolines A and B, and oxaline in fungi *Penicillium glandicola* and *P. atramentosum*. *Microbiology* 64, 27–29.
- Reynolds, D.R., 1993. The fungal holomorph: an overview, in: Reynolds, D.R., Taylor, J.W. (Eds.), *The Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*. CABI, Wallingford, pp. 15–25.
- Richards, T.A., Jones, M.D.M., Leonard, G., Bass, D., 2012. Marine fungi: their ecology and molecular diversity. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 4, 495–522. doi:10.1146/annurev-marine-120710-100802
- Ries, M.I., Ali, H., Lankhorst, P.P., Hankemeier, T., Bovenberg, R.A.L., Driessen, A.J.M., Vreeken, R.J., 2013a. Novel key metabolites reveal further branching of the roquefortine/meleagrins biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* 288, 37289–37295. doi:10.1074/jbc.M113.512665
- Riley, R.T., 1998. Mechanistic interactions of mycotoxins: theoretical consideration, in: Sinha, K.K., Bhatnagar, D. (Eds.), *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. Marcel Dekker, Inc., New-York, pp. 227–254.
- Rintoul, T.L., Eggertson, Q.A., Lévesque, C.A., 2012. Multigene phylogenetic analyses to delimit new species in fungal plant pathogens, in: Bolton, M.D., Thomma, B.P.H.J. (Eds.), *Plant Fungal Pathogens, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, pp. 549–569.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574. doi:10.1093/bioinformatics/btg180
- Ropars, J., Cruaud, C., Lacoste, S., Dupont, J., 2012a. A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. *Int. J. Food Microbiol.* 155, 199–210. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.005
- Ropars, J., Dupont, J., Fontanillas, E., Rodríguez de la Vega, R.C., Malagnac, F., Coton, M., Giraud, T., López-Villavicencio, M., 2012b. Sex in cheese: evidence for sexuality in the fungus *Penicillium roqueforti*. *PLoS ONE* 7, e49665. doi:10.1371/journal.pone.0049665

- Ropars, J., López-Villavicencio, M., Dupont, J., Snirc, A., Gillot, G., Coton, M., Jany, J.-L., Coton, E., Giraud, T., 2014. Induction of sexual reproduction and genetic diversity in the cheese fungus *Penicillium roqueforti*. *Evol. Appl.* 7, 433–441. doi:10.1111/eva.12140
- Ropars, J., Rodríguez de la Vega, R.C., López-Villavicencio, M., Gouzy, J., Sallet, E., Dumas, É., Lacoste, S., Debuchy, R., Dupont, J., Branca, A., Giraud, T., 2015. Adaptive horizontal gene transfers between multiple cheese-associated fungi. *Curr. Biol.* 25, 2562–2569. doi:10.1016/j.cub.2015.08.025
- Rosenberg, N.A., 2004. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Mol. Ecol. Notes* 4, 137–138. doi:10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x
- Rousset, F., 2008. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.* 8, 103–106. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x
- Ruse, M., 1969. Definitions of species in biology. *Br. J. Philos. Sci.* 20, 97–119. doi:10.1093/bjps/20.2.97

