



HAL
open science

Développement de la spectrométrie de masse MALDI -TOF pour l'identification des champignons filamenteux d'intérêt alimentaire et étude de leur résistance aux molécules biocides

Laura Quero

► **To cite this version:**

Laura Quero. Développement de la spectrométrie de masse MALDI -TOF pour l'identification des champignons filamenteux d'intérêt alimentaire et étude de leur résistance aux molécules biocides. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2018. Français. NNT : 2018BRES0109 . tel-02303042

HAL Id: tel-02303042

<https://theses.hal.science/tel-02303042>

Submitted on 2 Oct 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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 600
Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation
Spécialité : *Microbiologie*

Par

Laura QUERO

Développement de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification des champignons filamenteux d'intérêt alimentaire et étude de leur résistance aux molécules biocides

Thèse présentée et soutenue à Plouzané, le 21 Décembre 2018

Unité de recherche : Laboratoire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (EA 3882)

Rapporteurs avant soutenance :

Sabine GALINDO
Jean-Denis BAILLY

Professeur, UMR Quali'Sud, Polytech Montpellier
Professeur, UMR INRA Toxalim, ENV de Toulouse

Composition du Jury :

Président : Emmanuel COTON
Examineurs : Sabine GALINDO
Anne-Gaëlle RANC

Dir. de thèse : Jérôme MOUNIER
Encadrants : Victoria GIRARD
Patrice NODET

Professeur, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, UBO
Professeur, UMR Quali'Sud, Polytech Montpellier
Docteur, Institut des Agents Infectieux, Centre National de Référence des Légionelles, Centre National de Référence des Staphylocoques, CHU de Lyon
Professeur, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, UBO
Docteur, bioMérieux, La Balme les Grottes
Docteur, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, UBO

Cette thèse CIFRE a été financée par bioMérieux et l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT), en collaboration avec le Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (LUBEM)

Convention #2015/0821



Remerciements

Je tiens à adresser mes premiers remerciements aux membres du jury pour avoir accepté de participer à l'évaluation de mon travail.

Mes remerciements vont également aux organismes financeurs qui ont rendu ce projet possible : la société bioMérieux ainsi que l'ANRT.

Je remercie le professeur Emmanuel Coton, directeur du LUBEM pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein du laboratoire.

Je remercie sincèrement mon directeur de thèse, le professeur Jérôme Mounier, pour m'avoir fait confiance, tout d'abord dans le cadre d'un stage mais surtout pour la réalisation de ce projet. Merci pour tes conseils et ton optimisme.

Mes plus vifs remerciements à mon encadrante au sein de l'entreprise, le docteur Victoria Girard, pour ta disponibilité et pour la confiance que tu m'as accordée afin de mener ce projet à distance, j'espère en avoir été digne.

Je remercie chaleureusement mes deux encadrants de thèse au sein du LUBEM, les docteurs Valérie Vasseur et Patrice Nodet, merci pour vos conseils toujours avisés et pour le temps que vous avez pu me consacrer.

Mes remerciements vont également à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer au sein du département R&D microbiologie de bioMérieux, et plus particulièrement à l'équipe VITEK MS : Valérie, Marie-Christine, Sophie, Delphine J., Delphine G., Laetitia et Nadine, merci de m'avoir si bien accueillie lors de mes séjours à La Balme et surtout de m'avoir transmis votre savoir, j'ai beaucoup appris à vos côtés, toujours dans la bonne humeur. Un grand merci à Sandrine, Béatrice et Priscillia pour tout le travail effectué sur l'analyse des données et pour votre disponibilité.

Je souhaite aussi remercier tous les membres du LUBEM et de l'ESIAB, avec qui j'ai pu partager de bons moments, autour d'un repas, d'un café ou entre deux manips : Anne-Cécile, Christelle, Christophe, Dominique, Elisabeth, Florence, Franck, Gaetan B., Gaetan L.F., Jean-Luc, José, Karim, Laurence, Marie-Elisabeth, Marielle, Monika et Nolwenn. Un grand merci à Stella, pour ta disponibilité au quotidien qui facilite la vie des thésards. Une pensée spéciale à Audrey, merci

pour le travail que tu as effectué avec moi sur le projet et pour ta bonne humeur, et à Sylvie, merci de m'avoir laissée m'installer en soucho, j'espère que je ne t'ai pas trop envahie. Je souhaite aussi remercier Marc Le Romancer et Adeline Picot, pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer des missions d'enseignement. Enfin un grand merci à ma chère MHT, pour ta disponibilité et ton sens de l'humour, n'oublie pas de rester mauvaise mauvaise.

Je remercie évidemment mes compagnons de fortune (ou d'infortune selon les jours), tous les doctorants que j'ai eu l'occasion de croiser lors de ces trois ans : Annie, Fabienne, Lucille, Marcia, Marie-Caroline, Nicolas. Guillaume, bon courage pour ta dernière année, j'ai aussi une pensée pour ceux qui commencent : Marion, Mélanie, Océane et Vincent.

Un énorme merci à ceux qui sont devenus un peu plus que des collègues de travail, Amélie, merci pour tes conseils et ta confiance, je peux ouvrir ma propre collection de souches maintenant ! Merci aussi pour nos nombreuses discussions qui m'ont souvent aidée à relativiser et à décompresser. Marine et Maxence, merci pour cette dernière année riche en bons moments au labo comme en dehors, merci pour les fous-rires, les Maxime à peu près et les karaokés tard le soir. Une petite pensée pour Camille, qui a fait partie de la bande lors de son passage au LUBEM.

Merci à ma famille, de m'avoir toujours laissée libre de choisir ma voie et de m'avoir soutenue dans tout ce que j'ai entrepris, je n'en serai jamais arrivée là sans vous.

Enfin, merci à toi Jérémy d'avoir toujours été là pour me supporter, le meilleur est à venir.

Table des matières

Liste des abréviations.....	7
Liste des figures	8
Liste des tableaux.....	8
Introduction bibliographique	9
I. Les champignons	10
1) Classification.....	10
2) Développement et reproduction.....	13
3) Rôle technologique	14
II. Altérations fongiques des aliments	14
III. Identification des champignons filamenteux	20
IV. Spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	24
V. Maîtrise des altérations fongiques.....	29
VI. Objectifs des travaux de thèse.....	35
Chapitre 1 : Développement et application de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification des champignons filamenteux d'altération.....	38
I. Résumé des travaux	39
II. Article publié dans <i>Food Microbiology</i>	43
III. Résultats supplémentaires: Evaluation des performances d'identification de champignons filamenteux par spectrométrie de masse MALDI-TOF après prélèvement directe de matériel biologique à partir d'aliments contaminés	61
Chapitre 2 : Application de la spectrométrie de masse MALDI-TOF à la différenciation de complexes d'espèces et au typage de champignons filamenteux d'altération – Application aux espèces appartenant à <i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i> et à <i>Penicillium roqueforti</i>	64
I. Résumé des travaux	65
II. Article à soumettre dans <i>International Journal of Food Microbiology</i>	71
Chapitre 3 : Evaluation de la néphélométrie laser comme méthode haut-débit pour déterminer la résistance fongiques aux conservateurs – Etude préliminaire.....	100
I. Résumé des travaux	101
II. Article à soumettre dans <i>International Journal of Food Microbiology</i>	107
Discussion générale et perspectives.....	147
Références bibliographiques	158
Valorisations scientifiques	178

Liste des abréviations

ADN = Acide désoxyribonucléique
ASC = Advanced Spectra Classifier
CHCA = Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
CMI = Concentration Minimale Inhibitrice
DHB = Acide 2,5-dihydroxybenzoïque
DO = Densité Optique
DON = Déoxynivalénol
DRBC = Dichloran Rose Bengal Chloramphénicol
ESI = Electrospray Ionisation
FAO = Food and Agriculture Organization
FUM = Fumonisine
GRAS = Generally Recognized As Safe
IRTF = Infra-rouge à transformée de Fourier
ITS = Internal Transcribed Spacer
MALDI-TOF = Matrix-assisted Laser Desorption Ionization
MDS = Multi-dimensionnal scale
MEA = Malt Extract Agar
MLST = Multi-locus Sequence Typing
OTA = Ochratoxine A
PCR = Polymerase Chain Reaction
PDA = Potato Dextrose Agar
PFGE = Pulse-field Gel Electrophoresis
RAPD = Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphism
RNU = Relative Nephelometric Unit
SDA = Sabouraud Dextrose Agar
UBOCC = Université de Bretagne Occidentale Culture Collection
YGC = Yeast Glucose Chloramphenicol
ZEN = Zearalenone

Liste des figures

Figure 1 : Arbre représentatif de la classification du règne des Fungi (adapté de Willis 2018)	11
Figure 2 : Exemples schématiques de structures conidiogènes pour les genres <i>Aspergillus</i> (A), <i>Fusarium</i> (B) et <i>Penicillium</i> (C) (Crous, 2009).....	21
Figure 3 : Représentation schématique du fonctionnement d'un spectromètre de masse MALDI-TOF (adapté de Croxatto et al. 2012).....	25
Figure 4 : Exemples de mesures préventives (cercles verts) et de contrôle (cercles rouges) utilisés pour maîtriser la croissance des contaminants fongiques dans les produits alimentaires (adapté de Garnier et al. 2017)	31
Figure 5 : Structures chimiques de l'acide benzoïque (a), de l'acide sorbique (b) et de la natamycine (c).....	32

Liste des tableaux

Table 1 : Exemples de produits alimentaires et des contaminants fongiques associés	16
Table 2 : Genre et espèces productrices des mycotoxines les plus fréquemment retrouvées, substrat d'origine et teneurs maximales autorisées par la législation européenne (« Commission Recommendation of 17 August 2006 on the Presence of Deoxynivalenol, Zearalenone, Ochratoxin A, T-2 and HT-2 and Fumonisin in Products Intended for Animal Feeding (Text with EEA Relevance) » 2006)	18
Table 3 : Gènes cibles à séquencer pour l'identification de différentes espèces fongiques	22
Table 4 : Genres fongiques identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF	27
Table 5 : Réglementation des acides sorbique et benzoïque et de la natamycine : quantités autorisées et aliments concernés (<i>Règlement (UE) n° 1129/2011</i>)	33
Table 6 : Performances d'identification (pourcentage de spectres correctement identifiés à l'espèce par la base de données VTEK MS) de 3 espèces fongiques prélevées directement de matrices alimentaires en fonction du temps de prélèvement	62

Introduction bibliographique

I. Les champignons

Bien que leur utilisation par l'Homme remonte à plus de 6000 ans, les champignons sont longtemps restés méconnus par rapport aux plantes et aux animaux. Aujourd'hui, il est bien établi que ces organismes interviennent dans des processus extrêmement importants comme le recyclage de la matière organique dans les habitats terrestres ou encore les associations symbiotiques dans lesquelles les champignons facilitent l'absorption des nutriments par des plantes (Varma et Kharkwal 2009) ou des insectes (Hyodo et al. 2003). Les champignons ont un impact important sur les activités humaines. Ils sont utilisés pour l'obtention de nombreux produits de nos vies quotidiennes comme les biocarburants (Tolan 2002), certains antibiotiques (Aly et al. 2011; Houbraeken et al. 2011) et certains produits fermentés (Wang et al. 1975). Certains champignons macroscopiques sont comestibles et consommés dans le monde entier. A l'opposé, certaines espèces de champignons sont des agents pathogènes de plantes et sont à l'origine de maladies dévastant les cultures plantées par l'homme mais aussi les plantes sauvages, une menace qui s'accroît avec le réchauffement climatique (Vaughan et al. 2016). D'autres champignons peuvent aussi être pathogènes pour les animaux et l'Homme, et chez ce dernier, l'incidence de ces infections est en augmentation depuis une quinzaine d'années en raison du nombre accru de patients immunodéprimés (Atalay et al. 2016).

1) Classification

Les eucaryotes, les bactéries et les archées constituent les trois domaines du vivant. Le domaine des eucaryotes est divisé en 5 groupes majeurs, parmi lesquels celui des Unicontes, qui comprend tous les eucaryotes primitivement uni-flagellés que sont les Opisthocontes et les Amoebozoa. Les champignons ou Fungi appartiennent au groupe des Opisthocontes, au même titre que les animaux. Les recherches portant sur l'évolution ont montré que les règnes fongique et animal sont plus proches entre eux qu'ils ne le sont des autres domaines du vivant (Baldauf et Palmer 1993; Baldauf, 2008; McLaughlin et al. 2009; Spatafora et al. 2017). Le règne fongique comprend de très nombreux organismes très différents les uns des autres et regroupés dans différentes divisions, ou embranchements. Les premiers organismes fongiques seraient apparus il y a un milliard d'années (Lücking et al. 2009; Prieto et Wedin 2013), sous une forme unicellulaire, vivant dans des environnements aquatiques et se reproduisant *via* des spores asexuées propulsées par un flagelle. Ces organismes seraient similaires à ceux retrouvés aux premiers embranchements de la classification fongique (les

Cryptomycota, *Chytridiomycota* et *Blastocladiomycota*), qui produisent également des spores mobiles et vivent majoritairement dans des environnements aquatiques (Figure 1). Les *Microsporidia* ont également été placés avec ces trois groupes, bien qu'à ce jour, les spores des espèces de ce groupe n'aient jamais été décrites comme mobiles (Torruella et al. 2015). Les deux phyla ou divisions suivants dans l'évolution fongique sont les *Zoopagomycota* et les *Mucoromycota*, dont les espèces sont caractérisées par la production d'une spore à paroi très épaisse appelée zygospore. Les deux derniers phyla, *Ascomycota* et *Basidiomycota* sont capables de former des structures complexes destinées à la production des spores.

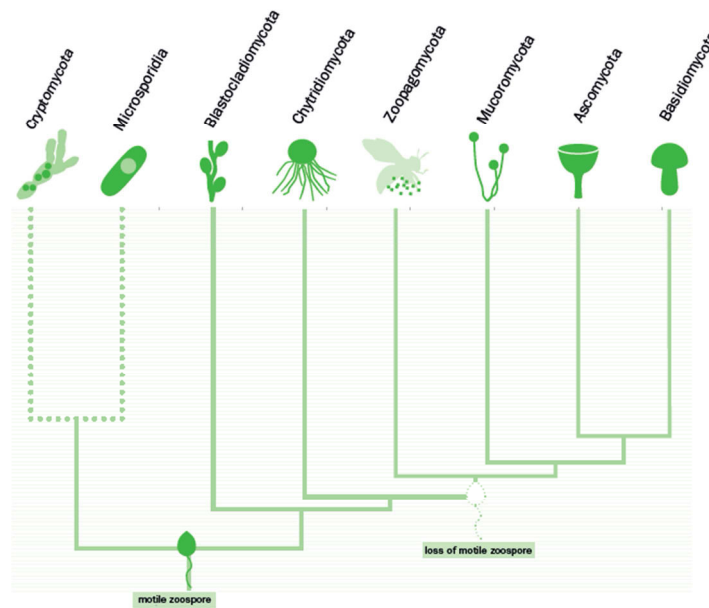


Figure 1 : Arbre représentatif de la classification du règne des Fungi (adapté de Willis 2018)

Chaque phylum est ensuite divisé en classes, ordres, familles, genres et espèces. Les *Ascomycota* et *Basidiomycota* contiennent la grande majorité des espèces fongiques décrites à ce jour (~ 90000 pour les *Ascomycota* et 50000 pour les *Basidiomycota*). Le groupe des *Basidiomycota* comprend notamment les champignons macroscopiques comestibles tels que le shiitake (*Lentinula edodes*) ou le champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) mais aussi des espèces phyto-pathogènes responsables de rouilles (*Pucciniomycotina*) ou de charbons (*Ustilaginomycotina*). Enfin, le groupe des *Ascomycota* comprend les premières espèces domestiquées par l'Homme telles que les levures utilisées, i.e. *Saccharomyces cerevisiae*, pour produire des boissons alcoolisées dont les traces les plus anciennes remontent il y a près de 6 000 ans (Vidrih et Hribar 2016), mais aussi des espèces pathogènes appartenant aux genres *Fusarium* ou *Aspergillus*, qui peuvent s'avérer dangereuses pour les cultures céréalières mais aussi pour l'Homme via la production de mycotoxines retrouvées dans les

céréales comestibles (Antonissen et al. 2014). De plus, certaines espèces sont responsables de graves infections pouvant s'avérer mortelles (Denning et Hope 2010).

Les champignons forment un groupe d'une grande diversité, avec près de 150 000 espèces décrites, même s'il est estimé que moins de 10% des espèces existantes auraient été décrites. Les dernières estimations suggèrent que le nombre total d'espèces fongiques sur Terre se trouverait entre 2,2 et 3,8 millions (Hawksworth et Lücking 2017). Traditionnellement, leur classification reposait sur l'étude de leurs caractères morphologiques et physiologiques, qui ne reflétaient pas l'évolution des espèces. Les progrès et la démocratisation des méthodes moléculaires ont permis de remodeler la classification fongique avec un nombre croissant d'espèces décrites, et leur classification repose aujourd'hui sur l'analyse de l'ADN, permettant de regrouper les espèces ayant évolué à partir d'ancêtres communs (classification dite phylogénétique).

Grâce à l'application d'analyses phylogénétiques les espèces dont la reproduction sexuée n'avait pu être observée, et qui étaient rassemblées au sein du groupe des Deutéromycètes ou champignons imparfaits ont pu être reclassées au sein de leur véritable groupe d'appartenance (*Ascomycota* ou *Basidiomycota*). Comme évoqué ci-dessus, la classification des champignons a été adaptée en fonction des nouvelles découvertes apportées par la biologie moléculaire, et il est probable que l'avènement du séquençage de génomes entiers (Spatafora, 2011) sera le prochain outil qui permettra d'affiner encore plus précisément cette classification.

La nomenclature des champignons dépend du Code International de Nomenclature Botanique (ICN) qui doit être respecté lors de l'attribution d'un nom à une nouvelle espèce fongique. Beaucoup d'espèces couramment retrouvées dans l'environnement ont été décrites plusieurs fois par des chercheurs différents et possèdent donc plusieurs noms. De même, les formes sexuées et asexuées d'un même champignon possèdent parfois des noms différents. Afin de faciliter la communication scientifique et les travaux de recherches, la double nomenclature, qui autorisait l'utilisation de noms séparés pour les différentes formes d'un même champignon a été supprimée et une nouvelle version du Code International pour la Nomenclature (ICN) des algues, champignons et plantes a été introduite, en suivant le concept « One Fungus, One Name » (un champignon, un nom) (Norvell, 2011). Pour les espèces fongiques ayant plusieurs synonymes, il a été décidé que le nom à conserver devait être celui utilisé lors de la première description de l'espèce (chronologiquement parlant). Ces nouvelles règles de nomenclature devraient faciliter la communication scientifique ainsi que la recherche d'information. Cela est particulièrement vrai en mycologie appliquée où une

identification correcte est essentielle, notamment pour le diagnostic et le traitement des pathologies fongiques.

2) Développement et reproduction

Le règne des Fungi consiste en un groupe distinct d'organismes eucaryotes qui absorbent leurs nutriments à partir de matière organique. Les champignons sont retrouvés partout dans la nature, jouant un rôle essentiel en redonnant au sol les nutriments prélevés par les plantes. Il existe cependant un large groupe d'espèces qui peuvent être des agents pathogènes de plantes, et un plus petit groupe d'espèces qui peuvent être des parasites animaux ou humains. Les champignons varient considérablement en taille et en forme mais peuvent être divisés sur la base de leur morphologie en 2 groupes majeurs : les champignons filamenteux multicellulaires ou moisissures et les champignons unicellulaires ou levures. Cependant, la séparation entre ces deux groupes n'est pas totale car il existe des champignons dimorphiques qui sont capables de modifier leur type de développement (uni- ou pluricellulaire) en fonction de leur environnement. Chez la plupart des champignons pluricellulaires, le stade végétatif consiste en un enchevêtrement ou réseau de filaments qui constituent le mycélium. Chaque filament individuel ou hyphe possède une paroi rigide constituée d'un réseau tri-dimensionnel de polysaccharides (Latgé, 2007) et se développe par croissance apicale, qui résulte simultanément de la synthèse de la paroi, la dégradation de la paroi et la pression hydrostatique dans l'hyphe (Lew, 2011). Chez les champignons dits « primitifs », les hyphes sont « non-septés » tandis que chez les groupes plus récents dans l'évolution fongique, les hyphes sont divisés en compartiments *via* le développement de septa. Ces hyphes sont définis comme « septés ». Les champignons filamenteux sont essentiellement haploïdes et peuvent se propager *via* la production de spores uni- ou pluricellulaires entourées d'une paroi rigide. Les spores peuvent être produites par reproduction sexuée (stade téléomorphe ou parfait) ou asexuée (stade anamorphe ou imparfait). Certaines espèces fongiques sont homothaliques et peuvent donc produire des spores sexuées à partir d'un seul individu. Cependant, la plupart des espèces sont hétérothaliques, et ne peuvent produire de spores sexuées que lors de la rencontre de deux individus différents et génétiquement compatibles. Traditionnellement, la classification des espèces fongiques reposait sur la description des spores et structures sexuées. Les spores asexuées ou conidies sont quant à elles produites par simple division nucléaire haploïde. Elles sont le plus souvent

produites en très grand nombre afin d'assurer la colonisation de nouveaux habitats par leur dispersion.

3) Rôle technologique

Outre les champignons comestibles macroscopiques, dont pas moins de 300 espèces sont consommées à travers le monde (Boa, 2004), les champignons microscopiques jouent un rôle majeur dans la production de nombreux produits alimentaires fermentés. Traditionnellement, les produits originaires d'Asie tels que le saké, la sauce soja ou le tempeh sont fabriqués grâce à l'utilisation des espèces fongiques *Aspergillus oryzae* et *A. sojae*. En occident, les aliments tels que le pain, la bière et le vin sont produits grâce à la fermentation des levures, et les champignons filamenteux sont utilisés dans la production fromagère notamment pour leur affinage, avec des espèces telles que celles appartenant aux genres *Mucor* (Hermet et al. 2012) et *Penicillium* (Ropars et al. 2012) et également dans la production de salaisons (Ludemann et al. 2009). Enfin, les activités métaboliques des champignons filamenteux sont également exploitées pour la production de nombreuses molécules actives telles que des enzymes et des antibiotiques (Bennett, 1998).