---

-S-

---

- Sabeti, P.C., Schaffner, S.F., Fry, B., Lohmueller, J., Varilly, P., Shamovsky, O., Palma, A., Mikkelsen, T.S., Altshuler, D., Lander, E.S., 2006. Positive natural selection in the human lineage. *Science* 312, 1614–1620. doi:10.1126/science.1124309
- Salame, T.M., Ziv, C., Hadar, Y., Yarden, O., 2010. RNAi as a potential tool for biotechnological applications in fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 501–512. doi:10.1007/s00253-010-2928-1
- Salque, M., Bogucki, P.I., Pyzel, J., Sobkowiak-Tabaka, I., Grygiel, R., Szmyt, M., Evershed, R.P., 2013. Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium BC in northern Europe. *Nature* 493, 522–525. doi:10.1038/nature11698
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York.
- Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C., Andersen, B., 2010. *Food and Indoor Fungi*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht.
- 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  $\beta$ -tubulin sequences. *Stud. Mycol.* 49, 175–200.
- Sandine, W.E., Elliker, P.R., 1970. Microbially induced flavors and fermented foods. Flavor in fermented dairy products. *J. Agric. Food Chem.* 18, 557–562. doi:10.1021/jf60170a023
- SAS Institute, 2007. JMP. Version 7. SAS Institute Inc. Cary, North Carolina.
- Savara, D., Craig Heller, H., Orians, G.H., Purves, W.L., Hillis, D.M., 2007. *Life: The Science of Biology* 8th edition. Sinauer Associates, W. H. Freeman and Company.
- Schmitt, E.K., Bunse, A., Janus, D., Hoff, B., Friedlin, E., Kürsteiner, H., Kück, U., 2004. Winged helix transcription factor CPC1 is involved in regulation of  $\beta$ -lactam biosynthesis in the fungus *Acremonium chrysogenum*. *Eukaryot. Cell* 3, 121–134. doi:10.1128/EC.3.1.121-134.2004
- Schmitt, I., Crespo, A., Divakar, P.K., Fankhauser, J.D., Herman-Sackett, E., Kalb, K., Nelsen, M.P., Nelson, N.A., Rivas-Plata, E., Shimp, A.D., Widhalm, T., Lumbsch, H.T., 2009. New primers for promising single-copy genes in fungal phylogenetics and systematics. *Persoonia* 23, 35–40. doi:10.3767/003158509X470602
- Schneweis, I., Meyer, K., Hormansdorfer, S., Bauer, J., 2000. Mycophenolic acid in silage. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3639–3641. doi:10.1128/AEM.66.8.3639-3641.2000

- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P.W., Miller, A.N., Wingfield, M.J., Aime, M.C., An, K.-D., Bai, F.-Y., Barreto, R.W., Begerow, D., Bergeron, M.-J., Blackwell, M., Boekhout, T., Bogale, M., Boonyuen, N., Burgaz, A.R., Buyck, B., Cai, L., Cai, Q., Cardinali, G., Chaverri, P., Coppins, B.J., Crespo, A., Cubas, P., Cummings, C., Damm, U., Beer, Z.W. de, Hoog, G.S. de, Del-Prado, R., Dentinger, B., Diéguez-Urbeondo, J., Divakar, P.K., Douglas, B., Dueñas, M., Duong, T.A., Eberhardt, U., Edwards, J.E., Elshahed, M.S., Fliegerova, K., Furtado, M., García, M.A., Ge, Z.-W., Griffith, G.W., Griffiths, K., Groenewald, J.Z., Groenewald, M., Grube, M., Gryzenhout, M., Guo, L.-D., Hagen, F., Hambleton, S., Hamelin, R.C., Hansen, K., Harrold, P., Heller, G., Herrera, C., Hirayama, K., Hirooka, Y., Ho, H.-M., Hoffmann, K., Hofstetter, V., Högnabba, F., Hollingsworth, P.M., Hong, S.-B., Hosaka, K., Houbraken, J., Hughes, K., Huhtinen, S., Hyde, K.D., James, T., Johnson, E.M., Johnson, J.E., Johnston, P.R., Jones, E.B.G., Kelly, L.J., Kirk, P.M., Knapp, D.G., Kõljalg, U., Kovács, G.M., Kurtzman, C.P., Landvik, S., Leavitt, S.D., Ligenstoffer, A.S., Liimatainen, K., Lombard, L., Luangsa-ard, J.J., Lumbsch, H.T., Maganti, H., Maharachchikumbura, S.S.N., Martin, M.P., May, T.W., McTaggart, A.R., Methven, A.S., Meyer, W., Moncalvo, J.-M., Mongkolsamrit, S., Nagy, L.G., Nilsson, R.H., Niskanen, T., Nyilasi, I., Okada, G., Okane, I., Olariaga, I., Otte, J., Papp, T., Park, D., Petkovits, T., Pino-Bodas, R., Quaedvlieg, W., Raja, H.A., Redecker, D., Rintoul, T.L., Ruibal, C., Sarmiento-Ramírez, J.M., Schmitt, I., Schüßler, A., Shearer, C., Sotome, K., Stefani, F.O.P., Stenroos, S., Stielow, B., Stockinger, H., Suetrong, S., Suh, S.-O., Sung, G.-H., Suzuki, M., Tanaka, K., Tedersoo, L., Telleria, M.T., Tretter, E., Untereiner, W.A., Urbina, H., Vágvölgyi, C., Vialle, A., Vu, T.D., Walther, G., Wang, Q.-M., Wang, Y., Weir, B.S., Weiß, M., White, M.M., Xu, J., Yahr, R., Yang, Z.L., Yurkov, A., Zamora, J.-C., Zhang, N., Zhuang, W.-Y., Schindel, D., 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 6241–6246. doi:10.1073/pnas.1117018109
- Schoch, C.L., Sung, G.-H., López-Giráldez, F., Townsend, J.P., Miadlikowska, J., Hofstetter, V., Robbertse, B., Matheny, P.B., Kauff, F., Wang, Z., Gueidan, C., Andrie, R.M., Trippe, K., Ciufetti, L.M., Wynns, A., Fraker, E., Hodkinson, B.P., Bonito, G., Groenewald, J.Z., Arzanlou, M., Hoog, G.S. de, Crous, P.W., Hewitt, D., Pfister, D.H., Peterson, K., Gryzenhout, M., Wingfield, M.J., Aptroot, A., Suh, S.-O., Blackwell, M., Hillis, D.M., Griffith, G.W., Castlebury, L.A., Rossman, A.Y., Lumbsch, H.T., Lücking, R., Büdel, B., Rauhut, A., Diederich, P., Ertz, D., Geiser, D.M., Hosaka, K., Inderbitzin, P., Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., Mostert, L., O'Donnell, K., Sipman, H., Rogers, J.D., Shoemaker, R.A., Sugiyama, J., Summerbell, R.C., Untereiner, W., Johnston, P.R., Stenroos, S., Zuccaro, A., Dyer, P.S., Crittenden, P.D., Cole, M.S., Hansen, K., Trappe, J.M., Yahr, R., Lutzoni, F., Spatafora, J.W., 2009. The ascomycota tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Syst. Biol.* 58, 224–239. doi:10.1093/sysbio/syp020
- Scott, P.M., Kanhere, S.R., 1979. Instability of PR toxin in blue cheese. *J. - Assoc. Off. Anal. Chem.* 62, 141–147.
- Scott, P.M., Kennedy, B.P.C., 1976. Analysis of blue cheese for roquefortine and other alkaloids from *Penicillium roqueforti*. *J. Agric. Food Chem.* 24, 865–868. doi:10.1021/jf60206a028
- Scudamore, K.A., Livesey, C.T., 1998. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *J. Sci. Food Agric.* 77, 1–17.