II. Altérations fongiques des aliments

Selon un rapport de la FAO paru en 2011, les pertes et le gaspillage alimentaires représentent 33% de la production totale d'aliments soit 1,3 milliard de tonnes par an (FAO, 2011). Les pertes alimentaire sont définies comme la nourriture perdue tout au long de la chaîne de production alimentaires, de la récolte à la transformation en passant par le stockage post-récolte. Le terme de gaspillage alimentaire quant à lui désigne les pertes alimentaires directement liées à la consommation humaine, c'est-à-dire les aliments jetés directement par les consommateurs ou les distributeurs (Parfitt et al. 2010). Le coût économique associé serait de 680 milliards US\$ dans les pays industrialisés et 310 milliards US\$ dans les pays en développement. Dans les pays industrialisés, un tiers des pertes (gaspillage) a aussi lieu chez le consommateur et si l'on transforme les quantités de nourriture produites mais non consommée dans les pays développés en valeur calorique, celle-ci est plus importante que la quantité de nourriture consommée par les pays en voie de développement (FAO, 2011). Les pertes et le gaspillage alimentaires ont de multiples causes parmi lesquelles on retrouve des agents microbiens. Ainsi, on estime que 25% des pertes et gaspillages alimentaires sont d'origine microbienne. L'altération d'un produit alimentaire dépend de sa contamination

initiale mais aussi de facteurs intrinsèques et extrinsèques. Les facteurs intrinsèques sont propres à l'aliment et incluent par exemple le pH et l'activité de l'eau (a_w). Les facteurs extrinsèques incluent la température, l'atmosphère et l'humidité relative. Ces facteurs intrinsèques et extrinsèques peuvent être modulés grâce à la transformation des produits et aux conditions de stockage, de manière à réduire l'incidence des microorganismes et à allonger la durée de vie des produits (Batt, 2016). Le plus souvent, les microorganismes responsables des altérations varient en fonction du type d'aliment, les produits avec une activité de l'eau élevée, un pH proche de la neutralité et riche en nutriments disponibles étant les plus propices aux altérations microbiennes (Blackburn, 2006). Les altérations causées par les microorganismes peuvent être divisées en deux catégories : les altérations de produits frais ou périssables (majoritairement des produits à forte a_w) et les altérations de produits transformés ou stockés, qui sont pour la plupart des aliments à a_w plus réduite (Hocking, 2014). Les champignons filamenteux étant capables de croître dans une large gamme d' a_w , de pH et de température, et pouvant utiliser de nombreux substrats comme les sucres, les acides organiques, les protéines et les lipides, ils peuvent altérer une large gamme d'aliments. Les pertes causées par les champignons représenteraient 5 à 10 % des pertes totales (Pitt et Hocking 2009). Ceux-ci peuvent contaminer les aliments par différentes voies d'entrée, par exemple par le biais de matières premières contaminées, mais aussi pendant la production, ou le stockage, *via* une contamination par des spores aéroportées. C'est pourquoi la production massive de spores est considérée comme l'une des stratégies de dispersion de nombreux champignons filamenteux d'altération comme les genres *Paecilomyces*, *Penicillium* et *Aspergillus* (Pitt et Hocking 2009). Ils peuvent se développer de manière visible et importante dans certaines zones de production et un nettoyage insuffisant peut conduire à une contamination récurrente des produits comme par exemple *Penicillium roqueforti*, qui a été retrouvé dans des usines produisant du pain de seigle ou *Geotrichum candidum* dans les produits laitiers (Dijksterhuis et al. 2013).

Les groupes fongiques les plus couramment associés aux altérations des produits alimentaires sont les suivants : les champignons filamenteux xérophiles, qui peuvent se développer à des a_w inférieures à 0,8, les champignons filamenteux thermo-résistants, qui peuvent survivre aux traitements thermiques comme la pasteurisation, les champignons filamenteux résistants aux conservateurs, les champignons filamenteux qui peuvent se développer en présence d'une très faible concentration en dioxygène ou en présence d'atmosphères modifiées, et enfin les champignons psychrophiles ou psychrotolérants, qui peuvent se développer aux températures de réfrigération (Rico-Munoz et al. 2018).

Lors de leur développement, en plus de l'altération visuelle du produit, les champignons filamenteux peuvent produire des exo-enzymes (lipases, protéases) qui vont transformer les propriétés sensorielles des aliments et induire des changements de couleur, de goût et de texture, conduisant à leur rejet par le consommateur. Il est intéressant de noter qu'il est assez rare qu'une même espèce fongique soit retrouvée comme agent d'altération dans des aliments présentant des propriétés intrinsèques et extrinsèques très différentes, cependant, une même espèce fongique peut être retrouvée sur une large gamme d'aliments présentant des caractéristiques physico-chimiques similaires (Filtenborg et al. 1996). (Houbraken et Samson 2017) ont publié récemment une liste des espèces fongiques majeures responsables d'altérations des aliments. Elle contient 14 genres et une trentaine d'espèces différentes, donnant un aperçu de la diversité des contaminants fongiques. Pour illustrer cette diversité, le Tableau 1 présente quelques genres et espèces majeures de champignons filamenteux et les produits alimentaires auxquels ils sont associés.

Table 1 : Exemples de produits alimentaires et des contaminants fongiques associés

Produit alimentaire	Espèces fongiques d'altération associées
Produits laitiers (Filtenborg et al. 1996; Garnier et al. 2017; Hawksworth 2015; Pitt et Hocking 2009)	<i>Cladosporium halotolerans</i> , <i>C. ramotenellum</i> <i>Didymella pinodella</i> <i>Fusarium domesticum</i> <i>Galactomyces geotrichum</i> <i>Mucor circinelloides</i> , <i>M. racemosus</i> <i>Penicillium antarcticum</i> , <i>P. bialowiezense</i> , <i>P. brevicompactum</i> , <i>P. commune</i> , <i>P. echinulatum</i> , <i>P. palitans</i> , <i>P. spathulatum</i> , <i>Scopulariopsis fusca</i>
Fruits et légumes (Filtenborg et al. 1996, Hawksworth 2015, Pitt et Hocking, 2009)	<i>Alternaria alternata</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Cladosporium herbarum</i> <i>Fusarium verticilloides</i> <i>Lasiodiplodia theobromae</i> <i>Penicillium digitatum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. italicum</i>
Céréales (Filtenborg et al. 1996; Hawksworth 2015; Nielsen et al. 2013; Pitt et Hocking 2009; Susca et al. 2014; Wambacq et al. 2016)	<i>Aspergillus candidus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i> <i>Claviceps purpurea</i> <i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F.</i> <i>sambucinum</i> <i>Microdochium nivale</i> , <i>M. majus</i> <i>Penicillium aurantiogriseum</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. roqueforti</i> <i>Trichoderma harzianum</i>

Produit alimentaire	Espèces fongiques d'altération associées
Produits de boulangerie (JSantos et al. 2016; Filtenborg et al. 1996; Hawksworth 2015; Le Lay et al. 2016; Pitt et Hocking 2009)	<i>Aspergillus candidus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. repens</i> , <i>A. restrictus</i> <i>Cladosporium langeronii</i> , <i>C. sphaerospermum</i> <i>Paecilomyces variotii</i> <i>Penicillium brevicompactum</i> , <i>P. roqueforti</i> <i>Wallemia sebi</i>
Produits carnés (Filtenborg et al., 1996, Hawksworth 2015, Pitt et Hocking, 2009)	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>P. nalgiovense</i> , <i>P. simplicissimum</i> <i>Thamnidium elegans</i>

Outre l'altération visuelle et sensorielle des produits, le développement des moisissures et leur possible production de mycotoxines représente un enjeu majeur de santé public. En effet, les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par les champignons filamenteux qui sont toxiques pour les vertébrés et les autres animaux. Majoritairement retrouvées lors du stockage post-récolte des céréales, ces toxines sont produites par certains champignons filamenteux au cours du stockage ou durant la culture des céréales aux champs, mais elles peuvent également être retrouvées sur des fruits, des épices ou dans des produits finis comme la bière, le pain, les jus de fruits, le chocolat, les produits laitiers ou le vin qui ont été produits à partir de matières premières contaminées (Kabak, 2009). La FAO estime que chaque année, environ 25% de la production mondiale de céréales sont contaminés par des mycotoxines et les conséquences de cette contamination sont multiples : gaspillage alimentaire, réduction de la productivité animale, augmentation des dépenses de santé, coûts d'inspection et d'analyses accrus (Krska et al. 2016).

Une espèce fongique peut produire une ou plusieurs mycotoxines, et une même mycotoxine peut être produite par différentes espèces fongiques. Cependant, le développement d'une espèce toxigène n'implique pas nécessairement la production de mycotoxines. De même, l'élimination du contaminant fongique n'assure pas l'absence de mycotoxines, qui peuvent avoir été produites avant cette élimination et perdurer au sein de l'aliment (Turner et al. 2009). Les cinq genres fongiques majeurs pouvant produire des mycotoxines sont les suivants : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* et *Penicillium* (Bryden, 2012). Les mycotoxines les plus fréquemment retrouvées, les espèces qui les produisent, les hôtes céréaliers les plus fréquemment touchés ainsi que les teneurs maximales autorisées par la législation européenne sont représentées dans le Tableau 2.

Table 2 : Genre et espèces productrices des mycotoxines les plus fréquemment retrouvées, substrat d'origine et teneurs maximales autorisées par la législation européenne (« Commission Recommendation of 17 August 2006 on the Presence of Deoxynivalenol, Zearalenone, Ochratoxin A, T-2 and HT-2 and Fumonisin in Products Intended for Animal Feeding (Text with EEA Relevance) » 2006)

Mycotoxine	Taxon	Substrat d'origine	Teneurs maximales autorisées
Aflatoxines	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Blé, orge, maïs, cacahuète	8 µg/kg pour les arachides avant traitement 5 µg/kg pour le maïs et les fruits à coques et fruits séchés avant traitement, et épices 2 µg/kg pour les aliments pour nourrissons et aliments diététiques
Deoxynivalenol (DON)	<i>Fusarium</i> sp.	Blé, orge, avoine, maïs	1750 µg/kg pour le blé, maïs et avoine bruts 1250 µg/kg pour les autres céréales brutes 750 µg/kg pour les pâtes et céréales destinées à la consommation humaine 500 µg/kg pour le pain 200 µg/kg pour les préparations à base de céréales pour nourrissons
Zearalenone (ZEN)	<i>Fusarium</i> sp.	Maïs, blé, orge, sorgho, seigle	200 µg/kg pour le maïs brut et destiné à la consommation humaine 100 µg/kg pour les autres céréales brutes 75 µg/kg pour les autres céréales destinées à la consommation humaine 50 µg/kg pour le pain 20 µg/kg pour les préparations à base de céréales pour nourrissons
Fumonisine (FUM)	<i>Fusarium proliferatum</i> <i>Fusarium verticilloides</i>	Maïs, sorgho, riz	2000 µg/kg pour le maïs brut 1000 µg/kg pour la farine de maïs 400 µg/kg pour les aliments à base de maïs destinés à la consommation humaine 200 µg/kg pour les préparations à base de maïs pour nourrissons
Ochratoxine A (OTA)	<i>Aspergillus carbonarius</i> <i>Aspergillus westerdijkiae</i> <i>Penicillium viridicatum</i> <i>Penicillium cyclopium</i>	Maïs, raisin, orge, soja, café	10 µg/kg pour les raisins secs et le café soluble 5 µg/kg pour les céréales brutes et le café torréfié 3 µg/kg pour les céréales transformées 2 µg/kg pour les vins et jus de raisin 0,5 µg/kg pour les aliments pour nourrissons et aliments diététiques

Mycotoxine	Taxon	Substrat d'origine	Teneurs maximales autorisées
T-2	<i>Fusarium sporotrichioides</i> <i>Fusarium poae</i>	Maïs, blé, orge, avoine, riz, seigle	Pas de législation actuellement mais des recommandations européennes : 25 µg/kg pour le pain 50 µg/kg pour les autres céréales et leurs produits de mouture destinés à la consommation humaine 75 µg/kg pour les céréales pour petit-déjeuner 100 µg/kg pour le froment, seigle et autres céréales non transformées, pour le maïs et le son de céréales destinés à la consommation humaine 200 µg/kg pour l'orge et le maïs non transformés, pour l'avoine destiné à la consommation humaine directe et pour le son et les flocons d'avoine 1000 µg/kg pour l'avoine non décortiquée

Comme présenté dans le Tableau 2, une même mycotoxine peut être retrouvée sur différentes céréales, parmi lesquelles certaines sont très utilisées en alimentation animale et humaine, comme le maïs, le blé et l'orge. Ces dernières années, les mycotoxines se sont imposées comme un danger mondial pour l'alimentation notamment car elles sont résistantes aux traitements thermiques (Kabak, 2009). Une étude publiée en 2012 (Rodrigues et Naehrer 2012) menée sur trois ans, trois continents et 7049 ingrédients a démontré que 81% des ingrédients étaient contaminés par au moins une des mycotoxines ciblées (aflatoxine, ZEN, DON, FUM et OTA). Un large panel d'effets toxiques des mycotoxines a été observé sur les animaux et les humains après ingestion de nourriture contaminée. Les mycotoxines peuvent avoir des effets immuno-suppresseurs (FUM, OTA, T-2), carcinogènes (aflatoxines, FUM, OTA), tératogènes (aflatoxines, OTA) et mutagènes (aflatoxines) (Bhat et al. 2010; Paterson et Lima, 2010). D'autre part, l'impact des mycotoxines dépend de nombreux facteurs comme l'exposition, la masse corporelle, l'espèce et l'âge des individus (Hussein et Brasel 2001). Afin de prévenir l'altération des produits et d'éviter la production de mycotoxines, une détection rapide et précoce des agents d'altération est essentielle, pour permettre le contrôle et la minimisation des risques microbiologiques. C'est pourquoi il est important de disposer de méthodes fiables pour l'identification des champignons filamenteux.

III. Identification des champignons filamenteux

Un nom scientifique est une clé qui permet d'accéder aux informations disponibles sur un organisme. Une identification erronée peut conduire à une mauvaise appréciation des risques posés par cet organisme ou à l'inverse, une surestimation des risques provoquant la mise en œuvre d'actions coûteuses et non nécessaires. La taxonomie, la science qui étudie et décrit les organismes, est donc l'un des éléments essentiels permettant d'assurer la qualité et la sécurité des produits alimentaires. Dans la littérature, les deux publications majeures traitant de l'identification des champignons filamenteux responsables d'altérations sont les ouvrages de Pitt et Hocking (2009) et Robert (2010). Ils rassemblent la majorité des espèces retrouvées comme agents d'altération, ainsi que certaines de leurs caractéristiques, facilitant leur diagnostic. L'ouvrage de Pitt et Hocking (2009) est une référence en mycologie alimentaire car il rassemble des informations sur un très grand nombre de contaminants fongiques, ainsi que les éléments clés pour leur identification phénotypique. D'autres ouvrages de référence existent, proposant des méthodes d'identification similaires pour des genres d'intérêt alimentaire, comme la méthode de Pitt, qui permet l'identification des espèces du genre *Penicillium* et qui est basée sur l'utilisation de différents milieux de culture, températures et temps d'incubation ainsi que sur l'observation microscopique (Pitt, 1979).

Historiquement, l'identification des champignons filamenteux s'est basée sur l'examen de leurs caractéristiques phénotypiques. Ces caractéristiques incluent notamment l'observation de caractères macroscopiques tels que l'aspect du mycélium, sa couleur ainsi que celle du revers, la production de pigments ou d'exsudat, la vitesse de croissance ainsi que la croissance en fonction du milieu de culture et de la température d'incubation. La technique Biolog™ basée sur l'utilisation de différents substrats a notamment été développée conduisant à l'obtention d'un profil métabolique qui, comparé à une base de données, permet d'identifier les organismes fongiques à l'espèce (Cantrell et al. 2006; Singh, 2009). L'identification phénotypique des champignons filamenteux repose également sur l'examen de caractères microscopiques tels que l'aspect des spores et des structures produisant ces dernières (Campbell et Johnson 2013). Cette étude morphologique nécessite une maturation suffisante pour que les thalles fongiques présentent un aspect typique et pour que les fructifications spécifiques apparaissent (Figure 2), ce qui peut parfois prendre jusqu'à plusieurs semaines pour certaines espèces. De plus, les variations morphologiques sont parfois très faibles et ne sont interprétables que par des mycologues expérimentés. Pour

conclure, cette technique classique peut s'avérer longue, fastidieuse et est souvent imprécise, d'où la nécessité de techniques alternatives.

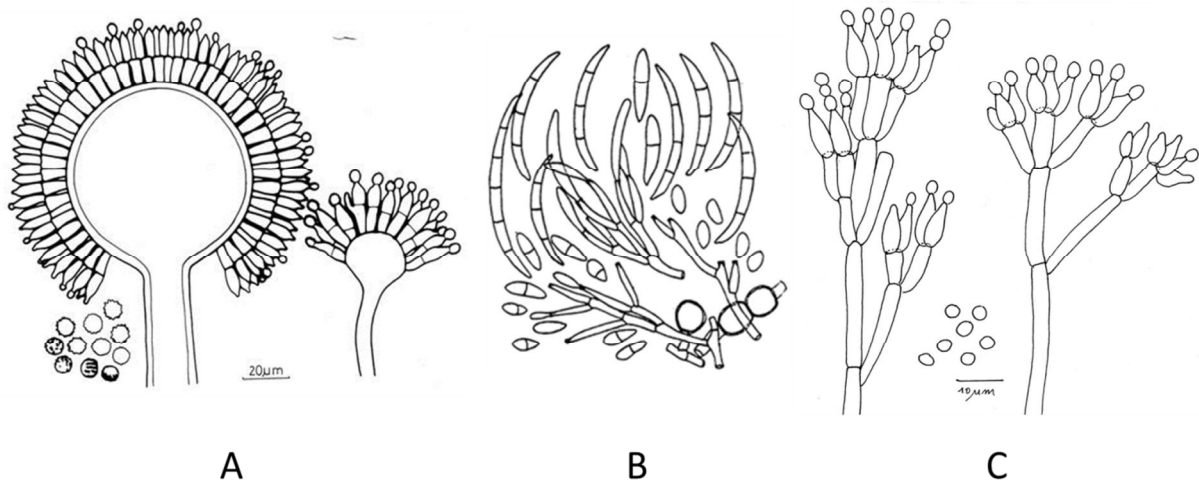


Figure 2 : Exemples schématiques de structures conidiogènes pour les genres *Aspergillus* (A), *Fusarium* (B) et *Penicillium* (C) (Crous, 2009)

Pour l'identification moléculaire des champignons, le marqueur génétique universel est l'Internal Transcribed Spacer (ITS) region (Schoch et al. 2012, 2014). Au cours des dernières années et avec les avancées considérables effectuées en biologie moléculaire, le séquençage de gènes d'intérêt est devenue la méthode de référence pour l'identification des champignons filamenteux, supplantant les autres techniques moléculaires précédemment utilisées comme la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ou la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Paterson et Bridge 1994). L'extraction d'ADN et l'utilisation de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est aujourd'hui une technique de routine dans les laboratoires de mycologie, et de nombreux kits commerciaux sont disponibles pour faciliter l'extraction d'ADN fongique. Les séquences obtenues après séquençage sont ensuite comparées à des bases de données telles que GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) ou Fungal barcoding (<http://www.fungalbarcoding.org>) afin d'évaluer leur similarité avec les séquences présentes dans la base et ainsi orienter l'identification. Il faut cependant rester critique face aux résultats obtenus grâce aux bases de données publiques car elles contiennent des séquences mal attribuées ce qui peut conduire à une identification erronée. Enfin, bien que l'ITS soit reconnu comme le marqueur universel (Dulla et al. 2016), il peut être insuffisant pour discriminer deux ou plusieurs espèces d'un même genre. Dans un tel cas, il est nécessaire d'utiliser d'autres gènes spécifiques d'intérêt taxonomique (Tableau 3), dont les exons sont très conservés et peuvent être utilisés comme la cible des amorces, tandis que leurs introns sont hautement variables, permettant une délimitation des espèces et l'obtention

d'une identification fiable à l'espèce (Samson, 2010). En plus d'une comparaison avec des bases de données, une analyse phylogénétique avec des séquences de référence peut être menée pour affiner l'assignation taxonomique d'une séquence d'intérêt. L'avènement de l'utilisation des techniques génotypiques a permis de remodeler et d'affiner la classification des champignons filamenteux, avec la description de nouvelles espèces au sein de complexes. Par exemple, Chen et al. (2017) ont redéfini la classification d'*Aspergillus* section *Aspergillus* avec 31 espèces dont 9 nouvellement acceptées, Frisvad et al. (2019) ont étudié *Aspergillus* section *Flavi* et défini 33 espèces dont 8 nouvelles, enfin, Visagie et al. (2014) se sont intéressés au genre *Penicillium* dans lequel 354 espèces sont acceptées et ont reclassé les espèces *Aspergillus paradoxus*, *A. crystallinus* et *A. malodoratus* au sein du genre *Penicillium*.

Table 3 : Gènes cibles à séquencer pour l'identification de différentes espèces fongiques

Genre fongique à identifier	Gène ciblé
<i>Aspergillus</i>	β -tubuline et calmoduline (Geiser et al. 2007)
<i>Cladosporium</i>	β -tubuline, actine et facteur d'élongation α (Bensch et al. 2012)
<i>Fusarium</i>	Facteur d'élongation α (O'Donnell et al. 2009)
<i>Mucor</i>	Actine et facteur d'élongation α (Jacobs et Botha 2008)
<i>Penicillium</i>	β -tubuline (Samson et al. 2004)
<i>Talaromyces</i>	β -tubuline et RPB2 (Yilmaz et al. 2014)

Si les techniques classiques d'observations, sont longues, parfois imprécises et nécessitent l'expertise d'un mycologue, les techniques de biologie moléculaire permettent d'obtenir une identification fiable et représentent la référence en matière d'identification sauf dans les cas où aucune ou trop peu de séquences de référence pour l'organisme à identifier sont disponibles. Cependant, ces techniques peuvent aussi s'avérer fastidieuses car elles nécessitent une étape de mise en culture préalable à l'extraction d'ADN, qui sera suivie par une PCR (Polymerase Chain Reaction) afin d'amplifier les gènes cibles, puis par le séquençage des amplicons avant de procéder à l'analyse des résultats, qui requiert une certaine expertise, expertise également nécessaire pour définir le choix des cibles à amplifier en fonction du genre fongique étudié. C'est pourquoi de nouvelles méthodes d'identification ont émergé ces dernières années, notamment les méthodes spectrales, qui pourraient être appliquées à l'identification haut débit et peu coûteuse des champignons filamenteux. Ces méthodes comprennent la spectrométrie de masse MALDI-TOF et les spectroscopies Raman (Ghosal et al. 2012) et Infra-Rouge à Transformée de Fourier (Shapaval et al. 2013).

La spectroscopie est basée sur les interactions de radiations électromagnétiques avec la matière. Les méthodes spectroscopiques peuvent être basées sur les phénomènes d'émission, d'absorption, de fluorescence ou de dispersion et elles peuvent être utilisées pour des analyses quantitatives ou qualitatives. La spectroscopie Raman, est une technique basée sur la dispersion et sur l'effet Raman (du nom de son inventeur) : un effet optique selon lequel la fréquence de la lumière peut être modifiée par le milieu dans lequel elle circule. En pratique, un échantillon est éclairé par un rayon laser monochromatique qui va interagir avec les molécules de l'échantillon et ainsi provoquer la dispersion de la lumière. La lumière dispersée ayant une fréquence différente de la lumière émise, un spectre va ainsi pouvoir être généré (Bumbrah et Sharma 2016). Un des avantages de cette technique est qu'elle peut être miniaturisée et donc fournir des appareils très légers et utilisables sur le terrain. Dès 2003, l'application de cette technique à l'identification de bactéries et champignons filamenteux a été explorée (Maquelin et al. 2003) puis à l'identification de spores de macromycètes (De Gussem et al. 2007), et plus récemment l'identification de champignons filamenteux de différents genres d'intérêt comme *Aspergillus* et *Fusarium* (Fazio et al. 2018; Ghosal et al. 2012) dans un contexte environnemental, mais aussi de dermatophytes dans un contexte clinique (Witkowska et al. 2018). Cependant, le nombre de publications concernant l'identification de champignons filamenteux reste faible ce qui fait de la spectroscopie Raman une technique encore émergente et qui demande à être développée. La spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (ou IRTF) est elle aussi basée sur le principe d'absorption de la lumière, mais il s'agit ici d'une source infra-rouge polychromatique. Lors de son application à l'identification de microorganismes, les spectres obtenus présentent des valeurs d'absorbances spectroscopiques infra-rouge qui sont corrélées aux rangs taxonomiques par une analyse discriminante des moindres carrés partiels ou algorithme PLS-DA, qui permet ensuite de prédire l'attribution d'un spectre inconnu à un rang taxonomique (Lecellier, 2013). Dès 2002, cette technique a pu être appliquée pour la différenciation et la détection de *Fusarium oxysporum* et *Rhizopus stolonifer* sur des plants de tomates (Hahn, 2002) et par la suite, à l'identification d'espèces appartenant au genres *Aspergillus* et *Penicillium* (Fischer et al. 2006) jusqu'à la publication de Shapaval et al. (2013), qui ont proposé et évalué avec succès un protocole haut débit pour l'identification de 19 espèces fongiques d'altération. Une autre équipe a également développé une base de données spectrales représentant 140 espèces, et a pu obtenir une identification correcte à l'espèce pour plus de 90% des spectres (Lecellier et al. 2014, 2015). Cependant, malgré une utilisation possible en haut-débit et une automatisation (Li et al. 2016), cette technique présente certains inconvénients, notamment

dans la préparation des échantillons avant analyse qui doit être très standardisée et requiert de nombreuses étapes. De plus, l'absence de calibration interne lors de l'acquisition des données conduit à des performances très variables en fonction de l'instrument utilisé (Lecellier et al. 2015).

IV. Spectrométrie de masse MALDI-TOF

La spectrométrie de masse est utilisée en chimie depuis de nombreuses années mais sa première application à l'identification bactérienne remonte à 1975 (Anhalt et Fenselau 1975). Dans les années 80 et 90, le développement de diverses techniques de désorption/ionisation et notamment des techniques d'ionisation « douces » comme le matrix assisted laser desorption ionisation (MALDI) ou l'ionisation « electrospray » (ESI) ont permis l'analyse de protéines intactes. La spectrométrie de masse « Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight » (MALDI-TOF) est une technique couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol. L'instrument est composé de trois éléments fonctionnels : une source d'ionisation, pour transférer les ions moléculaires de l'échantillon dans l'analyseur, un analyseur de masse, pour séparer les ions en fonction de leur ratio masse / charge (m/z) et un détecteur. La technique MALDI permet de générer majoritairement des ions à une seule charge. Les analyseurs de masse TOF sont utilisés depuis de nombreuses années pour l'identification microbienne car ils permettent une analyse rapide et peuvent être miniaturisés, de plus, ils sont bien adaptés à l'ionisation de type MALDI. Pour l'analyse, les échantillons biologiques sont mélangés à une matrice qui va permettre la cristallisation de l'échantillon. La matrice est composée de petites molécules acides ayant une forte capacité d'absorption, pour transmettre l'énergie de la source d'ionisation aux molécules de l'échantillon (Fenselau et Demirev 2001; Nakamura et al. 2016). Les deux matrices les plus utilisées pour l'analyse d'échantillons fongiques sont l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) et l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA), car elles sont appropriées pour l'analyse de molécules ayant une masse comprise entre 5000 et 20000 Da comme les protéines ribosomales. La plupart des microorganismes peuvent être analysés sans lyse cellulaire préalable car l'exposition à l'acidité de la matrice permet de lyser les cellules. Cependant, certains organismes comme les champignons filamenteux ayant une paroi épaisse et résistante (Latgé, 2007), il est préférable de passer par une étape d'extraction (impliquant généralement un traitement à l'acide formique et à l'acétonitrile) avant l'analyse par spectrométrie de masse. Lors de l'analyse (Figure 3), la matrice va absorber l'énergie du laser

conduisant à la désorption des échantillons qui sont ainsi ionisés et propulsés dans l'analyseur TOF, un tube de métal sous vide, dans lequel les ions vont être séparés en fonction de leur ratio m/z , avant d'atteindre le détecteur. Chaque pic du spectre de masse correspondra ainsi à un rapport m/z et la hauteur du pic sera proportionnelle au nombre d'ions de même m/z ayant atteint le détecteur. La spectrométrie de masse MALDI-TOF est une technique rapide, répétable et peu coûteuse en terme de coût d'analyse par échantillon, et elle permet de générer des spectres de masse caractéristiques via la détection des protéines ribosomales dont l'expression est abondante, constante et bien conservée d'une espèce à l'autre, ce qui en fait une candidate idéale pour l'identification microbienne.

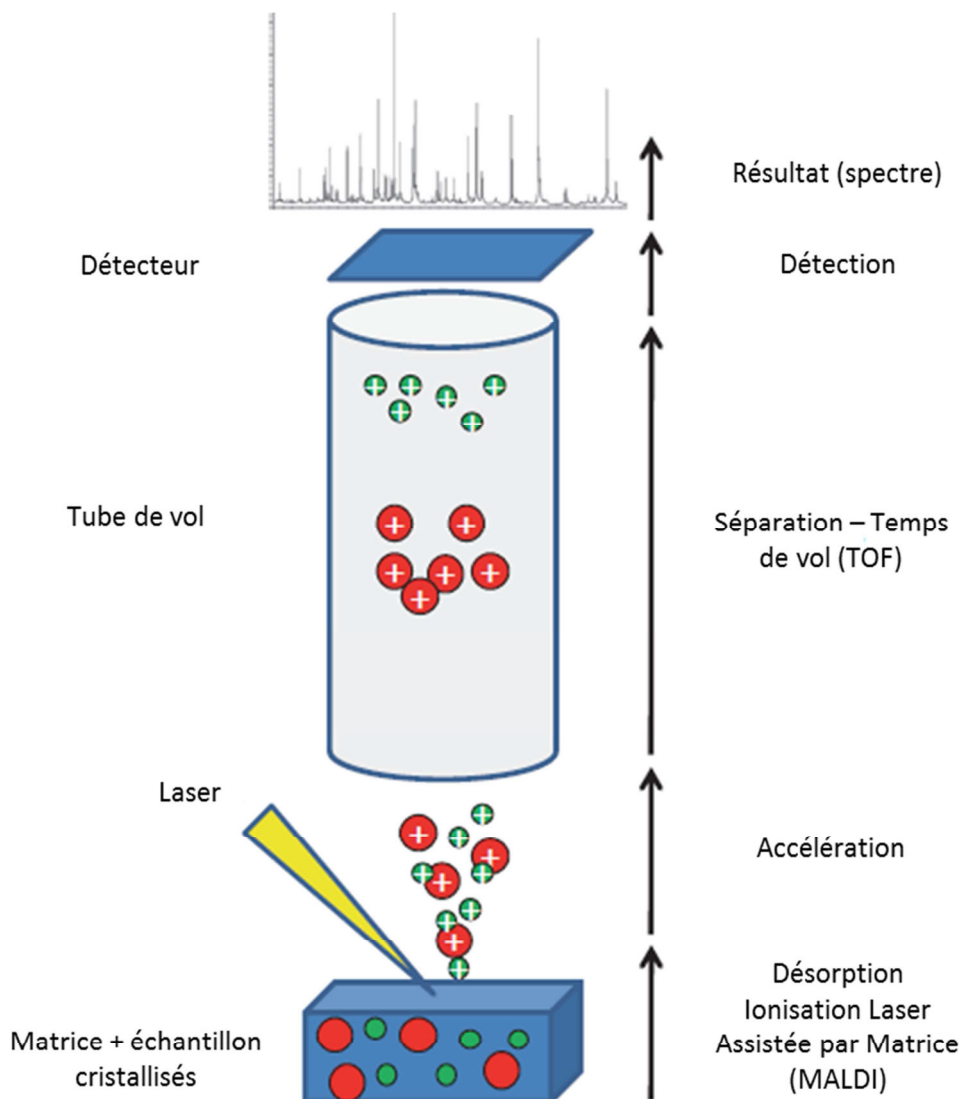


Figure 3 : Représentation schématique du fonctionnement d'un spectromètre de masse MALDI-TOF (adapté de Croxatto et al. 2012)

C'est en 1994 qu'apparaît la première publication (Cain et al. 1994) traitant de l'identification bactérienne par spectrométrie de masse MALDI-TOF après traitement des cellules bactériennes (sonication et précipitation des protéines), suivie en 1996 par une autre publication traitant également de l'identification bactérienne, mais cette fois à partir de cellules intactes, n'ayant pas subi de traitement avant analyse (Holland et al. 1996). Par la suite, de nombreuses études ont démontré la fiabilité de cette technique pour l'identification d'espèces bactériennes (Nagy et al. 2009; Fournier et al. 2012; Nacef et al. 2017; van Baar 2000; van Wuijckhuijse et al. 2005) et même de virus (Vitale et al. 2013). L'application de la spectrométrie de masse à l'identification des champignons filamenteux n'est intervenue qu'une dizaine d'années après son utilisation pour les bactéries, avec les travaux de Chen et Chen en 2005 sur des spores de *Penicillium*, et ceux de Kallow et al. (2006), sur plusieurs souches d'*Aspergillus* section *Nigri*, cultivées en milieu liquide et ayant subi une étape de lyophilisation. La fiabilité de la spectrométrie de masse MALDI-TOF appliquée à l'identification des champignons filamenteux est aujourd'hui bien établie grâce aux nombreux travaux qui ont souligné sa robustesse, cependant, la plupart de ces publications concernent un nombre limité d'espèces ou un seul genre fongique. le Tableau 4 répertorie des exemples de publications traitant de l'identification des champignons par spectrométrie de masse MALDI-TOF ainsi que les résultats obtenus. Quelques travaux ont été menés sur la construction de bases de données (Becker et al. 2015; Lau et al. 2013; Cassagne et al. 2011; De Carolis et al. 2012). La majorité des publications concerne les champignons filamenteux d'intérêt clinique (Del Chierico et al. 2012; Gautier et al. 2014; McMullen et al. 2016; Packeu et al. 2013; Panda et al. 2015; Sleiman et al. 2016). Un nombre restreint d'équipes de recherche ont également exploré avec l'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour la différenciation de complexes d'espèce, avec des résultats variables. Al-Hatmi et al. (2015) ont pu différencier les espèces d'intérêt clinique du complexe *Fusarium fujikuroi*, tandis que plusieurs équipes n'ont pas réussi à différencier des espèces proches du genre *Aspergillus* telles que *A. flavus* et *A. oryzae* (Li et al. 2017; Park et al. 2017; Rodrigues et al. 2011) sur la base de l'analyse de leurs spectres.

Table 4 : Genres fongiques identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Genre/espèce étudiés	Nombre d'espèces et de souches étudiées	Préparation des échantillons	Résultats	Références
<i>Alternaria</i> spp.	12 espèces 60 souches	Dépôt direct mycélium + spores	Bonne séparation des espèces basée sur l'analyse de similarité des spectres	Chowdappa et al. 2013
<i>Aspergillus</i> spp.	28 espèces 140 souches	Dépôt direct mycélium + spores	98,6% d'identifications correctes	Alanio et al. 2011
<i>Aspergillus</i> spp.	4 espèces 24 souches	Extraction acide formique/acétonitrile	83% d'identifications correctes	Atalay et al. 2016
<i>Aspergillus</i> spp.	12 espèces 17 souches	Extraction acide trifluoroacétique/acétonitrile	100% d'identifications correctes	Hettick et al. 2008b
<i>Aspergillus</i> spp.	11 espèces 102 souches	Extraction acide formique/acétonitrile	Bonne séparation des espèces basée sur l'analyse de similarité des spectres sauf pour les espèces proches	Rodrigues et al. 2011
<i>Fusarium</i> spp.	14 espèces 84 souches	Extraction acide formique/acétonitrile	93,6% d'identifications correctes	Al-Hatmi et al. 2015
<i>Fusarium verticilloides</i>	60 souches	Dépôt direct mycélium + spores	100% d'identifications correctes	S. Chang et al. 2016
<i>Fusarium</i> spp.	9 espèces 62 souches	Extraction acide trifluoroacétique/acétonitrile	91,8% d'identifications correctes	Marinach-Patrice et al. 2009
<i>Penicillium</i> spp.	6 espèces 20 souches	Dépôt direct spores	Bonne séparation des espèces basée sur l'analyse de similarité des spectres	Chen et Chen 2005
<i>Penicillium</i> spp.	12 espèces 12 souches	Extraction acide trifluoroacétique/acétonitrile	100% d'identifications correctes	Hettick et al. 2008a

Après acquisition des spectres, deux méthodes sont possibles pour les analyser et obtenir une identification. La première approche consiste à comparer le spectre obtenu à une base de données spectrales pour obtenir une identification. Cette solution est rapide, simple et facile à implémenter en routine, pour peu qu'une base de données suffisamment complète et robuste soit disponible. La deuxième approche consiste à estimer la masse moléculaire des pics obtenus et à la comparer avec des masses moléculaires protéiques théoriques obtenues à partir de génomes séquencés (Demirev et al. 1999; de Koster et Brul 2016). Cependant, pour les bactéries comme pour les champignons filamenteux, cette méthode est limitée par le nombre de génomes séquencés et également par l'avancée limitée du développement des bases de données protéiques. Les systèmes commerciaux d'identification microbienne par spectrométrie de masse reposent donc sur la première approche. Dans cette approche, deux procédures différentes sont utilisées par les systèmes commerciaux pour créer la base de données spectrale. La première consiste en l'utilisation de nombreux spectres d'une souche afin de générer un « profil principal de spectres » (Sauer et al. 2008), tandis que la deuxième procédure génère un « super-spectre » obtenu en combinant les spectres de plusieurs souches, cultivées dans des conditions de culture différentes (Emonet et al. 2010). Pour ce deuxième cas, Normand et al. (2013) ont démontré que le nombre de souches utilisées ainsi que le nombre de réplicats biologiques utilisés pour construire une base de données spectrales ont un impact significatif sur les performances d'identification, en effet, en testant plusieurs constructions de base de données spectrales, ils ont obtenu les meilleures performances d'identification pour la base de données construite avec le plus de souches différentes possibles et le plus grand nombre de réplicats biologiques. De manière plus générale, il est nécessaire de s'assurer que les spectres utilisés pour construire la base de données ont été obtenus à partir de souches parfaitement identifiées et pures. Il faut également s'assurer que lorsqu'un traitement de pré-acquisition des spectres est nécessaire (par exemple une extraction protéique dans le cas des champignons filamenteux), il soit identique lors de la construction de la base de données puis lors de l'utilisation de cette base de données en routine (Rahi et al. 2016). Enfin, l'utilisation en routine de la spectrométrie de masse MALDI-TOF est dépendante de la fiabilité et de la richesse des bases de données spectrales, qui sont elles-mêmes conditionnées par la complexité de la taxonomie fongiques et la grande diversité des espèces d'altération. En conclusion, la spectrométrie de masse MALDI-TOF peut donc être considérée comme une technique fiable et rapide pour l'identification des champignons filamenteux, sous réserve de disposer de bases de données robustes et les plus complètes possibles en terme d'espèces répertoriées. Enfin, la complexité de la taxonomie

fongique associée à la diversité de plus en plus large des espèces fongiques responsables d'altérations constituent un défi important pour l'élaboration de bases de données fiables pour une utilisation en routine de la spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Outre son utilisation pour l'identification de micro-organismes, la spectrométrie de masse MALDI-TOF a également été appliquée au typage de souches bactériennes appartenant à de nombreuses espèces d'intérêt clinique telles que *Staphylococcus aureus* (Ueda et al. 2015) ou *Salmonella enterica* (Kuhns et al. 2012) avec des résultats similaires à ceux obtenus par les méthodes traditionnelles de typage basées sur l'analyse de l'ADN telles que le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP), ou l'électrophorèse en champs pulsé (PFGE). Dans le contexte industriel, la technique MALDI-TOF a également permis de différencier des isolats de *Lactobacillus brevis* et de corréler la classification des spectres obtenus en fonction des propriétés physiologiques des isolats (Kern et al. 2014). Cependant, le typage des organismes fongique s'avère plus difficile, notamment à cause de la nature complexe de leurs relations phylogénétiques (Bader, 2013), et peu d'études ont été consacrées à l'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF appliquée au typage des champignons filamenteux. Quelques travaux ont été menés sur les levures, notamment en contexte industriel sur les espèces utilisées en vinification, pour lesquelles l'analyse des spectres et l'analyse génétique ont abouti à une classification similaire des isolats (Usbeck et al. 2014). Ces études ouvrent des perspectives quant à l'utilisation de la spectrométrie de masse appliquée au typage des champignons filamenteux, qui serait d'un grand intérêt en contexte industriel, notamment pour permettre de différencier les souches impliquées dans les procédés de fermentation des aliments, mais également pour tracer l'origine des contaminants.

V. Maîtrise des altérations fongiques

Traditionnellement, des moyens de lutte ont été mis en place par l'Homme pour lutter contre l'altération des produits alimentaires par les champignons filamenteux : fermentation, addition de sel ou de sucre à de fortes concentrations, séchage des produits ou stockage au froid. Aujourd'hui, les mesures classiques de lutte contre les altérations (Figure 4) sont similaires à celles utilisées depuis toujours et peuvent être divisées en deux catégories. Les mesures préventives, qui permettent d'éviter les contaminations du produit comme l'emballage en conditions aseptiques, l'utilisation d'un système de filtration de l'air ou encore l'implémentation de bonnes pratiques d'hygiène, et les mesures de contrôle, qui permettent de ralentir ou d'inhiber la croissance microbienne comme l'ajout de

conservateurs, le conditionnement sous atmosphère modifiée, le stockage à basse température ou de détruire totalement ou partiellement les microorganismes tels que les traitements thermiques ou les traitements haute-pression (Garnier et al. 2017). Les méthodes citées ici correspondent à des moyens de lutte « post-récolte », qui se concentrent sur la maîtrise de la qualité des produits alimentaires, il est cependant à noter que des mesures « pré-récolte » peuvent être mises en œuvre notamment aux champs, avec l'utilisation de bio-protection par exemple. Un des moyens de maîtrise de la qualité et la sécurité des produits alimentaires est l'utilisation du concept de technologies barrières (« hurdle concept ») ou combinaison de méthodes de conservations. Ce concept vise à améliorer la qualité sanitaire des produits tout en réduisant l'intensité des traitements de prévention administrés (Khan et al. 2017; Leistner et Gorris 1995). Cependant, bien que l'utilisation de ces différentes mesures permette de réduire le nombre de contaminants capables d'altérer un produit, leur accumulation peut parfois conduire à la sélection d'espèces fongiques résistantes, associées à chaque mesure, par exemple, des espèces résistantes aux traitements thermiques ou aux conservateurs (Rico-Munoz et al. 2018). Il est donc nécessaire de choisir les bonnes techniques de conservation et les traitements adéquats à appliquer aux produits. De plus, un des enjeux actuel est la demande des consommateurs, de produits frais, non transformés et « naturels », exempts d'additifs. Or l'absence de traitements peut favoriser la croissance des microorganismes d'altération et donc avoir une influence négative sur la qualité des produits. C'est dans ce contexte qu'a émergé la démarche « Clean Label » afin de répondre à la demande des consommateurs, dans laquelle les entreprises s'attachent à simplifier les déclarations d'ingrédients et également à éliminer les additifs et ingrédients jugés « artificiels » en comparaison à des produits jugés plus « naturels ». C'est pourquoi les recherches se tournent aujourd'hui vers des alternatives comme l'utilisation d'atmosphères modifiées, de cultures bio-protectrices (Le Lay et al. 2016), d'extraits de plantes (Aguilar-González et al. 2015) ou de cires comestibles pour préserver la qualité des produits (Valencia-Chamorro et al. 2010).

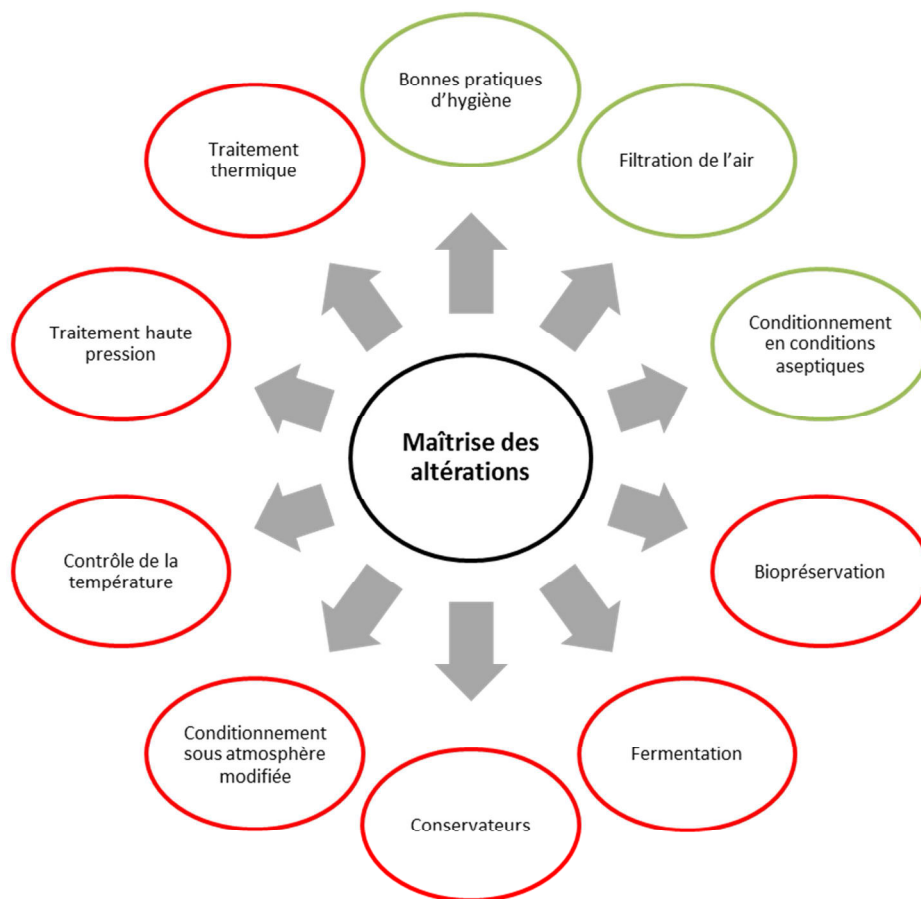


Figure 4 : Exemples de mesures préventives (cercles verts) et de contrôle (cercles rouges) utilisés pour maîtriser la croissance des contaminants fongiques dans les produits alimentaires (adapté de Garnier et al. 2017)

Selon le règlement UE n°1333/2008, les conservateurs sont des substances qui prolongent la durée de vie d'un aliment en le protégeant des altérations dues aux micro-organismes (bactéries, levures, moisissures). Parmi ces conservateurs antibactériens et antifongiques, on distingue les conservateurs minéraux (tels que les nitrites et les sulfites) et organiques (De reynal, 2009). Les acides organiques sont naturellement produits par de nombreux organismes, ils présentent une faible toxicité pour l'Homme, ont un large spectre d'activité et un coût peu élevé (da Cruz Cabral et al. 2013). Ils possèdent également le statut GRAS (Generally Recognized As Safe) et peuvent être utilisés individuellement ou en combinaison. Leurs propriétés anti-fongiques dépendent de leur pKa et sont optimales à des pH faibles (Alcano et al. 2016), qui favorisent les formes non-dissociées, et leur mode d'action est expliqué par la théorie des acides faibles (Stratford et Anslow 1996). En effet, les formes non-dissociées sont très solubles dans les lipides et vont donc pouvoir traverser aisément la membrane plasmique. Une fois à l'intérieur de la cellule fongique, le pH interne de cette dernière étant proche de la neutralité, elles vont se dissocier en anions et protons. Le relargage de ces protons va déstabiliser le pH intra-cellulaire et l'abaisser, inhibant ainsi le

métabolisme cellulaire (Brul et Coote 1999). De nombreux acides organiques sont utilisés en industrie agro-alimentaire mais seuls trois seront présentés dans cette étude bibliographique car il s'agit de ceux étudiés lors des travaux menés au cours de cette thèse.