- Selitrennikoff, C.P., 2001. Antifungal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2883–2894. doi:10.1128/AEM.67.7.2883-2894.2001
- Selosse, M.-A., 2012. Symbiose et mutualisme versus évolution : de la guerre à la paix ? *Atala* 35–49.
- Shibasaki, K., Hesseltine, C.W., 1962. Miso fermentation. *Econ. Bot.* 16, 180–195. doi:10.1007/BF02860037
- Sicard, D., Legras, J.-L., 2011. Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *C. R. Biol.* 334, 229–236. doi:10.1016/j.crv.2010.12.016
- Siemens, K., Zawistowski, J., 1993. Occurrence of PR Imine, a metabolite of *Penicillium roqueforti*, in blue cheese. *J. Food Prot.* 56, 317–325.
- Smith, J.M., Haigh, J., 1974. The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genet. Res.* 23, 23–35. doi:10.1017/S0016672300014634
- Spinnler, H.E., 2009. Production d'arômes par voie biotechnologique. *Tech. L'Ingénieur.*
- Starec, M., Fiserová, A., Rosina, J., Malek, J., Kršiak, M., 2001. Effect of agroclavine on NK activity in vivo under normal and stress conditions in rats. *Physiol. Res.* 50, 513–519.
- Starkey, D.E., Ward, T.J., Aoki, T., Gale, L.R., Kistler, H.C., Geiser, D.M., Suga, H., Tóth, B., Varga, J., O'Donnell, K., 2007. Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal Genet. Biol.* 44, 1191–1204. doi:10.1016/j.fgb.2007.03.001
- Stepaniak, L., Kornacki, K., Grabska, J., Rymaszewski, J., Cichosz, G., 1980. Lipolytic and proteolytic activity of *Penicillium roqueforti*, *Penicillium candidum* and *Penicillium camemberti* strains. *Acta Aliment. Pol.* 6, 155–165.
- Still, P.E., Smalley, E.B., Strong, F.M., Wei, R.-D., 1972. Mycotoxin from *Penicillium roqueforti* isolated from toxic cattle feed, in: *Federation Proceedings*. p. 733.
- Stoldt, V., Rademacher, F., Kehren, V., Ernst, J.F., Pearce, D.A., Sherman, F., 1996. Review: the Cct eukaryotic chaperonin subunits of *Saccharomyces cerevisiae* and other yeasts. *Yeast* 12, 523–529. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199605)12:6<523::AID-YEA962>3.0.CO;2-C
- Storm, I. m. l. d., Kristensen, N. b., Raun, B. m. l., Smedsgaard, J., Thrane, U., 2010. Dynamics in the microbiology of maize silage during whole-season storage. *J. Appl. Microbiol.* 109, 1017–1026. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04729.x
- Sudbery, P.E., 2011. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 737–748. doi:10.1038/nrmicro2636
- Suhr, K.I., Nielsen, P.V., 2005. Inhibition of fungal growth on wheat and rye bread by modified atmosphere packaging and active packaging using volatile mustard essential oil. *J. Food Sci.* 70, M37–M44. doi:10.1111/j.1365-2621.2005.tb09044.x
- Suhr, K.I., Nielsen, P.V., 2004. Effect of weak acid preservatives on growth of bakery product spoilage fungi at different water activities and pH values. *Int. J. Food Microbiol.* 95, 67–78. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.02.004
- Sumarah, M.W., Miller, J.D., Blackwell, B.A., 2005. Isolation and metabolite production by *Penicillium roqueforti*, *P. paneum* and *P. crustosum* isolated in Canada. *Mycopathologia* 159, 571–577. doi:10.1007/s11046-005-5257-7
- Sweet, M.J., Scriven, L.A., Singleton, I., 2012. Microsatellites for microbiologists. *Adv. Appl. Microbiol.* 81, 169–207. doi:10.1016/B978-0-12-394382-8.00005-8
- Swofford, D.L., 2003. PAUP\*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods)*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