L'acide sorbique (Figure 5) est largement utilisé en industries agro-alimentaires (additif E200), notamment dans l'industrie laitière et dans les produits sucrés à faible pH comme les boissons aromatisées. Il s'agit d'un composé naturel qui possède un avantage important car il n'a pas d'impact sur le goût ou l'odeur des produits et il est actif jusqu'à pH 6,5 contrairement à la plupart des autres acides faibles dont l'activité est optimale jusqu'à pH 5. Ceci pourrait être expliqué par son mode d'action qui est différent de celui décrit par la théorie des acides faibles. En effet, l'application de ce conservateur sur des spores d'*Aspergillus niger* n'a pas provoqué de diminution du pH intracellulaire (Stratford et al. 2009). Stratford et al. (2009) ont également noté que l'acide sorbique fait partie des biocides dont l'effet est corrélé à l'hydrophobicité, et qui se dissocient en présence de lipides, indiquant que le site d'action de ce conservateur pourrait être la membrane plasmique fongique. L'action de l'acide sorbique pourrait donc causer des fuites membranaires, perturber l'intégrité de la membrane et augmenter la perméabilité protonique. Il est également possible que les protéines membranaires de transport soient affectées par un éventuel remplacement des phospholipides membranaires par l'acide sorbique (Sergeeva et al. 2009; Stratford et al. 2009).

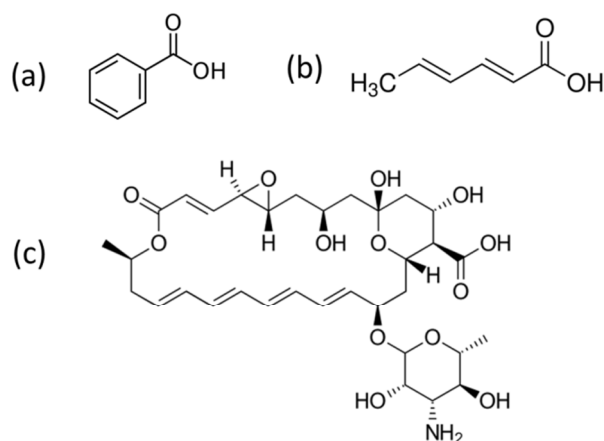


Figure 5 : Structures chimiques de l'acide benzoïque (a), de l'acide sorbique (b) et de la natamycine (c)

L'acide benzoïque (figure 5) est également utilisé dans les produits sucrés à faible pH et notamment les boissons (additif E210) mais il est généralement efficace à des concentrations plus faibles que l'acide sorbique (Levinskaite, 2012). Son mode d'action pourrait correspondre à la théorie des acides faibles proposée par Stratford et Anslow (1996) car une

acidification du cytoplasme a été observée lors de l'application de ce conservateur chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Krebs et al. 1983).

Selon la législation (Tableau 5), ces deux acides organiques peuvent être utilisés seuls ou en mélange. Il convient cependant d'être vigilant car l'addition de différents conservateurs peut conduire à trois effets distincts : un effet additif – l'effet de la combinaison sera égal à la somme des effets séparés, un effet synergique – l'effet de la combinaison sera supérieur à la somme des effets séparés, ou un effet antagoniste – l'effet de la combinaison sera inférieur à la somme des effets séparés.

Enfin, un autre conservateur largement utilisé en industrie est la natamycine (ou pimaricine, E235, Figure 5), notamment à la surface des fromages affinés et des saucisses sèches et saucissons. Cet antibiotique fait partie de la famille des polyènes et a pour cible la membrane plasmique, et plus particulièrement l'ergostérol, auquel il se lie et inhibe les transporteurs membranaires ergostérol-dépendants impliqués dans la synthèse membranaire (te Welscher et al. 2008, 2012). Il est également reconnu GRAS, et contrairement aux acides faibles, il est actif à de faibles concentrations et agit sur un grand nombre d'espèces fongiques (Resa et al. 2014).

Table 5 : Réglementation des acides sorbique et benzoïque et de la natamycine : quantités autorisées et aliments concernés (*Règlement (UE) n° 1129/2011*)

Conservateurs	Quantité autorisée	Aliments concernés
Acide sorbique – Sorbates Acide sorbique (E200) Sorbate de potassium (E202) Sorbate de calcium (E203)	20 mg/kg 300 mg/kg 1000 mg/kg 2000 mg/kg <i>quantum satis</i> *	Agrumes fraîches (surface) Boissons aromatisées Lait caillé, fromage (non affiné, en tranches, préemballé), fruits secs, préparations de fruits et légumes Fromages fondus, produits de boulangerie pré-cuits et pré-emballés Fromages affinés (uniquement en surface)
Acide benzoïque – Benzoates Acide benzoïque (E210) Benzoate de sodium (E211) Benzoate de calcium (E213)	150 mg/kg 500 mg/kg 1500 mg/kg 2000 mg/kg	Boissons aromatisées Préparations à base d'algues marines, olives et produits à faible teneur en sucre Chewing-gum Betteraves rouges cuites
Sorbates + Benzoates (E200-E213)	300 mg/kg 5000 mg/kg <i>quantum satis</i> *	Desserts à base de produits laitiers non traités thermiquement Œufs liquides Produits de viande séchée (uniquement en surface)
Natamycine (E235)	1 mg/dm ² (absence à 5mm de profondeur)	Fromages affinés, saucisses sèches et saucissons (uniquement en surface)

**quantum satis* = pas de valeur limite

Malgré l'utilisation des moyens de lutte présentés ci-dessus, de nombreux contaminants fongiques sont capables de persister dans l'environnement, et certains ont même développé des résistances aux conservateurs qui peuvent être divisés en trois stratégies, la destruction ou métabolisation de la molécule active, l'évitement afin d'empêcher le contact entre les cellules fongiques et le conservateur, et enfin, la réparation des dommages causés par le conservateur (Brul et Coote 1999). Plusieurs études ont démontré la résistance de certaines espèces aux substances présentées ci-dessus telles que *A. niger*, *Trichoderma viride* et *T. koningii* qui ont montré des résistances à l'acide sorbique (Plumridge et al. 2010, 2004; Pinches et Apps 2007). D'autres espèces telles que *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum* et *Penicillium italicum* étaient résistantes à des mélanges d'acides organiques composés de benzoate de sodium, nitrite de sodium et sorbate de potassium (Stanojevic et al. 2009). Enfin, la germination des spores d'*Aspergillus niger* et *Penicillium discolor* étaient possibles même à de fortes concentrations en natamycine (Leeuwen et al. 2010).

Afin de mieux comprendre le comportement des champignons filamenteux face à ces conservateurs, il est donc nécessaire d'évaluer leur croissance en présence de ces derniers. Pour cela, différentes méthodes existent, la plus courante consistant à observer la croissance ou l'absence de croissance sur boîte de Petri, en utilisant des milieux de culture gélosés contenant la molécule à tester. La croissance est ensuite évaluée *via* la mesure journalière du diamètre du thalle à la surface de la gélose, parfois jusqu'à 30 ou 50 jours d'incubation pour les plus fortes concentrations testées (León Peláez et al. 2012; Kosegarten et al. 2017). Mais des méthodes alternatives en milieu liquide ou semi-liquide (Medina et al. 2012) basées sur la mesure d'un trouble pour caractériser la croissance fongique peuvent être utilisées. Souvent réalisées en microplaques, ces méthodes permettent d'effectuer des mesures de croissance fongique haut débit. Les données acquises *via* ces méthodes peuvent être utilisées afin de modéliser différents paramètres, permettant de décrire et prévoir la croissance fongique *via* l'utilisation de modèles développés en mycologie prévisionnelle. A partir des cinétiques de croissance, des modèles primaires sont utilisés pour déterminer les valeurs des paramètres de croissances que sont la vitesse de croissance maximale (μ_{\max}) et la phase de latence (λ), ces modèles pouvant être linéaires ou non linéaires en fonction de la méthode utilisée pour suivre la croissance (mesure du diamètre radial, détermination du pourcentage de germination, mesure d'un trouble) (Dantigny et al. 2005). Par la suite, des modèles secondaires peuvent être utilisés pour décrire l'évolution d'un paramètre primaire en fonction d'un facteur environnemental. Par exemple, l'évolution de μ_{\max} en fonction du pH ou de la concentration en conservateur. Ces modèles permettent ainsi de décrire l'effet de facteurs limitants sur le

développement des moisissures et d'estimer des valeurs références comme la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'un composé antifongique (Dagnas et Membré 2013). Enfin, la modélisation tertiaire, permet de combiner les modèles primaires et secondaires sous la forme de programmes informatiques regroupant des données de croissance acquises pour un grand nombre de contaminants alimentaires, de facteurs et de produits alimentaires permettant ainsi de prévoir le développement de micro-organismes dans les aliments (Chaix et al. 2015). Ces outils de microbiologie prévisionnelle permettent ainsi aux industriels de mettre en place les mesures adéquates pour prévenir le développement des contaminants.

Certaines études ont validé l'utilisation de la mesure de la densité optique, notamment dans un contexte clinique pour évaluer l'efficacité des traitements anti-fongiques (Meletiadis et al. 2001). Cependant, un des inconvénients de la mesure de densité optique est qu'elle n'est proportionnelle à la densité cellulaire qu'au début du développement fongique (Meletiadis et al. 2003). Une des solutions pour pallier à cet inconvénient est l'utilisation de la néphélométrie laser, basée sur la mesure de la dispersion de la lumière, qui est proportionnelle à la densité cellulaire. Son utilisation pour suivre la croissance d'organismes fongiques a été validée (Joubert et al. 2010). Toutefois, peu de travaux ont été publiés sur son utilisation (Rédou et al. 2015).

VI. Objectifs des travaux de thèse

L'introduction bibliographique précédente a souligné l'importance économique et sanitaire des problèmes d'altérations des aliments engendrés par les champignons filamenteux, *via* la perte et le gaspillage des denrées alimentaires contaminées, et *via* la production potentielle de mycotoxines. C'est pourquoi il est nécessaire de disposer d'outils fiables et rapides pour permettre leur identification, qui représente une étape clé dans la maîtrise de la qualité et de la sécurité des denrées alimentaires.

Les principaux outils d'identification reposent sur des méthodes phénotypiques dites « conventionnelles » basées sur la recherche de caractères morphologiques et culturels des souches. Ces méthodes sont longues, laborieuses, peu reproductibles et requièrent des connaissances très vastes en raison de la grande diversité des moisissures. Par ailleurs, elles ne permettent pas de différencier certaines espèces très proches. En effet, la phylogénie moléculaire appliquée aux champignons filamenteux a permis de révéler qu'il existait chez les champignons de nombreux complexes d'espèces cryptiques, c'est-à-dire morphologiquement semblables. En outre, la connaissance et l'expertise dans ce domaine fait

appel à des compétences qui sont de plus en plus rares dans l'industrie, voire dans le secteur de la recherche publique. Au cours des quinze dernières années, ont été développées des méthodes « non conventionnelles » basées sur les techniques de biologie moléculaire utilisant le polymorphisme de l'ADN. Cependant, ces méthodes ont également leurs limites, à savoir l'investissement dans l'équipement, la complexité des protocoles, le coût élevé des réactifs, la difficulté d'automatisation et une formation technique spécifique.

Parallèlement à ces méthodes, de nouvelles approches de mesure physique ont vu le jour et ont aujourd'hui déjà fait l'objet d'étude pour l'identification de bactéries et de levures, principalement dans le domaine clinique. C'est le cas de la spectrométrie de masse MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight*). Appliquée sur cellules intactes ou préalablement lysées (cas des champignons, levures et certaines bactéries), différents biomarqueurs différenciés par leur rapport masse/charge vont ainsi être mis en évidence comme les peptides, les protéines (protéines ribosomales), les glycoprotéines et les oligonucléotides conférant ainsi à une espèce microbienne voire même une souche, un spectre, une empreinte qui lui est propre (Croxatto et al. 2012).

La spectrométrie de masse MALDI-TOF a révolutionné l'identification en routine de microorganismes (levures et bactéries) dans les laboratoires de microbiologie clinique en introduisant une méthode d'identification facile, rapide, haut-débit, peu cher et efficace. Des études récentes ont aussi montré que la spectrométrie de masse MALDI-TOF a le potentiel d'identifier des champignons filamenteux d'origine clinique (Cassagne et al. 2011; Sanguinetti et Posteraro 2014; Ranque et al. 2014; Schulthess et al. 2014). Cette technique a également été utilisée avec succès pour le typage et l'identification au niveau intra-spécifique de certaines bactéries et levures, démontrant que cette technologie peut être utilisée pour des études épidémiologiques et pour la classification taxonomique. L'application de cette technique aux contaminants fongiques des produits alimentaires pour leur identification et typage reste à développer.

En effet, la spectrométrie de masse MALDI-TOF ne peut être un outil fiable d'identification des contaminants alimentaires d'origine fongique que si l'on dispose d'une base de données robuste, représentative de leur diversité. De plus, après avoir été optimisée pour l'identification de microorganismes au niveau du genre et à l'espèce, se pose la question d'une éventuelle utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour permettre, la résolution de complexes d'espèces, voire la discrimination intra-spécifique d'isolats. Enfin, outre leur identification, une autre étape de la maîtrise des contaminants fongiques dans les

aliments transformés passe par l'utilisation de conservateurs ajoutés aux produits, afin d'empêcher leur croissance. Cependant, certaines espèces fongiques peuvent persister dans les denrées alimentaires malgré l'utilisation de ceux-ci, ce qui met en évidence l'existence de résistances à ces molécules. Il est donc nécessaire de comprendre d'où viennent ces résistances et quelles espèces et souches fongiques elles concernent. Pour cela, le suivi de croissance *in vitro* des contaminants en présence de conservateurs permet de sélectionner d'éventuelles souches résistantes afin de les étudier plus en détail pour parvenir à comprendre les mécanismes moléculaires de résistance mis en place. Le suivi de la croissance fongique passe le plus souvent par la mesure du diamètre du thalle en milieu gélosé, qui se fait sur plusieurs jours voire mois, en fonction de la vitesse de croissance de l'espèce ou de la souche étudiée. Ici encore, cette méthode ne permet pas de réaliser un suivi de croissance haut débit des organismes fongiques, c'est pourquoi des alternatives doivent être développées.

Dans ce contexte, le travail de thèse a été divisé en trois parties visant à répondre à ces différents objectifs :

- Tout d'abord, ce travail a consisté à développer, valider et appliquer la méthode de spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification des champignons filamenteux d'intérêt industriel.
- Dans un deuxième temps, l'application de la spectrométrie de masse MALDI-TOF à la résolution de complexes d'espèces ainsi qu'à la discrimination intra-spécifique a été évaluée en prenant comme organismes modèles la section *Flavi* du genre *Aspergillus* et *Penicillium roqueforti*, respectivement.
- Enfin, la résistance de différentes espèces fongiques à 3 conservateurs communément utilisés en industrie (sorbate, benzoate, natamycine) ainsi que la variabilité de cette résistance au niveau intra-spécifique a été étudiée en utilisant la néphélométrie laser comme outil haut-débit pour le suivi de la croissance fongique en présence de conservateurs.

**Chapitre 1 : Développement et application de la spectrométrie de
masse MALDI-TOF pour l'identification des champignons
filamenteux d'altération**

I. Résumé des travaux

Comme évoqué dans l'introduction bibliographique, les champignons forment un groupe très diversifié contenant un très grand nombre d'espèces, estimé à environ 1,5 millions (Hawksworth, 2015). Parmi les champignons, les moisissures (champignons microscopiques filamenteux) ont un impact important sur les activités humaines pouvant être positif ou négatif. Ainsi, certaines espèces fongiques sont utilisées en tant que flore technologique, pour la production d'aliments fermentés mais aussi en biotechnologie pour la production de molécules d'intérêt (enzymes, acides organiques, antibiotiques) (Chalupová et al. 2014). A l'opposé, de nombreuses espèces sont impliquées dans l'altération des denrées alimentaires destinées à l'alimentation humaine ou animale. Du fait de leurs caractéristiques physiologiques (croissance sur une large gamme de pH et activité de l'eau par exemple), les champignons sont susceptibles de croître et d'altérer, par leurs activités métaboliques, une large variété de produits. L'altération de ces produits peut induire des modifications des qualités organoleptiques des aliments tels que des changements d'odeur, de goût et de texture (Filtenborg et al. 1996). Les espèces de champignons filamenteux les plus fréquemment responsables d'altération des aliments appartiennent aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*, tandis que les espèces du genre *Fusarium* sont responsables de dégâts considérables au sein des productions céréalières au champ (Pitt et Hocking 2009). De plus, la production potentielle de mycotoxines par certaines espèces fongiques représente un danger pour la santé humaine et animale (Waśkiewicz 2014). Dans ce contexte, une identification fiable et rapide des moisissures technologiques et d'altération est une étape clé dans la maîtrise de la qualité des produits alimentaires.

L'identification des champignons filamenteux repose majoritairement sur deux types de méthodes : les méthodes phénotypiques et les méthodes génotypiques. Les premières considèrent des caractères phénotypiques macroscopiques et/ou microscopiques, l'aspect du thalle (couleur, texture, présence ou non d'exsudats ou de pigments...). Pour les caractéristiques microscopiques l'organisation des structures conidiogènes et la présence d'organes de la reproduction sexuée est recherchée. Ces observations peuvent être complétées par l'étude de caractères biochimiques comme la production de métabolites secondaires (Houbraken et al. 2007).

Les méthodes génotypiques reposent quant à elles sur des techniques de biologie moléculaire et sont aujourd'hui considérées comme la "référence" en matière d'identification de micro-organismes. Elles sont basées sur l'analyse de régions d'ADN discriminantes qui permettent

de classer les espèces. La région Internal Transcribed Spacer ou ITS (Schoch et al. 2012) utilisée pour discriminer les genres et espèces fongiques est parfois limitante et il est nécessaire de recourir à l'analyse d'autres gènes, par exemple celui codant pour la β -tubuline chez les *Penicillium* spp. (Visagie et al. 2014) ou celui codant pour le facteur d'élongation α chez les *Fusarium* spp. (Geiser et al. 2004).

Ces deux méthodes d'identification présentent des inconvénients, pour les méthodes phénotypiques, elles requièrent du temps de culture car les caractères recherchés peuvent être longs à apparaître, mais surtout un haut niveau d'expertise qui est de plus en plus rare aujourd'hui. Bien que les méthodes moléculaires soient considérées comme la référence grâce à leur niveau de spécificité élevé, elles demandent des étapes parfois lourdes à mettre en place (extraction d'ADN, PCR, séquençage des produits), difficilement automatisables, coûteuses, et l'analyse des séquences demande également une certaine expertise.

C'est pourquoi de nouvelles techniques ont émergé afin de permettre une identification simple, rapide et haut-débit des champignons filamenteux. La spectrométrie de masse MALDI-TOF s'est imposée parmi les méthodes spectrales comme une alternative aux méthodes existantes citées plus haut. Utilisée depuis longtemps en chimie, son utilisation pour l'identification des bactéries à l'espèce a été démontrée il y a près de 20 ans (Basile et al. 1998). Depuis, un nombre croissant de travaux se sont focalisés sur son application à l'identification des champignons filamenteux. Ces publications ont d'abord concerné principalement le domaine clinique (Erhard et al. 2008; Panda et al. 2015), où l'identification fiable et surtout rapide permet un traitement précoce des patients, puis, le domaine industriel, avec l'étude d'espèces fongiques responsables d'altération de produits agro-alimentaires (Rodrigues et al. 2011; Hettick et al. 2008). Enfin, plusieurs études ont été consacrées à la mise en place de bases de données spectrales pour l'identification des champignons (Gautier et al. 2014; Lau et al. 2013; Normand et al. 2013), majoritairement pour des espèces d'intérêt clinique.

Dans ce contexte, l'objectif de notre étude était de développer et d'appliquer la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification des champignons filamenteux d'intérêt alimentaire. Pour cela, une base de données spectrales a été construite. Six-cent dix-huit souches, représentant 136 espèces fongiques, provenant majoritairement de deux collections : l'UBOCC (Collection de Cultures de l'Université de Bretagne Occidentale, France) et l'institut Westerdijkiae pour la diversité fongique (Pays-Bas) ont été utilisées. Elles ont été sélectionnées grâce à une veille scientifique et selon trois critères : leur fréquence d'apparition dans les aliments, le nombre de types d'aliments concernés et leur capacité à

produire des mycotoxines. Ces critères ont permis la sélection de 136 espèces, représentant au mieux la diversité des contaminants fongiques d'altération. Toutes les souches sélectionnées ont été identifiées par des techniques phénotypiques. Pour plus de la moitié (dont au moins une souche par espèce) l'identification a été confirmée par le séquençage et l'analyse phylogénétique d'un ou plusieurs gènes d'intérêt tels que ceux codant pour la β -tubuline ou le facteur d'élongation α . Pour la construction de la base de données, les souches ont été cultivées dans différentes conditions. Quatre milieux gélosés ont été utilisés : le Sabouraud Dextrose Agar (SDA), le Potato Dextrose Agar (PDA), le Malt Extract Agar (MEA) et le Yeast Glucose Chloramphenicol agar (YGC) ainsi que deux temps de culture (2 et 8 jours à 25°C), cela afin d'obtenir des spectres issus de conditions de culture différentes et ainsi disposer d'une base de données la plus robuste possible. Après 2 ou 8 jours d'incubation, une étape d'extraction a précédé l'acquisition des spectres. Cette étape d'extraction à l'acide formique et acétonitrile permet de lyser les cellules fongiques et de solubiliser les protéines. Elle permet aussi d'inactiver les spores, assurant ainsi la sécurité du personnel manipulant les lames et évitant aussi la contamination de l'intérieur de l'instrument. Les extraits ont ensuite été déposés sur une lame et recouverts de matrice HCCA (acide α -cyano-4-hydroxycinnamique) après séchage. Les spectres ont été acquis par un système VITEK-MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), dans une gamme de masse de 2000 à 20000 Da. Chaque extrait a été déposé en duplicat.

Pour construire la base de données, une moyenne de 5 souches par espèce et de 50 spectres par souche ont été utilisés, représentant un total de 6 477 spectres. La base de données a ensuite été implémentée grâce à l'algorithme Advanced Spectra Classifier (ASC) développé par la société bioMérieux. L'évaluation des performances de la base de données a été effectuée par validation croisée : les spectres de la base sont divisés en 5 groupes, 4 de ces groupes sont utilisés pour construire une base de données, et le cinquième groupe sert de groupe test pour estimer les performances d'identification. Enfin, les performances ont également été évaluées grâce à des souches externes. Des spectres ont été acquis pour 73 souches non utilisées pour construire la base de données et dont l'identification avait été validée par séquençage. L'identification correcte ou non de ces spectres par la base de données développée a ensuite été évaluée.

Globalement, aucun effet significatif des conditions de culture n'a été observé pour la majorité des milieux sur les performances d'identification. Cependant, deux cas de figures sont possibles. Dans le premier cas, et pour la plupart des espèces, les spectres issues d'une même souche sont regroupés ensemble, indiquant que l'effet des conditions de culture (temps

d'incubation et milieu) est moins important que celui résultant de la diversité intra-spécifique. Dans le deuxième cas, un léger effet des conditions de culture est observé comme par exemple pour *Penicillium expansum*, pour lequel les spectres sont regroupés en fonction du milieu de culture utilisé, indépendamment des différentes souches, ce qui pourrait être expliqué par le polymorphisme de cette espèce en fonction du milieu de culture. Il est cependant à noter que certains milieux de culture utilisés peuvent avoir un impact sur les performances d'identification. En effet, lors de tests préliminaires, les milieux Dichloran Glycerol (DG18) et Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) ont été évalués et n'ont pas été validés car les spectres obtenus sur ces milieux n'étaient pas de qualité suffisante pour être exploités (nombre de pics trop faible, faible résolution).

L'évaluation des performances par validation croisée a montré une identification correcte de près de 95% des spectres, avec 4% des spectres non identifiées et 1% des spectres incorrectement identifiés. Pour 113 espèces sur les 136 implémentées, plus de 90% de spectres étaient correctement attribués. Les espèces présentant les scores les plus faibles étaient confondues avec d'autres espèces phylogénétiquement proches, comme par exemple *Aspergillus foetidus* confondu avec *A. lacticoffeatus*, les deux espèces étant considérées comme des synonymes d'*A. niger* par certains auteurs (Varga et al. 2011). Au contraire, d'autres espèces proches ont été parfaitement différenciées, comme les 7 espèces du complexe *Cladosporium sphaerospermum*. Lors de la validation externe, près de 90% des spectres ont été correctement identifiés pour les espèces représentées dans la base de données, 4% des spectres n'ont pas été identifiés, et 6% des spectres ont été incorrectement identifiés. Dans ce dernier cas, les erreurs d'identification ont été observés au sein d'un même genre fongique et parfois pour des espèces très proches voire synonymes (par exemple, *Penicillium commune* identifié en *P. camemberti*). Pour les spectres des espèces non représentées dans la base de données, 71% n'ont pas été identifiés (ce qui était le résultat attendu puisque ces espèces ne sont pas référencées dans la base), et les 29% restant ont été incorrectement identifiés. Comme dans le cas précédent, tous les spectres mal identifiés l'ont été entre espèces du même genre.

Les résultats de validation externe obtenus lors de cette étude sont similaires voire supérieurs à ceux obtenus par d'autres équipes ayant développé des bases de données spectrales (Lau et al. 2013; Gautier et al. 2014; Becker et al. 2015). En conclusion, cette étude souligne le potentiel de la spectrométrie de masse MALDI-TOF comme outil fiable, rapide et haut débit pour l'identification des champignons filamenteux d'intérêt industriel alimentaire.

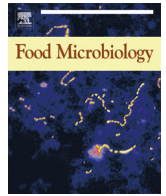
II. Article publié dans *Food Microbiology*

Quéro L., Girard V., Pawtowski A., Tréguer S., Weill A., Arend S., Cellière B., Polsinelli S., Monnin V., Van Belkum A., Vasseur V., Nodet P., Mounier J., 2018. Development and application of MALDI-TOF MS for identification of food spoilage fungi. *Food Microbiology*, doi: 10.1016/j.fm.2018.05.001



Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

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

Development and application of MALDI-TOF MS for identification of food spoilage fungi

Laura Quéro ^{a, b}, Victoria Girard ^b, Audrey Pawtowski ^a, Sylvie Tréguer ^a, Amélie Weill ^{a, c}, Sandrine Arend ^b, Béatrice Cellière ^b, Sophie Polsinelli ^b, Valérie Monnin ^b, Alex van Belkum ^b, Valérie Vasseur ^a, Patrice Nodet ^a, Jérôme Mounier ^{a, *}

^a Université de Brest, EA 3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, IBSAM, ESIAB, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

^b BioMérieux, R&D Microbiologie, Route de Port Michaud, 38390 La Balme les Grottes, France

^c Université de Bretagne Occidentale Culture Collection, Université de Brest, ESIAB, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 December 2017

Received in revised form

30 March 2018

Accepted 1 May 2018

Available online xxx

Keywords:

MALDI-TOF MS

Identification

Filamentous fungi

Food spoilage

ABSTRACT

Filamentous fungi are frequently involved in food spoilage and cause important food losses and substantial economic damage. Their rapid and accurate identification is a key step to better manage food safety and quality. In recent years, MALDI-TOF MS has emerged as a powerful tool to identify microorganisms and has successfully been applied to the identification of filamentous fungi especially in the clinical context. The aim of this study was to implement a spectral database representative of food spoilage molds. To this end, after application of a standardized extraction protocol, 6477 spectra were acquired from 618 fungal strains belonging to 136 species and integrated in the VITEK MS database. The performances of this database were then evaluated by cross-validation and ~95% of correct identification to the species level was achieved, independently of the cultivation medium and incubation time. The database was also challenged with external isolates belonging to 52 species claimed in the database and 90% were correctly identified to the species level. To our best knowledge, this is the most comprehensive database of food-relevant filamentous fungi developed to date. This study demonstrates that MALDI-TOF MS could be an alternative to conventional techniques for the rapid and reliable identification of spoilage fungi in food and industrial environments.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Fungi are ecologically, physiologically and morphologically diverse and constitute one of the largest group of organisms on earth with at least 1.5 million and more probably, close to 3 million species (Hawksworth, 2015). Among fungi, microscopic filamentous fungi (also called molds) have an important impact on human

activities, either positive or negative. On one hand, they are important producers of enzymes, organic acids and antibiotics and can be used to manufacture fermented foods (Chalupová et al., 2014). On the other hand, they are able to spoil a large variety of food and feed commodities, from raw materials to finished products. Their growth can lead to several types of product-alteration such as taste and odor problems and decay. *Penicillium* and *Aspergillus* spp. are the most common spoilage fungi, whereas *Fusarium* species are mostly responsible for significant yield losses of small grain cereals and maize (Pitt and Hocking, 2009). Certain members of these genera as well as species from other genera can also potentially produce mycotoxins (Waśkiewicz, 2014), some of which have adverse effects on human and animal health and can thus render food and feed improper for consumption. Regarding their impact on human activities, it has been estimated that 5–10% of the worldwide food losses is due to fungal spoilage (Filtenborg et al., 1996). In this context, correct identification of food spoilage fungi

* Corresponding author. Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, Parvis Blaise-Pascal, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France.

E-mail addresses: laura.quero@biomerieux.com (L. Quéro), victoria.girard@biomerieux.com (V. Girard), audrey.pawtowski@univ-brest.fr (A. Pawtowski), sylvie.treguer@univ-brest.fr (S. Tréguer), amelie.weill@univ-brest.fr (A. Weill), sandrine.arend@biomerieux.com (S. Arend), beatrice.celliere@biomerieux.com (B. Cellière), sophie.polsinelli@biomerieux.com (S. Polsinelli), valerie.monnin@biomerieux.com (V. Monnin), alex.vanbelkum@biomerieux.com (A. van Belkum), valerie.vasseur@univ-brest.fr (V. Vasseur), patrice.nodet@univ-brest.fr (P. Nodet), jerome.mounier@univ-brest.fr (J. Mounier).

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.05.001>

0740-0020/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

is a key step to better manage food safety and quality. An erroneous identification could lead to risk under-estimation or unnecessary counter measures (Hawksworth, 2015; Schnürer and Magnusson, 2005). It is also worth mentioning that many spoilage filamentous fungi are also opportunistic human pathogens and their identification at the species-level could also be of interest in the clinical context.

Identification of fungal isolates is based on phenotypic and/or genotypic methods. Phenotypic identification generally involves the examination of different morphological features at both macroscopic and microscopic levels, such as the thallus aspect or that of asexual spore-bearing structures, after a cultivation step on agar medium. Biochemical characteristics such as secondary metabolite production can also be used as a complementary approach (Houbraken et al., 2007). Genotypic methods based on molecular biology are considered the gold-standard for mold identification because of their high specificity. Indeed, comparative sequence analysis of conserved genes but also of unique DNA regions allows establishing the identity and phylogeny among organisms. For example, the internal transcribed spacer (ITS) region in ribosomal operons is considered as the primary barcode for fungi (Schoch et al., 2012). However, in some groups, other genes are superior to ITS for species-level identification such as the β -tubulin gene for *Penicillium* spp. (Visagie et al., 2014) and elongation-factor gene for *Fusarium* spp. (Geiser et al., 2004). Moreover, single-locus approaches are not always sufficient for accurate identification at the species-level. Although DNA sequencing allows good identification, it can be costly, fastidious and it always requires expertise (Chalupová et al., 2014). Thus, there is a continuous need for more rapid techniques to identify filamentous fungi, which are as reliable as molecular tools.

In recent years, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) has emerged as an alternative for or supplement to conventional phenotypic and molecular identification tools. Since then, the efficacy of MALDI-TOF MS for bacterial species identification has been demonstrated in an exponentially growing number of publications, mainly focusing on clinically relevant species (Basile et al., 1998; Fournier et al., 2012; Nacef et al., 2017; Nagy et al., 2009; van Baar, 2000; van Wuijckhuijse et al., 2005).

Over the last fifteen years, MALDI-TOF MS has also been successfully applied to filamentous fungi identification. The main difference is that unlike most bacteria, fungal mycelium, fructification organs and spores can have a thick cell wall thus an extraction step is often required before spectra acquisition (Cassagne et al., 2011). After Welham et al. (2000) who applied MALDI-TOF MS for fungal identification for the first time, several studies showed that this method could be adapted for the identification of various fungal groups including *Penicillium*, *Aspergillus* and *Fusarium* spp. For instance, Chen and Chen (2005) analyzed intact spores of *Penicillium* spp. while Hettick et al. (2008) could successfully identify 12 *Penicillium* spp. with an extraction step before analysis. Marinach-Patrice et al. (2009) were able to correctly identify 92% of *Fusarium* spp. belonging to 9 different species, and Rodrigues et al. (2011) applied MALDI-TOF MS on species from the *Aspergillus* section *Flavi*. Finally, a recent study of Rychert et al. (2017) demonstrated the accuracy of MALDI-TOF MS by successfully identifying 91% of ~1400 clinical fungal isolates. Even though these results were promising, they were obtained using different protocols (either using intact spores or after an extraction step). In addition, except for the study of Rychert et al. (2017) which was devoted to clinically relevant fungal species, all studies cited above focused on a single genus and/or a limited number of species.

Many studies and reviews have dealt with MALDI-TOF MS microbial identification in clinical contexts (Ge et al., 2016; van

Belkum et al., 2015, 2017) and today, this technique is routinely used for bacterial identification. Despite the increasing number of publications dealing with spectral database implementation for clinically relevant fungal species (Gautier et al., 2014; Lau et al., 2013; Normand et al., 2017), a real effort is still needed to construct robust database for routine identification of food borne filamentous fungi with the use of standardized protocols (Sanguinetti and Posteraro, 2017). Therefore, the aim of this work was to implement a database for food spoilage fungi identification with 618 strains representing 136 species using a standardized extraction protocol.

2. Material and methods

2.1. Fungal strains and cultivation

2.1.1. Fungal strains used for database construction

A total of 618 strains corresponding to 34 genera and 136 species (Table 1), representing major mold species encountered in food and feed, were obtained from the Université de Bretagne Occidentale Culture Collection (UBOCC, Plouzané, France) and the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (Utrecht, The Netherlands). These species were selected based on scientific watch (Chen et al., 2017; Garnier et al., 2017; Perrone et al., 2007; Pitt and Hocking, 2009; Santos et al., 2016) and three main criteria e.g., frequency of occurrence in food, number of spoiled food types and ability to produce mycotoxins. All strains were identified at the species-level by morphological analysis based on macroscopic and microscopic features. In addition, when possible, at least one strain per species included in the database had also been identified by DNA sequencing with 479 out of 618 strains identity confirmed by sequencing of one or more regions (ITS region, partial β -tubulin gene, partial translation elongation factor-1 alpha gene, partial *mcm7* and *tsr1* genes).

All strains were sub-cultivated on appropriate solid culture media to assess viability and purity before they were used for spectrum acquisition. Then, they were cultivated at 25 °C for 2 and 8 days on four different media: Sabouraud Dextrose Agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), Potato Dextrose Agar (PDA), Malt Extract Agar (MEA) and Yeast Glucose Chloramphenicol agar (YGC). For the last three media, three suppliers were used, e.g., bioMérieux (Marcy l'Etoile, France), Becton Dickinson (Le Pont de Claix, France) and Oxoid (Dardilly, France). Different media and suppliers were chosen in order to represent the diversity of media used in industrial mycology and generate a database as robust as possible.

2.1.2. Fungal strains used for external database validation

For external database validation, 73 well characterized strains obtained from the “Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne” or UBOCC were used. These strains belonged to 67 different species (Table 2). Fifty-two species were represented in the database while 15 species were absent from it. None of the strains used for external validation were used to build the database. Each strain was cultivated under two different conditions. For each condition, an incubation time varying between 2 and 8 days and a cultivation medium, among all media and suppliers cited above, was randomly chosen.

2.2. Sample preparation

After cultivation, isolates were processed following the manufacturer's instructions. Hyphae and/or conidia were collected from the surface of agar plates (approximately 1 cm in diameter) with a moisturized sterile cotton swab (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). The biomass was then transferred into 900 μ L of 70%

Table 1
Selected species and strain numbers for each species used to build the database.

Species	Strain number*
<i>Actinomyces elegans</i>	<u>CBS 111556</u> , <u>UBOCC-A-101334</u> , <u>UBOCC-A-106035</u> , <u>UBOCC-A-101333</u>
<i>Alternaria alternata</i>	<u>CBS 916.96</u> , <u>CBS 117587</u> , <u>CBS 116329</u> , <u>CBS 115152</u> , <u>CBS 117143</u>
<i>Aspergillus arachidicola</i>	<u>CBS 117610</u> , <u>CBS 117612</u> , <u>CBS 117611</u> , <u>CBS 117614</u> , <u>CBS 117615</u>
<i>Aspergillus calidoustus</i>	<u>UBOCC-A-101086</u> , <u>CBS 113228</u> , <u>CBS 112452</u> , <u>CBS 114380</u> , <u>CBS 121601</u>
<i>Aspergillus candidus</i>	<u>CBS 566.65</u> , <u>CBS 114385</u>
<i>Aspergillus carbonarius</i>	<u>UBOCC-A-105002</u> , <u>UBOCC-A-105005</u> , <u>UBOCC-A-105008</u> , <u>CBS 113.80</u> , <u>CBS 111.26</u>
<i>Aspergillus chevalieri</i>	<u>UBOCC-A-112066</u> , <u>UBOCC-A-112181</u> , <u>CBS 129.54</u> , <u>CBS 522.65</u> , <u>CBS 121704</u>
<i>Aspergillus fennelliae</i>	<u>CBS 584.90</u>
<i>Aspergillus flavus</i>	<u>UBOCC-A-106028</u> , <u>UBOCC-A-106032</u> , <u>UBOCC-A-106029</u> , <u>UBOCC-A-108068</u> , <u>UBOCC-A-106031</u> , <u>UBOCC-A-101061</u> , <u>UBOCC-A-106030</u> , <u>UBOCC-A-106033</u> , <u>UBOCC-A-101063</u> , <u>CBS 100927</u>
<i>Aspergillus foetidus</i>	<u>CBS 114.49</u> , <u>CBS 139.48</u> , <u>CBS 119383</u> , <u>CBS 121.28</u> , <u>CBS 122587</u>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<u>UBOCC-A-106001</u> , <u>UBOCC-A-114029</u> , <u>UBOCC-101066</u> , <u>UBOCC-A-106018</u> , <u>UBOCC-A-110089</u>
<i>Aspergillus glaucus</i>	<u>UBOCC-A-108077</u> , <u>CBS 117337</u> , <u>CBS 150.92</u>
<i>Aspergillus intermedius</i>	<u>CBS 117329</u> , <u>CBS 523.65</u> , <u>CBS 108.55</u> , <u>CBS 116.62</u> , <u>CBS 117315</u>
<i>Aspergillus lacticoffeatus</i>	<u>CBS 101884</u> , <u>CBS 101885</u> , <u>CBS 101886</u>
<i>Aspergillus misclerotigenes</i>	<u>CBS 117635</u> , <u>CBS 117633</u> , <u>CBS 117634</u> , <u>CBS 117620</u> , <u>CBS 117639</u>
<i>Aspergillus montevicensis</i>	<u>CBS 117323</u> , <u>CBS 817.96</u> , <u>CBS 119376</u> , <u>CBS 289.95</u> , <u>CBS 518.65</u>
<i>Aspergillus nidulans</i>	<u>UBOCC-A-110152</u> , <u>UBOCC-A-101069</u> , <u>CBS 126972</u>
<i>Aspergillus niger</i>	<u>UBOCC-A-112064</u> , <u>UBOCC-101073</u> , <u>UBOCC-112080</u> , <u>UBOCC-A-112082</u> , <u>UBOCC-A-101075</u> , <u>UBOCC-A-101076</u> , <u>UBOCC-A-101072</u> , <u>UBOCC-112268</u> , <u>UBOCC-A-101074</u> , <u>CBS 554.65</u>
<i>Aspergillus novoparasiticus</i>	<u>CBS 126849</u> , <u>CBS 126850</u>
<i>Aspergillus ochraceus</i>	<u>UBOCC-A-111102</u> , <u>UBOCC-A-105011</u> , <u>CBS 547.65</u> , <u>CBS 588.68</u> , <u>CBS 108.08</u>
<i>Aspergillus parasiticus</i>	<u>UBOCC-A-111039</u> , <u>UBOCC-A-111041</u> , <u>UBOCC-A-111038</u> , <u>CBS 100926</u> , <u>CBS 100939</u>
<i>Aspergillus penicilloides</i>	<u>CBS 540.65</u>
<i>Aspergillus proliferans</i>	<u>UBOCC-A-101081</u> , <u>CBS 121.45</u> , <u>CBS 115.46</u>
<i>Aspergillus pseudoglaucus</i>	<u>UBOCC-A-112083</u> , <u>UBOCC-A-112117</u> , <u>UBOCC-A-112075</u> , <u>CBS 123574</u> , <u>CBS 117314</u>
<i>Aspergillus restrictus</i>	<u>CBS 541.65</u>
<i>Aspergillus ruber</i>	<u>CBS 135680</u> , <u>CBS 530.65</u> , <u>CBS 137.61</u> , <u>CBS 104.18</u>
<i>Aspergillus sydowii</i>	<u>UBOCC-A-108052</u> , <u>UBOCC-A-108050</u> , <u>UBOCC-A-110137</u> , <u>UBOCC-A-108053</u>
<i>Aspergillus tamarii</i>	<u>UBOCC-A-111046</u> , <u>UBOCC-A-111043</u> , <u>UBOCC-A-111045</u> , <u>CBS 129.49</u> , <u>CBS 104.14</u> , <u>CBS 104.13</u> , <u>CBS 590.68</u>
<i>Aspergillus terreus</i>	<u>UBOCC-A-101084</u> , <u>UBOCC-A-114003</u> , <u>CBS 116878</u> , <u>CBS 601.65</u> , <u>CBS 116757</u>
<i>Aspergillus thermomutatus</i>	<u>UBOCC-A-101204</u> , <u>CBS 208.92</u> , <u>CBS 100504</u> , <u>CBS 110899</u> , <u>CBS 117074</u>
<i>Aspergillus tubingensis</i>	<u>CBS 116417</u> , <u>CBS 115.29</u> , <u>CBS 626.66</u> , <u>CBS 134.48</u> , <u>CBS 117765</u>
<i>Aspergillus versicolor</i>	<u>UBOCC-A-111047</u> , <u>UBOCC-101087</u> , <u>UBOCC-102012</u> , <u>UBOCC-A-101088</u>
<i>Aspergillus wentii</i>	<u>UBOCC-A-111049</u> , <u>UBOCC-A-111051</u> , <u>UBOCC-A-101090</u> , <u>CBS 229.67</u> , <u>CBS 127.28</u>
<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	<u>UBOCC-A-101078</u> , <u>UBOCC-A-105012</u> , <u>UBOCC-A-105006</u> , <u>CBS 121983</u> , <u>CBS 112803</u>
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<u>UBOCC-A-101092</u> , <u>UBOCC-A-108056</u> , <u>UBOCC-A-108057</u> , <u>UBOCC-A-101091</u>
<i>Botrytis cinerea</i>	<u>UBOCC-A-101098</u> , <u>UBOCC-A-101099</u> , <u>CBS 810.69</u>
<i>Chaetomium globosum</i>	<u>UBOCC-A-101012</u> , <u>CBS 148.60</u> , <u>CBS 148.51</u> , <u>CBS 107.14</u>
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<u>UBOCC-A-112148</u> , <u>UBOCC-A-101114</u> , <u>UBOCC-A-101109</u> , <u>UBOCC-A-111114</u> , <u>UBOCC-A-111115</u> , <u>UBOCC-A-101108</u>
<i>Cladosporium dominicanum</i>	<u>UBOCC-A-113071</u> , <u>UBOCC-A-113069</u> , <u>UBOCC-A-113070</u> , <u>CBS 119145</u>
<i>Cladosporium fusiforme</i>	<u>UBOCC-A-113072</u> , <u>CBS 119414</u>
<i>Cladosporium halotolerans</i>	<u>UBOCC-A-113073</u> , <u>UBOCC-A-113075</u> , <u>UBOCC-A-113074</u> , <u>CBS 139586</u> , <u>CBS 119416</u>
<i>Cladosporium herbarum</i>	<u>UBOCC-A-108074</u> , <u>UBOCC-A-101112</u> , <u>CBS 673.69</u>
<i>Cladosporium langeronii</i>	<u>UBOCC-A-112121</u> , <u>UBOCC-A-112132</u> , <u>UBOCC-A-112084</u> , <u>CBS 123171</u> , <u>CBS 601.84</u>
<i>Cladosporium oxysporum</i>	<u>CBS 125991</u> , <u>CBS 120813</u>
<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	<u>UBOCC-A-113077</u> , <u>UBOCC-A-113078</u> , <u>CBS 119412</u>
<i>Cladosporium ramotenellum</i>	<u>UBOCC-A-108073</u> , <u>UBOCC-A-108072</u> , <u>CBS 109501</u> , <u>CBS 118.24</u> , <u>CBS 109031</u>
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	<u>UBOCC-A-112116</u> , <u>UBOCC-A-108054</u> , <u>UBOCC-A-101110</u> , <u>UBOCC-A-101111</u>
<i>Cladosporium velox</i>	<u>UBOCC-A-113082</u> , <u>UBOCC-A-113081</u> , <u>CBS 119417</u>
<i>Didymella glomerata</i>	<u>UBOCC-A-109091</u> , <u>CBS 834.84</u> , <u>CBS 133.72</u> , <u>CBS 304.49</u> , <u>CBS 134109</u>
<i>Didymella pinodella</i>	<u>CBS 318.90</u> , <u>CBS 531.66</u> , <u>CBS 133.92</u> , <u>CBS 123522</u> , <u>CBS 403.65</u>
<i>Epicoccum nigrum</i>	<u>UBOCC-A-113084</u> , <u>UBOCC-A-101131</u>
<i>Fusarium acuminatum</i>	<u>UBOCC-A-109036</u> , <u>UBOCC-A-109086</u> , <u>CBS 102796</u> , <u>CBS 140913</u> , <u>CBS 680.74</u>
<i>Fusarium arthrosporioides</i>	<u>UBOCC-A-109001</u> , <u>UBOCC-A-109049</u> , <u>UBOCC-A-109034</u>
<i>Fusarium avenaceum</i>	<u>UBOCC-A-109018</u> , <u>UBOCC-A-101136</u> , <u>UBOCC-A-109048</u> , <u>UBOCC-A-109141</u> , <u>UBOCC-A-109012</u> , <u>CBS 408.86</u>
<i>Fusarium cerealis</i>	<u>CBS 195.80</u> , <u>CBS 832.85</u> , <u>CBS 589.93</u>
<i>Fusarium culmorum</i>	<u>UBOCC-A-107001</u> , <u>UBOCC-A-109110</u> , <u>UBOCC-A-109108</u> , <u>UBOCC-A-109123</u> , <u>UBOCC-A-101139</u>
<i>Fusarium domesticum</i>	<u>UBOCC-A-109095</u> , <u>UBOCC-A-113010</u> , <u>CBS 244.82</u>
<i>Fusarium equiseti</i>	<u>UBOCC-A-109041</u> , <u>UBOCC-A-109029</u> , <u>UBOCC-A-109045</u> , <u>UBOCC-A-109030</u> , <u>UBOCC-A-109097</u> , <u>UBOCC-A-109016</u>
<i>Fusarium graminearum</i>	<u>UBOCC-A-109032</u> , <u>UBOCC-A-109011</u> , <u>UBOCC-A-109106</u> , <u>UBOCC-A-109026</u> , <u>UBOCC-A-109130</u> , <u>UBOCC-A-101143</u>
<i>Fusarium incarnatum</i>	<u>UBOCC-A-111066</u> , <u>CBS 163.57</u> , <u>CBS 161.25</u> , <u>CBS 791.70</u>
<i>Fusarium langsethiae</i>	<u>UBOCC-A-110061</u> , <u>UBOCC-A-110063</u> , <u>UBOCC-A-110062</u> , <u>UBOCC-A-109148</u> , <u>CBS 113234</u>
<i>Fusarium lateritium</i>	<u>UBOCC-A-102014</u> , <u>UBOCC-A-101146</u> , <u>UBOCC-A-101147</u>
<i>Fusarium oxysporum</i>	<u>UBOCC-A-108128</u> , <u>UBOCC-A-109131</u> , <u>UBOCC-A-101157</u> , <u>UBOCC-A-109009</u> , <u>CBS 221.49</u>