## -T-

---

- Taylor, J.W., Geiser, D.M., Burt, A., Koufopanou, V., 1999a. The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 126–146.
- Taylor, J.W., Hann-Soden, C., Branco, S., Sylvain, I., Ellison, C.E., 2015. Clonal reproduction in fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 8901–8908. doi:10.1073/pnas.1503159112
- Taylor, J.W., Jacobson, D., Fisher, M., 1999b. The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37, 197–246. doi:10.1146/annurev.phyto.37.1.197
- Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S., Fisher, M.C., 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 31, 21–32. doi:10.1006/fgbi.2000.1228
- Thom, C., 1906. Fungi in cheese ripening: Camembert and Roquefort. *US Dep. Agric. Bur. Anim. Ind.* 82, 1–39.
- Torrenegra, R.D., Baquero, J.E., Calderon, J.S., 2005. Antibacterial activity and complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignment of mycophenolic acid isolated from *Penicillium verrucosum*. *Rev. Latinoam. Quimica* 33, 76–81.
- Tressler, R.J., Garvin, L.J., Slate, D.L., 1994. Anti-tumor activity of mycophenolate mofetil against human and mouse tumors in vivo. *Int. J. Cancer* 57, 568–573. doi:10.1002/ijc.2910570421
- Trieu-Cuot, P., Gripon, J.C., 1983. Etude électrophorétique de la protéolyse au cours de l'affinage des fromages à pâte persillée du type bleu d'Auvergne. *Le Lait* 63, 116–128. doi:10.1051/lait:1983625-62610