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Species	Strain number*
<i>Fusarium poae</i>	UBOCC-A-109111 , UBOCC-A-109135 , UBOCC-A-109113 , UBOCC-A-109136 , UBOCC-A-109021
<i>Fusarium proliferatum</i>	UBOCC-A-109147 , UBOCC-A-109134 , UBOCC-A-109028 , UBOCC-A-109133
<i>Fusarium sambucinum</i>	UBOCC-A-109024 , UBOCC-A-109020 , UBOCC-A-109027 , UBOCC-A-109019
<i>Fusarium solani</i>	UBOCC-A-109146 , UBOCC-A-110136 , UBOCC-A-114086 , CBS 181.29
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	UBOCC-A-109116 , UBOCC-A-109114 , UBOCC-A-109132 , UBOCC-A-109115 , UBOCC-A-102015
<i>Fusarium subglutinans</i>	UBOCC-A-111070 , UBOCC-A-109087 , CBS 119831 , CBS 747.97 , CBS 215.76
<i>Fusarium temperatum</i>	UBOCC-A-109150 , UBOCC-A-109151 , UBOCC-A-101148 , CBS 138287
<i>Fusarium tricinctum</i>	CBS 119842 , CBS 253.50 , CBS 119841 , CBS 393.93 , CBS 410.86
<i>Fusarium venenatum</i>	UBOCC-A-109013 , UBOCC-A-109003 , CBS 148.95 , CBS 140949 , CBS 127.95
<i>Fusarium verticillioides</i>	UBOCC-A-109145 , UBOCC-A-109122 , UBOCC-A-109118 , UBOCC-A-109121 , CBS 218.76 , CBS 447.95
<i>Geotrichum candidum</i>	UBOCC-A-101172 , UBOCC-A-101173 , UBOCC-A-108081 , UBOCC-A-101169 , CBS 615.84
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CBS 110495 , CBS 112874 , CBS 124.13 , CBS 118843
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	UBOCC-A-102023 , UBOCC-A-101328
<i>Macrophomina phaseolina</i>	CBS 460.70 , CBS 121.82 , CBS 162.25 , CBS 227.33 , CBS 416.62
<i>Microdochium majus</i>	CBS 121295
<i>Microdochium nivale</i>	UBOCC-A-105026 , UBOCC-A-105027
<i>Mucor circinelloides</i>	UBOCC-A-109188 , UBOCC-A-109183 , UBOCC-A-109192 , UBOCC-A-109182
<i>Mucor fragilis</i>	UBOCC-A-109071 , UBOCC-A-101356 , UBOCC-A-109199
<i>Mucor hiemalis</i>	UBOCC-A-101360 , UBOCC-A-101359 , UBOCC-A-109059
<i>Mucor lanceolatus</i>	UBOCC-A-109074 , UBOCC-A-101355 , UBOCC-A-109158 , UBOCC-A-109153 , UBOCC-A-101148 , UBOCC-A-101329
<i>Mucor plumbeus</i>	UBOCC-A-102004 , UBOCC-A-103032 , UBOCC-A-109053 , UBOCC-A-108086 , UBOCC-A-109152 , UBOCC-A-109061 , UBOCC-A-101363 , UBOCC-A-109052 , CBS 129.41
<i>Mucor racemosus</i>	UBOCC-A-109155 , UBOCC-A-109186 , UBOCC-A-109162 , UBOCC-A-109213 , UBOCC-A-109212 , UBOCC-A-109159 , UBOCC-A-101352 , UBOCC-A-109177 , CBS 113.08 , CBS 260.68
<i>Paecilomyces divaricatus</i>	CBS 113956 , CBS 131275 , CBS 110429 , CBS 113955
<i>Paecilomyces formosus</i>	CBS 990.73B , CBS 628.66 , CBS 296.93 , CBS 113248 , CBS 121584
<i>Paecilomyces fulvus</i>	UBOCC-A-101005 , CBS 135.62 , CBS 113245 , CBS 146.48 , CBS 132.33
<i>Paecilomyces saturatus</i>	UBOCC-A-101210 , CBS 251.55 , CBS 492.84 , CBS 990.73A
<i>Paecilomyces variotii</i>	UBOCC-A-106027 , UBOCC-A-112156 , UBOCC-A-103044 , UBOCC-A-110151 , CBS 101032
<i>Penicillium adametzioides</i>	CBS 140499 , CBS 313.59
<i>Penicillium antarcticum</i>	CBS 100492 , CBS 116938 , CBS 121927 , CBS 100491 , CBS 116939
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	UBOCC-A-110001 , UBOCC-A-101384 , UBOCC-A-111185 , UBOCC-A-111184 , UBOCC-A-101385
<i>Penicillium bialowiezense</i>	CBS 227.28 , CBS 116044 , CBS 110104 , CBS 110102 , CBS 118865
<i>Penicillium brevicompactum</i>	UBOCC-A-108094 , UBOCC-A-110065 , UBOCC-A-101389 , UBOCC-A-110008 , UBOCC-A-108095 , UBOCC-A-110007 , UBOCC-A-108093 , UBOCC-A-101383 , UBOCC-A-111022
<i>Penicillium camemberti</i>	UBOCC-A-102018 , UBOCC-A-112058 , UBOCC-A-113026 , UBOCC-A-113011 , UBOCC-A-108097 , UBOCC-A-101455 , UBOCC-A-101392 , UBOCC-A-113060 , UBOCC-A-108125 , CBS 299.48
<i>Penicillium carneum</i>	UBOCC-A-111171 , CBS 112489 , CBS 468.95 , CBS 466.95
<i>Penicillium chermesinum</i>	UBOCC-A-111054 , UBOCC-A-112184 , UBOCC-A-112188
<i>Penicillium chrysogenum</i>	UBOCC-A-110067 , UBOCC-A-114030 , UBOCC-A-106024 , CBS 111214 , CBS 478.84
<i>Penicillium citreonigrum</i>	UBOCC-A-113039 , UBOCC-A-111242 , UBOCC-A-112169 , UBOCC-A-110143
<i>Penicillium citrinum</i>	UBOCC-A-111025 , UBOCC-A-111010 , UBOCC-A-111159 , CBS 309.48 , CBS 252.55
<i>Penicillium commune</i>	UBOCC-A-108098 , UBOCC-A-111014 , CBS 311.48 , CBS 115505 , CBS 343.51
<i>Penicillium corylophilum</i>	UBOCC-A-109224 , UBOCC-A-109219 , UBOCC-A-112193 , UBOCC-A-109222 , UBOCC-A-101405
<i>Penicillium crustosum</i>	UBOCC-A-101407 , UBOCC-A-110068 , UBOCC-A-112189 , UBOCC-A-111011 , UBOCC-A-108101 , UBOCC-A-108100 , CBS 115503
<i>Penicillium decumbens</i>	UBOCC-A-112118 , UBOCC-A-112067 , UBOCC-A-113037 , UBOCC-A-112072 , UBOCC-A-111240
<i>Penicillium dierckxii</i>	UBOCC-A-111013 , CBS 304.48 , CBS 172.44 , CBS 229.81
<i>Penicillium digitatum</i>	UBOCC-A-111019 , UBOCC-A-111064 , UBOCC-A-111032 , UBOCC-A-111015 , UBOCC-A-101408
<i>Penicillium discolor</i>	CBS 474.84 , CBS 969.97 , CBS 551.95 , CBS 547.95 , CBS 112568
<i>Penicillium fuscum</i>	UBOCC-A-101452 , UBOCC-A-101410 , UBOCC-A-110032 , UBOCC-A-110028 , UBOCC-A-110023 , UBOCC-A-110030 , UBOCC-A-110034 , UBOCC-A-101406 , UBOCC-A-110024 , CBS 325.48
<i>Penicillium fuscoglaucum</i>	UBOCC-A-108104 , UBOCC-A-108129 , UBOCC-A-108127
<i>Penicillium glabrum</i>	UBOCC-A-108114 , UBOCC-A-108105 , UBOCC-A-109089 , UBOCC-A-109098 , UBOCC-A-108107
<i>Penicillium italicum</i>	UBOCC-A-112151 , UBOCC-A-110043 , UBOCC-A-111228 , UBOCC-A-101426 , UBOCC-A-110044
<i>Penicillium nalgiovense</i>	UBOCC-A-112103 , UBOCC-A-112101 , UBOCC-A-113013 , UBOCC-A-101430 , UBOCC-A-101431
<i>Penicillium nordicum</i>	UBOCC-A-112105 , UBOCC-A-112106 , CBS 483.84 , CBS 110770 , CBS 323.92
<i>Penicillium oxalicum</i>	UBOCC-A-101438 , UBOCC-A-102021 , UBOCC-A-101437 , UBOCC-A-111029 , UBOCC-A-101436 , UBOCC-A-101435
<i>Penicillium palitans</i>	UBOCC-A-112147 , UBOCC-A-113024 , UBOCC-A-113023 , UBOCC-A-101387 , CBS 311.48
<i>Penicillium paneum</i>	UBOCC-A-101450 , UBOCC-A-109218 , UBOCC-A-111183 , UBOCC-A-101448 , CBS 303.97
<i>Penicillium polonicum</i>	UBOCC-A-102002 , UBOCC-A-101429 , CBS 116689 , CBS 222.28 , CBS 112650
<i>Penicillium roqueforti</i>	UBOCC-A-111170 , UBOCC-A-111188 , UBOCC-A-111192 , UBOCC-A-111191 , UBOCC-A-111211 , UBOCC-A-111033 , UBOCC-A-111194 , UBOCC-A-109090 , UBOCC-A-111187 , CBS 221.30
<i>Penicillium salamii</i>	CBS 135391 , CBS 135392 , CBS 135395 , CBS 135393 , CBS 135396
<i>Penicillium simplicissimum</i>	UBOCC-A-101427 , UBOCC-A-111189 , UBOCC-A-101428
<i>Penicillium solitum</i>	UBOCC-A-113015 , UBOCC-A-108113 , UBOCC-A-113038 , UBOCC-A-111055 , CBS 141.86
<i>Penicillium verrucosum</i>	UBOCC-A-105007 , UBOCC-A-109221 , UBOCC-A-105014 , UBOCC-A-105004 , CBS 115508
<i>Penicillium viridicatum</i>	UBOCC-A-111198 , UBOCC-A-111200 , UBOCC-A-111199 , UBOCC-A-111201 , UBOCC-A-108115
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	UBOCC-A-108030 , UBOCC-A-108014 , UBOCC-A-108027 , UBOCC-A-111264 , UBOCC-A-101208
<i>Rhizopus oryzae</i>	UBOCC-A-101372 , CBS 146.90 , CBS 278.38 , 515.94 , CBS 127.08
<i>Rhizopus stolonifer</i>	UBOCC-A-108116 , CBS 382.52 , CBS 819.96 , CBS 109.76
<i>Scopulariopsis fusca</i>	UBOCC-A-108120 , UBOCC-A-101272 , UBOCC-A-108119 , UBOCC-A-101271 , UBOCC-A-113016
<i>Talaromyces bacillisporus</i>	UBOCC-A-101035 , CBS 296.48 , CBS 116927 , CBS 110774 , CBS 158.67
<i>Talaromyces macrosporus</i>	CBS 317.63 , CBS 118884 , CBS 130.89

Table 1 (continued)

Species	Strain number*
<i>Trichoderma harzianum</i>	UBOCC-A-112175, <u>CBS 226.95</u>
<i>Trichoderma viride</i>	UBOCC-A-111251, UBOCC-A-111252, <u>UBOCC-A-101292</u>
<i>Trichothecium roseum</i>	<u>UBOCC-A-101293</u> , <u>CBS 281.28</u> , <u>CBS 566.50</u>
<i>Umbelopsis isabellina</i>	<u>CBS 208.32</u> , <u>CBS 100559</u> , <u>CBS 560.63</u>
<i>Wallemia sebi</i>	<u>UBOCC-A-110069</u> , UBOCC-A-112060, <u>UBOCC-A-101324</u> , <u>CBS 818.96</u> , <u>CBS 184.28</u>

*UBOCC, Université de Bretagne Occidentale Culture Collection; CBS, Centraalbrueau voor Schimmelcultures Collection; Underlined strain number indicates that strain identification was confirmed by DNA-sequencing.

ethanol (Carlo Erba, Val de Reuil, France) in a microcentrifuge tube, vortexed for 5 s and then centrifuged at $14,000 \times g$ for 2 min. Supernatant was discarded and the pellet was suspended into 40 μ L of 70% formic acid (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France), followed by vortexing for 5 s after addition of 40 μ L of acetonitrile (Carlo Erba, Val de Reuil, France). Prior to MALDI-TOF MS analysis, all samples were centrifuged again at $14,000 \times g$ for 2 min.

2.3. Spectra acquisition

One microliter of the obtained suspension was deposited on the target slide and allowed to dry, in duplicate for each sample. Then, 1 μ L of α -cyano-hydroxycinnamic acid matrix solution (CHCA; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) was added to each spot and allowed to dry for 15 min. Spectra were acquired using the VITEK MS system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) equipped with the Launchpad V2.8.4 acquisition software. All spectra were acquired in linear positive ion extraction mode in a mass range from 2000 to 20,000 Da. Individual spectra were accumulated from 500 laser shots (100 profiles with 5 shots per profile) with the 'Auto-Quality' option activated. The system was calibrated externally with fresh cells of *Escherichia coli* ATCC 8739. Raw spectra were automatically processed by smoothing and peak detection procedures implemented in Launchpad acquisition software. After acquisition, individual spectra from each strain were considered separately.

2.4. Spectra quality control

Raw spectra were controlled for peak resolution, signal to noise ratio, and absolute signal intensity. Good quality spectra were then transformed into peak lists and for each species, dendrograms with new spectra (and old spectra for species already in the clinical FDA-cleared VITEK MS database) were analyzed to assess intra-specific similarity and to detect any doubtful strains before integration of the spectra into the database.

2.5. Development of spectral database

As described by Girard et al. (2016), peak lists were binned and a log base scaling of the peak intensities was applied followed by a L1-normalization (Strubel et al., 2013). A predictive model was established for each species using the Advanced Spectra Classifier (ASC) algorithm developed by bioMérieux. This procedure provided a specific weighed bin matrix for each species and for identification, new spectra were compared to the bin weight matrix and the sum of matching bin weights was calculated and considered as an intermediate score. All species-specific scores were then transformed into multiclass probability estimates using a Gaussian based calibration procedure that took into account the score distributions within species compared to all other species (Strubel et al., 2013). A decision algorithm retained only significant matches and a single choice identification was obtained when only one species was retained. When more than one species was retained, a low discrimination result was proposed. In case more than 4 species

were retained or if no significant match was found, it was considered as a non-identification result.

2.6. Optimization and performance evaluation of the database

A 5-fold cross validation was used to optimize the VITEK MS database and to assess how accurately it would perform on independent new spectra. The spectral data were randomly split into 5 subsets. One round of cross-validation involved a learning phase on 4 subsets, and validated the identification performance on the remaining subset. Five rounds of cross-validation were performed by permutation of the subsets. The results were combined across rounds to get an estimation of identification performance. A correct identification was defined when the same identification occurred between cross-validation result and the reference identification. Low discrimination results were considered as correct if the expected identification was included in the matches. A misidentification was defined as discordant identification between the cross-validation result and the reference identification.

2.7. Evaluation of identification performances

The database was challenged with 73 external strains corresponding to 276 spectra that met the quality criteria described above, in order to assess whether correct identification could be achieved for the species claimed in the database and whether no identification was provided for the species absent from the database.

3. Results and discussion

3.1. Selection of spectra for the reference database

A total of 6477 spectra and 618 strains were retained for database construction. For each strain, spectra were acquired on at least 3 different culture media and 2 different incubation times (2 and 8 days). Species with great relevance were represented by 5–10 strains whereas rare species were represented by a small number of strains. The average number of strains and spectra per species was 5 and 50, respectively.

3.2. Effects of incubation time and growth medium on spectral similarity

Concerning the effects of incubation time and growth medium on spectral classification, two different cases were observed. For most of the tested species, all spectra derived from a same strain clustered together according to the medium used for growth without any separation according to incubation time. This result indicated that spectra from a same species differed mainly according to the strains used to build the database and that the effects of growth medium and incubation time were less important than that of intra-species diversity.

For certain species such as *Aspergillus flavus*, *Aureobasidium*

Table 2
Species used for external validation and their strain collection and Genbank accession numbers.

Strain number	Name	Genbank accession number
UBOCC-A-101330	<i>Absidia glauca</i>	MH102058
3a18a	<i>Acremonium</i> sp.	KX928832.1
UBOCC-A-101046	<i>Alternaria brassicicola</i>	MH102059
UBOCC-A-101055	<i>Aspergillus clavatus</i>	MH122641
UBOCC-A-101060	<i>Aspergillus flavus</i>	KF225050.1
UBOCC-A-106016	<i>Aspergillus fumigatus</i>	MH122642
UBOCC-A-101054	<i>Aspergillus intermedius</i>	MH122643
UBOCC-A-110208	<i>Aspergillus nidulans</i>	KF499566
UBOCC-A-112119	<i>Aspergillus niger</i>	MH122644
UBOCC-A-111044	<i>Aspergillus tamarii</i>	MH122645
UBOCC-A-101082	<i>Aspergillus versicolor</i>	MH122646
UBOCC-A-111050	<i>Aspergillus wentii</i>	MH122647
UBOCC-A-111234	<i>Aureobasidium pullulans</i>	MH102060
UBOCC-A-110185	<i>Chaetomium globosum</i>	MH102061
3a14a	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	KX928854.1
12a1	<i>Cladosporium halotolerans</i>	KX928934.1
12a17	<i>Cladosporium oxysporum</i>	KX928928.1
12a3a	<i>Cladosporium ramotenellum</i>	KX928855.1
UBOCC-A-101115	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	KJ596622.1
5i6	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	KX928840.1
1i2a	<i>Didymella glomerata</i>	KX928948.1
1i14	<i>Didymella heteroderiae</i>	KX928949.1
1f11c	<i>Didymella pinodella</i>	KX928846.1
UBOCC-A-101137	<i>Fusarium avenaceum</i>	MH122636
UBOCC-A-109124	<i>Fusarium culmorum</i>	JF278586.1
UBOCC-A-109101	<i>Fusarium delphinoides</i>	EU926311.1
ATCC 20273	<i>Fusarium graminearum</i>	MH122637
1i17b	<i>Fusarium merismoides</i>	KX928848.1
UBOCC-A-101151	<i>Fusarium oxysporum</i>	MH122638
UBOCC-A-109112	<i>Fusarium poae</i>	JF278578.1
UBOCC-A-101164	<i>Fusarium solani</i>	MH122639
UBOCC-A-109014	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	MH122640
UBOCC-A-216001	<i>Geotrichum candidum</i>	KX928847.1
UBOCC-A-109155	<i>Mucor racemosus</i>	JF723961.2
5f24	<i>Mucor circinelloides</i>	KX928835.1
UBOCC-A-108087	<i>Mucor fuscus</i>	KX928837.1
UBOCC-A-102007	<i>Mucor racemosus</i>	MH102062
5i3	<i>Mucor racemosus</i>	KX928839.1
CBS 133.37	<i>Paecilomyces niveus</i>	FJ390000.1
UBOCC-A-103043	<i>Paecilomyces variotii</i>	MH122648
1i10	<i>Penicillium adametzioides</i>	KX928888.1
5i7	<i>Penicillium antarcticum</i>	KX928902.1
UBOCC-A-108092	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	NR_121247.1
5i16	<i>Penicillium bialowiezense</i>	KX928944.1
5i14	<i>Penicillium brevicompactum</i>	KX928920.1
UBOCC-A-110150	<i>Penicillium camemberti</i>	MH122649
CBS 112297	<i>Penicillium carneum</i>	AY674386.1
UBOCC-A-101400	<i>Penicillium chrysogenum</i>	KF225057.1
3a1a	<i>Penicillium chrysogenum</i>	KX928918.1
5i5	<i>Penicillium commune</i>	KX928952.1
UBOCC-A-110017	<i>Penicillium corylophilum</i>	KF225058.1
1i7b	<i>Penicillium dierckxii</i>	KX928892.1
UBOCC-A-111030	<i>Penicillium digitatum</i>	MH122650
5i1	<i>Penicillium discolor</i>	KX928906.1
12a3b	<i>Penicillium echinulatum</i>	KX928926.1
LCP 07.5414	<i>Penicillium expansum</i>	MH122651
UBOCC-A-108106	<i>Penicillium glabrum</i>	KF225079.1
12a4b	<i>Penicillium glabrum</i>	KX928905.1
UBOCC-A-110039	<i>Penicillium granulatum</i>	MH122652
5i4	<i>Penicillium nalgiovense</i>	KX928943.1
5i9	<i>Penicillium nordicum</i>	KX928912.1
5i25	<i>Penicillium palitans</i>	KX928947.1
CBS 464.95	<i>Penicillium paneum</i>	HQ442324.1
UBOCC-A-101449	<i>Penicillium roqueforti</i>	KM503582.1
5f23 (-3)	<i>Penicillium roqueforti</i>	KX928910.1
5i11	<i>Penicillium solitum</i>	KX928946.1
12a5c	<i>Penicillium spathulatum</i>	KX928913.1
UBOCC-A-114054	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	KX928845.1
12a9	<i>Stereum</i> sp.	KX928844.1
5i8	<i>Thamnidium elegans</i>	MH113155
UBOCC-A-101290	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	MH102063
UBOCC-A-101312	<i>Verticillium dahliae</i>	MH102064
UBOCC-A-101325	<i>Wallemia sebi</i>	MH102065

pullulans and *Penicillium expansum*, a small effect of incubation time and growth medium was observed as shown in Fig. 1 for *P. expansum*. Indeed, for these species, different groups of spectra corresponding to the same medium (i.e. SDA or other media) and incubation time clustered together independently of the strain used (Fig. 1). This spectral grouping by medium and incubation time could be explained by the morphological changes that occurred as the culture aged, the main change being spore production. Consistent with this hypothesis, we observed that in these species, sporulation was strongly affected by incubation time and that sporulation was less important on SDA than for the other tested media (PDA, MEA and YGC agar). Despite these observations, identification performances were not affected as 100% of *P. expansum* spectra were correctly identified during cross-validation.

Two other media commonly used for food borne fungi cultivation were also tested, i.e., DG 18 and DRBC but were not chosen for database construction. Indeed, spectra acquired from closely related fungal species grown on these media could not be discriminated and a large proportion of spectra did not reach the chosen quality criteria (data not shown). This could be explained by the composition of these media which did not allow an optimal development of all fungi. Indeed, both media contain dichloran which is known to slow down mold growth (Henson, 1981) while DG18, a selective medium for xerophilic molds, has a low water activity and is therefore not adapted for growth of less xerotolerant fungi.

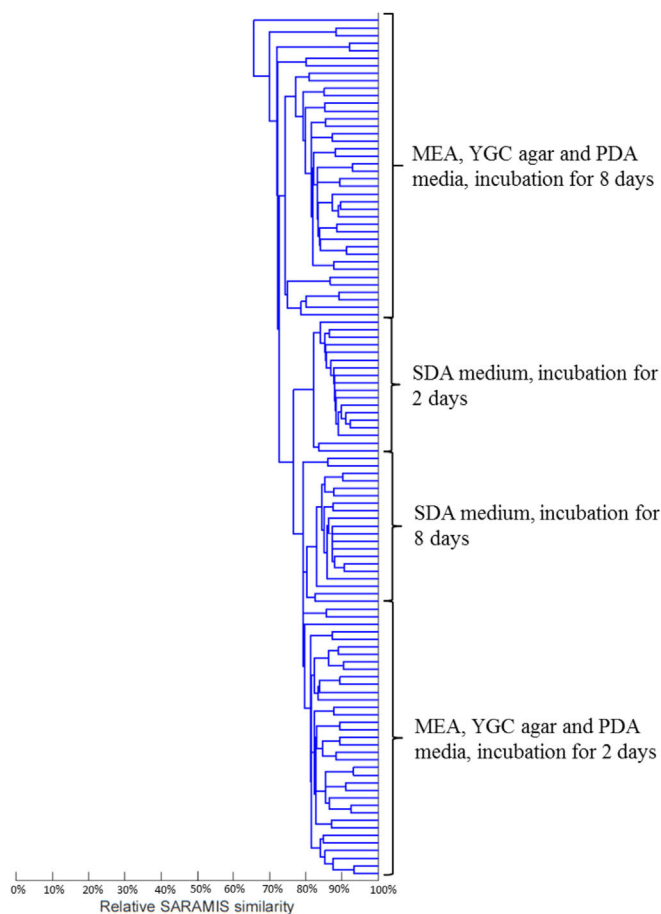


Fig. 1. Dendrogram showing spectral similarity of different strains belonging to *Penicillium expansum* cultivated on different growth media and for different incubation times.

There is little information about the impact of growth media on spectral similarity of fungi as most studies dealing with MALDI-TOF MS fungal identification were performed using only one cultivation medium. Concerning the effect of incubation time, several studies highlighted its impact on MALDI-TOF MS spectra classification. Alanio et al. (2011) observed differences between spectra of *Aspergillus* species obtained from young (<2 days of growth) and older thalli (4–10 days of growth) and developed their database with spectra from both young and mature thalli for more robustness as performed in the present study.

3.3. Performance evaluation by cross-validation

Global performance of the database was estimated by cross-validation. Overall, 94.12% of spectra were correctly identified to the species-level, 4.49% of spectra were not identified and 1.39% of spectra were discordant, meaning that they were incorrectly identified. Moreover, for species previously included into the VITEK MS database (e.g. *Aspergillus westerdijkiae* or *Epicoccum nigrum*), the new added spectra of the present study had no negative impact on the identification performances. Interestingly, Buskirk et al. (2011) argued that darkly-pigmented species such as *Aspergillus niger* had inhibitory effects on MALDI-TOF mass spectra analysis due to the presence of fungal melanin. However, in the present study, we did not observe such an impact on identification performances as more than 90% of *A. niger* spectra were correctly identified during cross-validation (Table 3).

Overall, detailed analysis of results (Table 3) showed that spectra from 113 out of the 136 species integrated into the database yielded an overall correct identification percentage above 90% with less than 10% spectra with low discrimination except for 7 species, i.e. *Aspergillus lacticoffeatus*, *Cladosporium oxysporum*, *Microdochium majus*, *Mucor hiemalis*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium carneum* and *Trichiderma viride*. Noteworthy, most of these 113 species e.g. *Aspergillus flavus*, *Cladosporium halotolerans* or *Penicillium citrinum* had no discordant spectra and less than 5% unidentified spectra even within genus for which a large species diversity and closely related species were represented in the database e.g. *Penicillium* and *Aspergillus* spp. Spectra of the 23 remaining species had levels of correct identification <90% ranging from 42.9% to 89.8% for *Fusarium acuminatum* and *Cladosporium cladosporioides*, respectively. Not surprisingly, most species for which a low overall correct identification was achieved, were closely related with another species also represented in the database or belonged to species complex. For example, *Penicillium bialowiezense* spectra were not well discriminated from those of *Penicillium brevicompactum* and it is well established that both species are closely related and share similar colony and micromorphological characteristics (Samson et al., 2002). It was also the case for *Aspergillus foetidus* and *Aspergillus lacticoffeatus* for which a high percentage of discordant spectra (~39%) and low discrimination spectra (~37%) were obtained, respectively. These species are members of the *A. niger* clade together with *A. niger* and *Aspergillus tubingensis* and were misclassified with *A. niger*. Varga et al. (2011), based on sequence data and extrolite production, considered *Aspergillus foetidus* and *Aspergillus lacticoffeatus* as synonyms of *A. niger*. Interestingly, in Fig. 2 showing spectra similarity between these species, each species formed separated clusters except for *A. niger* and *A. lacticoffeatus*, thus only confirming partly results of Varga et al. (2011) as *A. foetidus* spectra were separated from those of *A. niger* and *A. lacticoffeatus*. Within *Fusarium* spp., identification percentages (<60%) were observed for *Fusarium acuminatum* and *Fusarium avenaceum* spectra, which are also closely related to *Fusarium arthrosporioides* and *Fusarium tricinctum* (Stakheev et al., 2016). When comparing spectra similarity, two distinct clusters could be

Table 3
Performance evaluation by cross-validation results.

Species	Overall correct (%) ^b	Single choice (%)	Low discrimination (%)	No identification (%)	Discordant (%)
<i>Actinomucor elegans</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Alternaria alternata</i>	98.97	98.97	0	1.03	0
<i>Aspergillus arachidicola</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Aspergillus calidoustus</i>	100	100	0	0	0
<i>Aspergillus candidus</i>	61.54	61.54	0	38.46	0
<i>Aspergillus carbonarius</i> ^a	93.18	93.18	0	6.82	0
<i>Aspergillus chevalieri</i> ^a	98.28	98.28	0	1.72	0
<i>Aspergillus fennelliae</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Aspergillus flavus</i>	99.59	99.59	0	0.41	0
<i>Aspergillus foetidus</i> ^a	44.44	25.93	18.52	16.67	38.89
<i>Aspergillus fumigatus</i>	99.59	99.59	0	0.41	0
<i>Aspergillus glaucus</i>	81.82	54.55	27.27	18.18	0
<i>Aspergillus intermedius</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Aspergillus lacticoffeatus</i> ^a	100	62.86	37.14	0	0
<i>Aspergillus minisclerotigenes</i> ^a	100	98.15	1.85	0	0
<i>Aspergillus montevideensis</i> ^a	100	98.48	1.52	0	0
<i>Aspergillus nidulans</i>	100	100	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	90.74	87.04	3.7	6.17	3.09
<i>Aspergillus novoparasiticus</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Aspergillus ochraceus</i>	96.23	96.23	0	3.77	0
<i>Aspergillus parasiticus</i> ^a	87.5	87.5	0	12.5	0
<i>Aspergillus penicilloides</i> ^a	66.67	25	41.67	0	33.33
<i>Aspergillus proliferans</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Aspergillus pseudoglaucus</i> ^a	98.15	98.15	0	1.85	0
<i>Aspergillus restrictus</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Aspergillus ruber</i> ^a	96.97	93.94	3.03	3.03	0
<i>Aspergillus sydowii</i>	100	100	0	0	0
<i>Aspergillus tamarii</i>	100	100	0	0	0
<i>Aspergillus terreus</i>	99.54	99.54	0	0.46	0
<i>Aspergillus thermomutatus</i>	95.71	95.71	0	4.29	0
<i>Aspergillus tubingensis</i>	81.25	71.88	9.38	17.19	1.56
<i>Aspergillus versicolor</i>	95.4	95.4	0	4.6	0
<i>Aspergillus wentii</i> ^a	92.59	92.59	0	7.41	0
<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	100	100	0	0	0
<i>Aureobasidium pullulans</i>	94.37	92.96	1.41	5.63	0
<i>Botrytis cinerea</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Chaetomium globosum</i>	100	100	0	0	0
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	89.8	84.35	5.44	10.2	0
<i>Cladosporium dominicanum</i> ^a	97.06	97.06	0	2.94	0
<i>Cladosporium fusiforme</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Cladosporium halotolerans</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Cladosporium herbarum</i> ^a	77.08	77.08	0	5.21	17.71
<i>Cladosporium langeronii</i> ^a	94.59	94.59	0	5.41	0
<i>Cladosporium oxysporum</i> ^a	100	86.44	13.56	0	0
<i>Cladosporium psychrotolerans</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Cladosporium ramotenellum</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	100	100	0	0	0
<i>Cladosporium velox</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Didymella glomerata</i> ^a	83.93	64.29	19.64	14.29	1.79
<i>Didymella pinodella</i> ^a	55	50	5	0	45
<i>Epicoccum nigrum</i>	100	100	0	0	0
<i>Fusarium acuminatum</i> ^a	42.86	26.53	16.33	38.78	18.37
<i>Fusarium arthrosporioides</i> ^a	90.91	90.91	0	9.09	0
<i>Fusarium avenaceum</i> ^a	58.93	57.14	1.79	41.07	0
<i>Fusarium cerealis</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Fusarium culmorum</i> ^a	96.55	91.38	5.17	0	3.45
<i>Fusarium domesticum</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Fusarium equiseti</i> ^a	67.14	67.14	0	31.43	1.43
<i>Fusarium graminearum</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Fusarium incarnatum</i> ^a	83.33	76.67	6.67	13.33	3.33
<i>Fusarium langsethiae</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Fusarium lateritium</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Fusarium oxysporum</i>	97.76	97.01	0.75	1.49	0.75
<i>Fusarium poae</i> ^a	97.06	97.06	0	2.94	0
<i>Fusarium proliferatum</i>	97.22	96.3	0.93	2.78	0
<i>Fusarium sambucinum</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Fusarium solani</i>	96	96	0	4	0
<i>Fusarium sporotrichioides</i> ^a	98	94	4	2	0
<i>Fusarium subglutinans</i> ^a	86.67	80	6.67	13.33	0
<i>Fusarium temperatum</i> ^a	100	97.83	2.17	0	0
<i>Fusarium tricinctum</i>	95.45	92.42	3.03	1.52	3.03
<i>Fusarium venenatum</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Fusarium verticillioides</i>	71.01	71.01	0	26.09	2.9
<i>Geotrichum candidum</i>	98.72	98.72	0	1.28	0

Table 3 (continued)

Species	Overall correct (%) ^b	Single choice (%)	Low discrimination (%)	No identification (%)	Discordant (%)
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	100	100	0	0	0
<i>Macrophomina phaesolina</i> ^a	93.33	86.67	6.67	0	6.67
<i>Microdochium majus</i> ^a	100	83.33	16.67	0	0
<i>Microdochium nivale</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Mucor circinelloides</i>	95.83	93.75	2.08	4.17	0
<i>Mucor fragilis</i> ^a	100	97.06	2.94	0	0
<i>Mucor hiemalis</i> ^a	100	90.91	9.09	0	0
<i>Mucor lanceolatus</i>	97.56	97.56	0	0	2.44
<i>Mucor plumbeus</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Mucor racemosus</i>	100	100	0	0	0
<i>Paecilomyces divaricatus</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Paecilomyces formosus</i> ^a	98.41	98.41	0	1.59	0
<i>Paecilomyces fulvus</i>	93.06	93.06	0	6.94	0
<i>Paecilomyces saturatus</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Paecilomyces variotii</i>	98.6	98.6	0	1.4	0
<i>Penicillium adametzioides</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Penicillium antarcticum</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> ^a	93.55	83.87	9.68	4.84	1.61
<i>Penicillium bialowiezense</i> ^a	87.72	85.96	1.75	12.28	0
<i>Penicillium brevicompactum</i>	98.48	93.18	5.3	1.52	0
<i>Penicillium camemberti</i>	95.65	77.39	18.26	0	4.35
<i>Penicillium carneum</i> ^a	100	80.85	19.15	0	0
<i>Penicillium chermesinum</i> ^a	91.67	91.67	0	8.33	0
<i>Penicillium chrysogenum</i>	96.18	96.18	0	2.55	1.27
<i>Penicillium citreonigrum</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Penicillium citrinum</i>	98.46	98.46	0	1.54	0
<i>Penicillium commune</i> ^a	62.35	42.35	20	12.94	24.71
<i>Penicillium corylophilum</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Penicillium crustosum</i> ^a	98.72	96.15	2.56	1.28	0
<i>Penicillium decumbens</i>	100	100	0	0	0
<i>Penicillium dierckxii</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Penicillium digitatum</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Penicillium discolor</i> ^a	79.55	77.27	2.27	0	20.45
<i>Penicillium expansum</i>	100	100	0	0	0
<i>Penicillium fuscoglaucum</i> ^a	84.62	76.92	7.69	0	15.38
<i>Penicillium glabrum</i>	100	100	0	0	0
<i>Penicillium italicum</i>	100	100	0	0	0
<i>Penicillium nalgiovense</i> ^a	96.43	96.43	0	3.57	0
<i>Penicillium nordicum</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Penicillium oxalicum</i> ^a	81.43	81.43	0	18.57	0
<i>Penicillium palitans</i> ^a	63.16	57.89	5.26	23.68	13.16
<i>Penicillium paneum</i> ^a	95.92	95.92	0	4.08	0
<i>Penicillium polonicum</i> ^a	94.64	92.86	1.79	5.36	0
<i>Penicillium roqueforti</i>	92.86	92.26	0.6	0.6	6.55
<i>Penicillium salamii</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Penicillium simplicissimum</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Penicillium solitum</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Penicillium verrucosum</i> ^a	93.48	93.48	0	6.52	0
<i>Penicillium viridicatum</i> ^a	65.63	65.63	0	34.38	0
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	100	100	0	0	0
<i>Rhizopus oryzae</i> complex	92.86	89.29	3.57	7.14	0
<i>Rhizopus stolonifer</i> ^a	94.74	92.11	2.63	5.26	0
<i>Scopulariopsis asperula</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Talaromyces bacillisporus</i> ^a	98.28	98.28	0	1.72	0
<i>Talaromyces macrosporus</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Trichoderma harzianum</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Trichoderma viride</i> ^a	100	84.85	15.15	0	0
<i>Trichothecium roseum</i> ^a	96.67	96.67	0	3.33	0
<i>Umbelopsis isabellina</i> ^a	100	100	0	0	0
<i>Wallemia sebi</i> ^a	100	100	0	0	0

^a Species not previously represented in the VITEK MS fungal database.

^b Single choice percentage corresponds to spectra identified to the correct species, low discrimination percentage corresponds to spectra which matched with several species including the correct one while overall correct percentage is the addition of single choice and low discrimination percentages.

observed i.e., one containing *F. acuminatum* and *F. tricinctum* spectra and another one containing *F. avenaceum* and *F. arthrosporoides* spectra (data not shown). Among *Penicillium* spp., low levels of correctly identified spectra were achieved for members of the *Penicillium camemberti*/*Penicillium commune* species complex, i.e., *P. commune*, *Penicillium fuscoglaucum* and *Penicillium palitans*. Indeed, all these species including *P. camemberti* are also phylogenetically closely related (Giraud et al., 2010). While

P. camemberti and *P. commune* only differ slightly in their morphological characteristics as they produce respectively white and green conidia, it has been shown that they cannot be distinguished using molecular data (Giraud et al., 2010). Giraud et al. (2010) also proposed to re-introduce the old name *P. fuscoglaucum* (previously synonymized with *P. commune*) based on tubulin gene and PC4 microsatellite genealogies while it was shown that *P. palitans* was closely related but distinguishable from

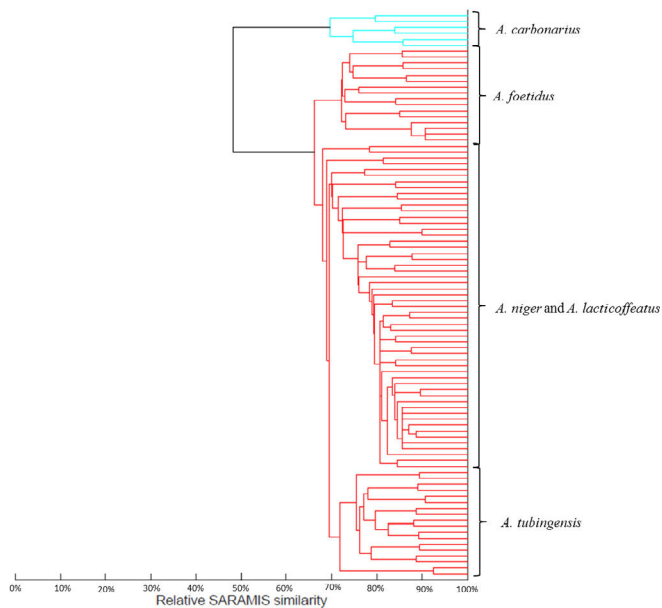


Fig. 2. Dendrogram showing spectral similarity of different strains belonging to 4 species from the *A. niger* clade and *A. carbonarius*.

P. camemberti/*P. commune*. Based on these data and the present results, it may not be possible to identify these closely related species accurately using MALDI-TOF and it would be necessary to group these species into a complex as it was already done for closely related bacterial species such as those from the *Mycobacterium tuberculosis* complex (Girard et al., 2016). Interestingly, we were able to accurately identify all members of the *Cladosporium sphaerospermum* complex, e.g. *C. dominicanum*, *C. psychrotolerans*, *C. halotolerans*, *C. sphaerospermum*, *C. fusiforme*, *C. velox* and *C. langeronii* (Table 3) as these species harboured quite different MALDI-TOF spectra (Fig. 3).

This method appears as powerful as the molecular gold standard to identify most of the species we implemented in the database, even for closely related species. Indeed, as underlined recently by Normand et al. (2013), the analysis of a high number of subcultures from each strain and of strains representing each species are key to improve the effectiveness of spectral libraries for fungal identification. However, this method may also have limitations for certain species complex.

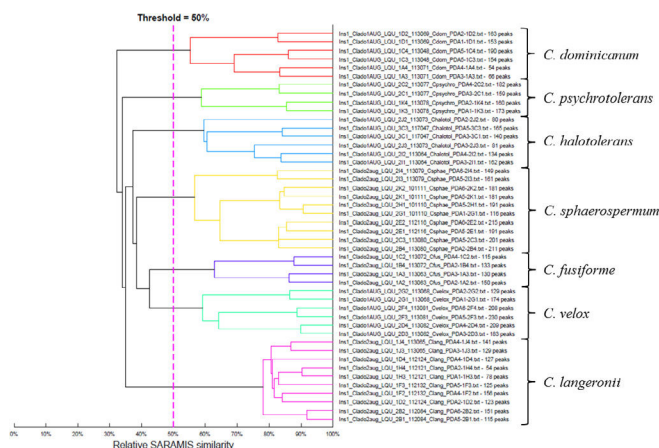


Fig. 3. Dendrogram showing spectral similarity of different strains and species belonging to the *Cladosporium sphaerospermum* complex.