## -U-

---

- Uchida, R., Shiomi, K., Inokoshi, J., Sunazuka, T., Tanaka, H., Iwai, Y., Takayanagi, H., Omura, S., 1996a. Andrastins A-C, new protein farnesyltransferase inhibitors produced by *Penicillium* sp. FO-3929. II. Structure elucidation and biosynthesis. *J. Antibiot. (Tokyo)* 49, 418–424. doi:10.7164/antibiotics.49.418
- Uchida, R., Shiomi, K., Inokoshi, J., Tanaka, H., Iwai, Y., Omura, S., 1996b. Andrastin D, novel protein farnesyltransferase inhibitor produced by *Penicillium* sp. FO-3929. *J. Antibiot. (Tokyo)* 49, 1278–1280. doi:10.7164/antibiotics.49.1278
- Ullán, R.V., Campoy, S., Casqueiro, J., Fernández, F.J., Martín, J.F., 2007. Deacetylcephalosporin C production in *Penicillium chrysogenum* by expression of the isopenicillin N epimerization, ring expansion, and acetylation genes. *Chem. Biol.* 14, 329–339. doi:10.1016/j.chembiol.2007.01.012
- Ullán, R.V., Godio, R.P., Teijeira, F., Vaca, I., García-Estrada, C., Feltrer, R., Kosalkova, K., Martín, J.F., 2008. RNA-silencing in *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*: validation studies using  $\beta$ -lactam genes expression. *J. Microbiol. Methods* 75, 209–218. doi:10.1016/j.mimet.2008.06.001
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G., 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40, e115–e115. doi:10.1093/nar/gks596
- Usleber, E., Dade, M., Schneider, E., Dietrich, R., Bauer, J., Märtilbauer, E., 2008. Enzyme immunoassay for mycophenolic acid in milk and cheese. *J. Agric. Food Chem.* 56, 6857–6862. doi:10.1021/jf801063w

-V-

---

- 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., Joardar, V., Kiel, J.A.K.W., Kovalchuk, A., Martín, J.F., Nierman, W.C., Nijland, J.G., Pronk, J.T., Roubos, J.A., van der Klei, I.J., van Peij, N.N.M.E., Veenhuis, M., von Döhren, H., Wagner, C., Wortman, J., Bovenberg, R.A.L., 2008. Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nat. Biotechnol.* 26, 1161–1168. doi:10.1038/nbt.1498
- Velisek, J., Cejpek, K., 2011. Pigments of higher fungi: a review. *Czech J. Food Sci.* 29, 87–102.
- Veselý, D., Veselá, D., Adámková, 1981. Occurrence of PR-toxin-producing *Penicillium roqueforti* in corn silage. *Vet. Med. (Praha)* 26, 109–115.
- Vialle, A., Feau, N., Frey, P., Bernier, L., Hamelin, R.C., 2013. Phylogenetic species recognition reveals host-specific lineages among poplar rust fungi. *Mol. Phylogenet. Evol.* 66, 628–644. doi:10.1016/j.ympev.2012.10.021
- Vilgalys, R., Hester, M., 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J. Bacteriol.* 172, 4238–4246.
- Vinokurova, N.G., Boichenko, D.M., Baskunov, B.P., Zelenkova, N.F., Vepritskaya, I.G., Arinbasarov, M.U., Reshetilova, T.A., 2001. Minor alkaloids of the fungus *Penicillium roquefortii* Thom 1906. *Appl. Biochem. Microbiol.* 37, 184–187. doi:10.1023/A:1002836000147
- Vinokurova, N.G., Boichenko, L.V., Arinbasarov, M.U., 2003. Production of alkaloids by fungi of the genus *Penicillium* grown on wheat grain. *Appl. Biochem. Microbiol.* 39, 403–406. doi:10.1023/A:1024576703367
- Visagie, C.M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Hong, S.-B., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Varga, J., Yaguchi, T., Samson, R.A., 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud. Mycol.* 78, 343–371. doi:10.1016/j.simyco.2014.09.001
- Vivier, D., Rivemale, M., Reverbel, J.P., Ratomahenina, R., Galzy, P., 1992. Some observations on the physiology of *Penicillium roqueforti* Thom and *Penicillium cyclopium* Westling. *Le Lait* 72, 277–283. doi:10.1051/lait:1992320
- Volk, T.J., 2013. Fungi, in: Levin, S.A. (Ed.), *Encyclopedia of Biodiversity*. Academic Press, Waltham, pp. 624–640.

-W-

---

- Wallwey, C., Li, S.-M., 2011. Ergot alkaloids: structure diversity, biosynthetic gene clusters and functional proof of biosynthetic genes. *Nat. Prod. Rep.* 28, 496–510. doi:10.1039/C0NP00060D
- Wang, S.Y., Chen, H.C., Liu, J.R., Lin, Y.C., Chen, M.J., 2008. Identification of yeasts and evaluation of their distribution in taiwanese kefir and viili starters. *J. Dairy Sci.* 91, 3798–3805. doi:10.3168/jds.2007-0468
- White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in: Innis, M., Gelfand, D., Shinsky, J., White, T. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New-York, pp. 315–322.

- Whittaker, R., 1969. New concepts of kingdoms of organisms. *Science* 163, 150–160.
- Whittaker, R., 1959. On the broad classification of organisms. *Q. Rev. Biol.* 34, 210–226.
- Wiley, E.O., 1978. The evolutionary species concept reconsidered. *Syst. Biol.* 27, 17–26. doi:10.2307/2412809
- Wilkinson, D.M., 2001. At cross purposes. *Nature* 412, 485–485. doi:10.1038/35087676
- Wisecaver, J.H., Rokas, A., 2015. Fungal metabolic gene clusters - caravans traveling across genomes and environments. *Microb. Physiol. Metab.* 6, 161. doi:10.3389/fmicb.2015.00161
- Woese, C.R., 2000. Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 8392–8396. doi:10.1073/pnas.97.15.8392
- Woese, C.R., Fox, G.E., 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5088–5090. doi:10.1073/pnas.74.11.5088
- Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 4576–4579. doi:10.1073/pnas.87.12.4576
- Woo, A.H., Kollodge, S., Lindsay, R.C., 1984. Quantification of major free fatty acids in several cheese varieties. *J. Dairy Sci.* 67, 874–878. doi:10.3168/jds.S0022-0302(84)81380-6

---

**-Y-**

- 
- Yang, Z.L., 2011. Molecular techniques revolutionize knowledge of basidiomycete evolution. *Fungal Divers.* 50, 47–58. doi:10.1007/s13225-011-0121-1

---

**-Z-**

- 
- Zarmpoutis, I.V., McSweeney, P.L.H., Beechinor, J., Fox, P.F., 1996. Proteolysis in the irish farmhouse blue cheese, Chetwynd. *Ir. J. Agric. Food Res.* 35, 25–36.
- Zarmpoutis, I.V., McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., 1997. Proteolysis in blue-veined cheese: an intervarietal study. *Ir. J. Agric. Food Res.* 36, 219–229.
- Zhang, W., Cao, S., Qiu, L., Qi, F., Li, Z., Yang, Y., Huang, S., Bai, F., Liu, C., Wan, X., Li, S., 2015. Functional characterization of MpaG', the O-methyltransferase involved in the biosynthesis of mycophenolic acid. *ChemBioChem* 16, 565–569. doi:10.1002/cbic.201402600
- Zohary, D., Tchernov, E., Horwitz, L.K., 1998. The role of unconscious selection in the domestication of sheep and goats. *J. Zool.* 245, 129–135.

## Résumé

Plusieurs espèces fongiques dites « technologiques » jouent un rôle primordial, via leurs activités métaboliques, dans le développement des caractéristiques organoleptiques et la typicité des fromages. Cependant, malgré une utilisation et une consommation ancestrale, un manque de connaissances persiste que ce soit aux niveaux génétique ou fonctionnel concernant certaines de ces espèces, notamment *Penicillium roqueforti*. Principalement utilisé dans la production de fromages à pâte persillée, c'est lors de l'affinage que *P. roqueforti* participe au développement des qualités organoleptiques typiques de ces fromages via, entre autres, ses activités lipolytiques et protéolytiques. Cette espèce est également caractérisée par une diversité morphologique importante, largement révélée au cours de ces travaux, et ayant donné lieu à certaines dénominations technologiques distinctes par le passé conduisant à une interrogation sur la possible existence de plusieurs espèces au sein de l'entité *P. roqueforti*. Dans ce contexte, une étude phylogénétique basée sur le principe de concordance généalogique (GC-PSR) a été menée sur une vaste collection mondiale de *P. roqueforti* en utilisant 8 loci. Cette étude a montré l'existence d'une espèce unique. La diversité intraspécifique des isolats de *P. roqueforti* a ensuite été évaluée en utilisant 4 marqueurs microsatellites qui ont permis de révéler l'existence de 28 haplotypes répartis en 3 populations génétiquement différenciées et corrélées à différents types de fromages à pâte persillée. Sur la base de ces résultats, 55 isolats représentatifs ont par la suite été criblés afin d'évaluer la possible existence d'un caractère haplotype-dépendant concernant les activités protéolytiques, lipolytiques et la production de métabolites secondaires volatils et non-volatils. Cette étude a permis de mettre en évidence une diversité fonctionnelle relativement importante avec, entre autres, l'identification de 52 molécules volatiles, les méthyl-cétones étant majoritaires dans le volatilome des cultures de *P. roqueforti*, et des profils de production de mycotoxines parfois contrastés. Cependant, une bonne corrélation a été observée entre les groupes d'isolats issus de fromages AOP ou IGP et les métabolites produits. Suite à l'observation de niveaux de productions contrastées d'acide mycophénolique retrouvées chez *P. roqueforti*, le cluster de gènes impliqué dans sa biosynthèse a été identifié *in silico* chez *P. roqueforti* avant que des expériences d'ARN interférence ne soient réalisées sur le gène *mpaC* codant une polycétide synthase. La fonctionnalité de l'ensemble du cluster a pu être confirmée par différentes approches et des comparaisons de séquences entre différentes souches ayant des productions d'acide mycophénolique contrastées ont permis de mettre en évidence une délétion de 174 pb au niveau du gène *mpaC* limitant cette production à des niveaux non détectables chez certaines souches. Ce dernier résultat a ainsi apporté un premier élément de réponse quant à la nature a priori souche-dépendante de la production de ce métabolite.

**Mots-clés :** *P. roqueforti*, Fromage, Diversité, Populations génétiques, Volatilome, Protéolyse, Mycotoxines, Acide mycophénolique.

## Abstract

Several « technological » fungal species play an important role in the development of organoleptic properties and typicality of cheeses via their metabolic activities. However, despite an ancestral use and consumption of cheeses, there is still a lack of knowledge about both genetic and functional traits of certain mold species, in particular *Penicillium roqueforti*. This species, mainly used in blue-veined cheese production, largely contributes to the specific organoleptic properties in the final product via its intense lipolytic and proteolytic activities during ripening. *P. roqueforti* is characterized by high morphological diversity, largely revealed during this study, and has been associated with different technological names in the past raising the question about several species within *P. roqueforti*. Consequently, a phylogenetic study based on genealogical concordance principle (GC-PSR) was performed using eight loci on a large worldwide *P. roqueforti* collection and confirmed the presence of one single species. Taking into account this result, *P. roqueforti* intraspecific diversity was then assessed using 4 microsatellite markers and 28 haplotypes were identified and distributed in three genetically differentiated populations linked to blue-veined cheese types. Based on these results, 55 representative isolates were further screened to determine potential haplotype-dependent traits related to proteolytic and lipolytic activities and volatile and non-volatile secondary metabolite production. This study highlighted the outstanding functional diversity among strains with, among others, 52 volatile molecules identified, mainly methyl-ketones, and contrasted mycotoxin production profiles. Noteworthy, a clear relationship between PDO/PGI group isolates and produced metabolites was observed. Following the contrasted production of mycophenolic acid among isolates, the mycophenolic acid biosynthetic gene cluster was identified *in silico* in *P. roqueforti* and RNA interference experiments targeting the *mpaC* gene, encoding a polyketide synthase, were performed. The cluster was shown to be fully functional in this species. Moreover, the entire mycophenolic acid cluster was compared between three strains characterized by contrasted mycophenolic acid production and a 174 bp deletion was detected in the *mpaC* gene of non-producing strains. This last result provided first insight into the a priori strain-dependent character for production.

**Key words:** *P. roqueforti*, Cheese, Diversity, Genetic populations, Volatilome, Proteolysis, Mycotoxins, Mycophenolic acid.