Although these results were very promising, this first cross-validation could only estimate the database performances and give a first idea on how the different species behaved. In order to go further in the evaluation and validation of the method performances, we then tested external strains not used to build the database, in order to assess whether they could be correctly identified or not.

3.4. Database validation with external isolates

The database was challenged with external isolates to evaluate its performances. Of the 73 external strains used, corresponding to 19 genera and 67 species, 52 strains belonged to species represented in the database and 15 belonged to species absent from it. Depending on the analyzed strains, different cases were observed. For 69 out of 73 strains, spectra acquired from the same strain showed identical results (either a good, bad or no identification) (Table 4). Exceptions were *Penicillium aurantiogriseum* UBOCC-A-108092 and *Penicillium expansum* UBOCC-A-108103 for which spectra were either correctly or not identified, and *Penicillium granulatum* UBOCC-A-110039, *Penicillium spathulatum* 12a5c and *Verticillium dahliae* UBOCC-A-101312 for which spectra were either incorrectly identified or not identified. There were not any strains for which spectra were assigned to two or more different species as single choice.

For species integrated into the database, 89.45% of spectra were correctly identified to the species-level, 4.13% of spectra were not identified and 6.42% of spectra were erroneously identified (discordant). The misidentification corresponded to spectra of *Cladosporium oxysporum* identified as *Cladosporium cladosporioides* complex; *P. commune* spectra identified as *P. camemberti*; *P. palitans* spectra identified as *P. aurantiogriseum* and *Didymella pinodela* spectra identified as *Didymella glomerata*. It can be emphasized that spectra which were misidentified corresponded to species from the same genus and in the case of *P. commune* and *P. camemberti*, for undistinguishable species based on molecular data. For the 15 species not represented into the database, 70.69% of spectra were not identified and 29.31% of spectra were identified to the wrong species. As shown in Table 4, most of the misidentified spectra were assigned to species of the same genus.

Although some of the tested spectra for this external validation were not correctly identified, their assignment at the genus level was correct. For the species present in the database, all spectra acquired from 52 out of 58 strains were correctly assigned. Since they were obtained with a non-optimized database, these results are promising and should improve as the database is further optimized. Optimization could consist in grouping closely related species into species complex as mentioned above, adding spectra from other species and new strains for the species already present in the database.

In comparison to the present study, the three most clinically comprehensive mold databases were developed by Lau et al. (2013), Gautier et al. (2014) and Becker et al. (2015), with respectively 152, 347 and 525 claimed fungal species. When challenged with external isolates, identification performances of these databases respectively yielded 88.9%, 98.8% and 84% of correctly identified spectra. The levels of correctly identified spectra obtained by Lau et al. (2013) and Becker et al. (2015) were close but below those obtained in the present study, with 89.45% of correctly identified external spectra. As mentioned previously, these results demonstrate the good reliability of the spectral database covering 136 species for identification of food spoilage fungi.

4. Conclusion

MALDI-TOF MS appears to be a rapid and reliable tool for the

Table 4
Detailed results for the set of external strains used to evaluate the database performances.

	Species (number of strains)	Number of spectra	Number of correctly identified spectra	Number of non-identified spectra	Number of misidentified spectra
Species present in the database	<i>Aspergillus flavus</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Aspergillus fumigatus</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Aspergillus intermedius</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Aspergillus nidulans</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Aspergillus niger</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Aspergillus tamarii</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Aspergillus versicolor</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Aspergillus wentii</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Aureobasidium pullulans</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Chaetomium globosum</i> (1)	2	0	2	0
	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Cladosporium halotolerans</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Cladosporium oxysporum</i> (1)	4	0	0	4 (<i>C. cladosporioides</i> complex)
	<i>Cladosporium ramotenellum</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> (2)	6	6	0	0
	<i>Didymella glomerata</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Didymella pinodella</i> (1)	2	0	0	2 (<i>D. glomerata</i>)
	<i>Fusarium avenaceum</i> (1)	2	0	2	0
	<i>Fusarium culmorum</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Fusarium graminearum</i> (1)	2	2	0	0
	<i>Fusarium oxysporum</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Fusarium poae</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Fusarium solani</i> (1)	2	2	0	0
	<i>Fusarium sporotrichioides</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Geotrichum candidum</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Mucor circinelloides</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Mucor racemosus</i> (3)	12	12	0	0
	<i>Paecilomyces variotii</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Penicillium adametzioides</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Penicillium antarcticum</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> (1)	4	2	2	0
	<i>Penicillium bialowiezense</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Penicillium brevicompactum</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Penicillium camemberti</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Penicillium carneum</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Penicillium chrysogenum</i> (2)	8	8	0	0
	<i>Penicillium commune</i> (1)	4	0	0	4 (<i>P. camemberti</i>)
	<i>Penicillium corylophilum</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Penicillium digitatum</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Penicillium discolor</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Penicillium expansum</i> (1)	4	3	1	0
	<i>Penicillium dierckxii</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Penicillium glabrum</i> (2)	8	8	0	0
	<i>Penicillium nalgioense</i> (1)	4	4	0	0
	<i>Penicillium nordicum</i> (1)	2	2	0	0
	<i>Penicillium palitans</i> (1)	4	0	0	4 (<i>P. aurantiogriseum</i>)
	<i>Penicillium paneum</i> (1)	4	4	0	0
<i>Penicillium roqueforti</i> (2)	8	8	0	0	
<i>Penicillium solitum</i> (1)	4	4	0	0	
<i>Purpureocillium lilacinum</i> (1)	4	4	0	0	
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (1)	4	4	0	0	
<i>Wallemia sebi</i> (1)	4	4	0	0	
Species absent from the database	<i>Absidia glauca</i> (1)	4	–	4	0
	<i>Acremonium</i> sp. (1)	2	–	2	0
	<i>Alternaria brassicicola</i> (1)	4	–	0	4 (<i>A. alternata</i>)
	<i>Aspergillus clavatus</i> (1)	4	–	4	0
	<i>Didymella heteroderae</i> (1)	4	–	0	4 (<i>D. glomerata</i>)
	<i>Fusarium delphinoides</i> (1)	4	–	4	0
	<i>Fusarium merismoides</i> (1)	4	–	4	0
	<i>Mucor fuscus</i> (1)	4	–	4	0
	<i>Paecilomyces niveus</i> (1)	4	–	0	4 (<i>P. fulvus</i>)
	<i>Penicillium echinulatum</i> (1)	4	–	4	0
	<i>Penicillium granulatum</i> (1)	4	–	2	2 (<i>Rhizopus arrizhus</i> complex)

(continued on next page)

Table 4 (continued)

Species (number of strains)	Number of spectra	Number of correctly identified spectra	Number of non-identified spectra	Number of misidentified spectra
<i>Penicillium spathulatum</i> (1)	4	–	2	2 (<i>P. brevicompactum</i>)
<i>Stereum</i> sp. (1)	4	–	4	0
<i>Thamnidium elegans</i> (1)	4	–	4	0
<i>Verticillium dahliae</i> (1)	4	–	3	1 (<i>Fusarium solani</i> complex)

identification of filamentous fungi. Using the present standardized extraction protocol, it is rapid and easy to implement as compared to phenotypic and genotypic methods. Moreover, this method is robust enough to allow the use of several different culture media and incubation time for identification and to our best knowledge, this database is the most comprehensive one developed for the identification of food spoilage fungi. It appeared as powerful as DNA sequencing to identify most of the species we implemented in the database, even for closely related species. However, it also had limitations for certain species complex. All together, these results also emphasize the need to use well characterized strains to build a spectral database for identification and to identify its potential limits. With the implementation of this new database and the constant evolution of fungal taxonomy and phylogeny (Houbraken and Samson, 2017), one challenge will be to keep the database taxonomy updated and to regularly add new species and new strains for species already represented in the database. Another challenge to address will be to assess whether MALDI-TOF MS can be applied for intra-specific differentiation or species complex resolution as already shown for certain yeast (Stübiger et al., 2016) and bacterial (Dieckmann et al., 2008) species.

Conflicts of interest

LQ, VG, SA, BC, VM and AVB are employees of bioMérieux, a company developing and selling in vitro diagnostic assays including the VITEK MS used in this study.

Acknowledgements

This work was done as part of a CIFRE PhD funded by bioMérieux and the French Association for Research and Technology (ANRT) [Convention #2015/0821] in collaboration with the LUBEM laboratory.

References

Alanio, A., Beretti, J.-L., Dauphin, B., Mellado, E., Quesne, G., Lacroix, C., Amara, A., Berche, P., Nassif, X., Bounoux, M.-E., 2011. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 750–755. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03323.x>.

Basile, F., Beverly, M.B., Voorhees, K.J., Hadfield, T.L., 1998. Pathogenic bacteria: their detection and differentiation by rapid lipid profiling with pyrolysis mass spectrometry. *TrAC Trends Anal. Chem. (Reference Ed.)* 17, 95–109. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(97\)00103-9](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(97)00103-9).

Becker, P.T., Stubbe, D., Claessens, J., Roesems, S., Bastin, Y., Planard, C., Cassagne, C., Piarroux, R., Hendrickx, M., 2015. Quality control in culture collections: confirming identity of filamentous fungi by MALDI-TOF MS. *Mycoscience* 56, 273–279. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2014.08.002>.

Buskirk, A.D., Hettick, J.M., Chipinda, I., Law, B.F., Siegel, P.D., Slaven, J.E., Green, B.J., Beezhold, D.H., 2011. Fungal pigments inhibit the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of darkly pigmented fungi. *Anal. Biochem.* 411, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.11.025>.

Cassagne, C., Ranque, S., Normand, A.-C., Fourquet, P., Thiebault, S., Planard, C., Hendrickx, M., Piarroux, R., 2011. Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028425>.

Chalupová, J., Raus, M., Sedlářová, M., Šebela, M., 2014. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. In: *Biotechnol. Adv., Plant Biotechnology 2013: "Green for Good II"*, vol. 32, pp. 230–241. <https://doi.org/>

[10.1016/j.biotechadv.2013.11.002](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.002).

Chen, A.J., Hubka, V., Frisvad, J.C., Visagie, C.M., Houbraken, J., Meijer, M., Varga, J., Demirel, R., Jurjević, Ž., Kubátová, A., Sklenář, F., Zhou, Y.G., Samson, R.A., 2017. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Aspergillus* (formerly *Eurotium*), and its occurrence in indoor environments and food. *Stud. Mycol.* 88, 37–135. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.07.001>.

Chen, H.-Y., Chen, Y.-C., 2005. Characterization of intact *Penicillium* spores by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 3564–3568. <https://doi.org/10.1002/rcm.2229>.

Dieckmann, R., Helmuth, R., Erhard, M., Malorny, B., 2008. Rapid classification and identification of salmonellae at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7767–7778. <https://doi.org/10.1128/AEM.01402-08>.

Filtenborg, O., Frisvad, J.C., Thrane, U., 1996. Moulds in food spoilage. In: *Int. J. Food Microbiol., Specific Spoilage Organisms*, vol. 33, pp. 85–102. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01153-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01153-1).

Fournier, R., Wallet, F., Grandbastien, B., Dubreuil, L., Courcol, R., Neut, C., Dessein, R., 2012. Chemical extraction versus direct smear for MALDI-TOF mass spectrometry identification of anaerobic bacteria. *Anaerobe* 18, 294–297. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.03.008>.

Garnier, L., Valence, F., Pawtowski, A., Auhustina-Galerie, L., Frotté, N., Baroncelli, R., Deniel, F., Coton, E., Mounier, J., 2017. Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 241, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.026>.

Gautier, M., Ranque, S., Normand, A.-C., Becker, P., Packeu, A., Cassagne, C., L'Ollivier, C., Hendrickx, M., Piarroux, R., 2014. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: revolutionizing clinical laboratory diagnosis of mould infections. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis* 20, 1366–1371. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12750>.

Ge, M.-C., Kuo, A.-J., Liu, K.-L., Wen, Y.-H., Chia, J.-H., Chang, P.-Y., Lee, M.-H., Wu, T.-L., Chang, S.-C., Lu, J.-J., 2016. Routine identification of microorganisms by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: success rate, economic analysis, and clinical outcome. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.06.002>.

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*. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 473–479. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000032386.75915.a0>.

Girard, V., Mailler, S., Welker, M., Arsac, M., Cellière, B., Cotte-Pattat, P.-J., Chatellier, S., Durand, G., Béni, A.-M., Schrenzel, J., Miller, E., Dussoulier, R., Dunne, W.M., Butler-Wu, S., Saubolle, M.A., Sussland, D., Bell, M., van Belkum, A., Deol, P., 2016. Identification of mycobacterium spp. and nocardia spp. from solid and liquid cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 86, 277–283. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.07.027>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.014>.

Hawksworth, D.L., 2015. Naming fungi involved in spoilage of food, drink, and water. In: *Curr. Opin. Food Sci., Food Engineering and Processing Food Mycology*, vol. 5, pp. 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.07.004>.

Henson, O.E., 1981. Dichloran as an inhibitor of mold spreading in fungal plating media: effects on colony diameter and enumeration. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 656–660.

Hettick, J.M., Green, B.J., Buskirk, A.D., Kashon, M.L., Slaven, J.E., Janotka, E., Blachere, F.M., Schmechel, D., Beezhold, D.H., 2008. Discrimination of *Penicillium* isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* RCM 22, 2555–2560. <https://doi.org/10.1002/rcm.3649>.

Houbraken, J., Due, M., Varga, J., Meijer, M., Frisvad, J.C., Samson, R.A., 2007. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Usti*. In: *Stud. Mycol., Aspergillus Systematics in the Genomic Era*, 59, pp. 107–128. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.12>.

Houbraken, J., Samson, R.A., 2017. Current taxonomy and identification of foodborne fungi. In: *Curr. Opin. Food Sci., Food Engineering and Processing 2017 Food Mycology*, vol. 17, pp. 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.10.010>.

Lau, A.F., Drake, S.K., Calhoun, L.B., Henderson, C.M., Zelazny, A.M., 2013. Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of molds from solid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 51, 828–834. <https://doi.org/10.1128/JCM.02852-12>.

- Marinach-Patrice, C., Lethuillier, A., Marly, A., Brossas, J.-Y., Gené, J., Symoens, F., Detry, A., Guarro, J., Mazier, D., Hennequin, C., 2009. Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis* 15, 634–642. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02758.x>.
- Nacef, M., Chevalier, M., Chollet, S., Drider, D., Flahaut, C., 2017. MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: the Maroilles. *Int. J. Food Microbiol.* 247, 2–8. Special Issue: CBL 20th edition: New challenges for research and industry. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.005>.
- Nagy, E., Maier, T., Urban, E., Terhes, G., Kostrzewa, M., 2009. Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* 15, 796–802. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02788.x>.
- Normand, A.C., Becker, P., Gabriel, F., Cassagne, C., Accoceberry, I., Gari-Toussaint, M., Hasseine, L., Geyter, D.D., Pierard, D., Surmont, I., Djenad, F., Donnadieu, J.L., Piarroux, M., Ranque, S., Hendrickx, M., Piarroux, R., 2017. Validation of a new web application for identification of fungi by use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 55, 2661–2670. <https://doi.org/10.1128/JCM.00263-17>.
- Normand, A.-C., Cassagne, C., Ranque, S., L'ollivier, C., Fourquet, P., Roesems, S., Hendrickx, M., Piarroux, R., 2013. Assessment of various parameters to improve MALDI-TOF MS reference spectra libraries constructed for the routine identification of filamentous fungi. *BMC Microbiol.* 13 (76). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-76>.
- Pitt, J., Hocking, A., 2009. *Fungi and Food Spoilage*, third ed. Springer Science & Business Media, New York, USA.
- Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J.C., Meijer, M., Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Samson, R.A., 2007. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Stud. Mycol.* 59, 53–66. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.07>.
- Rodrigues, P., Santos, C., Venâncio, A., Lima, N., 2011. Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. *J. Appl. Microbiol.* 111, 877–892. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05116.x>.
- Rychert, J., Slechta, E.S., Barker, A.P., Miranda, E., Babady, N.E., Tang, Y.-W., Gibas, C., Wiederhold, N., Sutton, D., Hanson, K.E., 2017. Multi-center evaluation of the VITEK MS v3.0 system for the identification of filamentous fungi. *J. Clin. Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/JCM.01353-17>. *JCM.01353-17*.
- Samson, R., Frisvad, J.C., Hoekstra, E., Filtenborg, O., 2002. *Introduction to Food and Airborne Fungi*, sixth ed. ASM Press, Utrecht, The Netherlands.
- dos Santos, J.L.P., Bernardi, A.O., Pozza Morassi, L.L., Silva, B.S., Copetti, M.V., Sant'Ana, A.S., 2016. Incidence, populations and diversity of fungi from raw materials, final products and air of processing environment of multigrain whole meal bread. *Food Res. Int.* 87, 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.07.002>.
- Sanguinetti, M., Posteraro, B., 2017. Identification of molds by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 55, 369–379. <https://doi.org/10.1128/JCM.01640-16>.
- Schnürer, J., Magnusson, J., 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. In: *Trends Food Sci. Technol.* Second International Symposium on Sourdough – from Fundamentals to Applications, vol. 16, pp. 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.014>.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Consortium, F.B., List, F.B.C.A., 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., Houbaken, 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., Liggenstoffer, 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., Walthers, 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. Unit. States Am.* 109, 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>.
- Stakheev, A.A., Khairulina, D.R., Zavriev, S.K., 2016. Four-locus phylogeny of *Fusarium* anvenaceum and related species and their species-specific identification based on partial phosphate permease gene sequences. *Int. J. Food Microbiol.* 225, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.012>.
- Strubel, G., Arsac, M., Dessere, D., Cotte-Pattat, P.-J., 2013. Method for Identifying Microorganisms by Mass Spectrometry. WO2013080170 A1.
- Stübiger, G., Wuczakowski, M., Mancera, L., Lopandic, K., Sterflinger, K., Belgacem, O., 2016. Characterization of yeasts and filamentous fungi using MALDI lipid phenotyping. *J. Microbiol. Meth.* 130, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.08.010>.
- van Baar, B.L.M., 2000. Characterisation of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray mass spectrometry. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 193–219. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(99\)00036-4](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(99)00036-4).
- van Belkum, A., Chatellier, S., Girard, V., Pincus, D., Deol, P., Dunne, W.M., 2015. Progress in proteomics for clinical microbiology: MALDI-TOF MS for microbial species identification and more. *Expert Rev. Proteomics* 12, 595–605. <https://doi.org/10.1586/14789450.2015.1091731>.
- van Belkum, A., Welker, M., Pincus, D., Charrier, J.P., Girard, V., 2017. Matrix-Assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiology: what are the current issues? *Ann. Lab. Med.* 37, 475–483. <https://doi.org/10.3343/alm.2017.37.6.475>.
- van Wuijckhuijse, A.L., Stowers, M.A., Kleefman, W.A., van Baar, B.L.M., Kientz, C.E., Marijnissen, J.C.M., 2005. Matrix-assisted laser desorption/ionisation aerosol time-of-flight mass spectrometry for the analysis of bioaerosols: development of a fast detector for airborne biological pathogens. In: *J. Aerosol Sci., Measurement and Characterization of Bioaerosols*, 36, pp. 677–687. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2004.11.003>.
- Varga, J., Frisvad, J.C., Kocsubé, S., Brankovics, B., Tóth, B., Szigeti, G., Samson, R.A., 2011. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. In: *Stud. Mycol., Taxonomic Studies on the Genus Aspergillus*, 69, pp. 1–17. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.69.01>.
- Visagie, C.M., Houbaken, 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. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>.
- Waśkiewicz, A., 2014. MYCOTOXINS natural occurrence of mycotoxins in food. In: Batt, C.A., Tortorello, M.L. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*, second ed. Academic Press, Oxford, pp. 880–886. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00231-7>.
- Welham, K.J., Domin, M.A., Johnson, K., Jones, L., Ashton, D.S., 2000. Characterization of fungal spores by laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 307–310.

III. Résultats supplémentaires: Évaluation des performances d'identification de champignons filamenteux par spectrométrie de masse MALDI-TOF après prélèvement direct de matériel biologique à partir d'aliments contaminés

En complément des travaux de cette étude, une étude préliminaire a été réalisée pour identifier des champignons filamenteux d'altération directement à partir d'un aliment contaminé sans passer par une étape de culture préalable. Brièvement, trois souches appartenant respectivement à trois espèces fongiques responsables d'altération et isolées de produits laitiers, *Cladosporium halotolerans* UBOCC-A-116001, *Mucor racemosus* UBOCC-A-116002 et *Penicillium commune* UBOCC-A-116003 ont été testées. Ces trois espèces sont fréquemment responsables d'altérations des produits laitiers et de boulangerie-viennoiserie-pâtisserie et avaient été intégrées dans la base de données spectrales développée durant les travaux de thèse, avec des performances satisfaisantes d'identification (>90 % de spectres correctement identifiés). Les performances d'identification de ces trois espèces a été évaluée en utilisant trois matrices alimentaires différentes, pain de mie, fromage frais, et crème fraîche. Chacune des matrices alimentaires a été contaminée de manière artificielle par une des trois espèces fongiques. Pour cela, 50 spores ont été déposées à la surface des aliments, puis ces derniers ont été incubés jusqu'à 8 jours à 25°C. En parallèle, des milieux contenant du PDA ont également été ensemencés avec les mêmes suspensions de spores afin de vérifier la pureté des souches puis du matériel biologique a été prélevé puis analysé par MALDI-TOF MS en suivant le même protocole que celui décrit dans l'étude précédente. Après développement d'une quantité suffisante de biomasse à la surface des aliments contaminés, le même protocole d'extraction protéique et d'analyse par MALDI-TOF MS utilisé lors du développement de la base de données a été appliqué. La seule différence était qu'au lieu de prélever de la biomasse à la surface du milieu gélosé, le matériel biologique était prélevé directement à la surface de l'aliment contaminé. La manipulation a été répétée 2 fois et 4 spectres étaient acquis pour chaque répétition biologique. Les résultats d'identification sont présentés dans le Tableau 6, où sont indiqués les pourcentages de spectres identifiés à l'espèce pour chaque souche testée et chaque matrice alimentaire en fonction du temps de prélèvement. Sur pain de mie, une croissance visible du champignon était observée après 3, 7 et 3 jours pour *C. halotolerans*, *M. racemosus* et *P. commune*, respectivement. Sur fromage frais, une croissance visible a été observée à partir de 4, 3 et 3 jours pour *C. halotolerans*, *M. racemosus* et *P. commune*. Enfin, sur crème fraîche, aucune croissance visible de *C.*

halotolerans n'a été observée après 8 jours d'incubation, tandis qu'une croissance a été observée après 3 jours pour *M. racemosus* et *P. commune*.

Table 6 : Performances d'identification (pourcentage de spectres correctement identifiés à l'espèce par la base de données VTEK MS) de 3 espèces fongiques prélevées directement de matrices alimentaires en fonction du temps de prélèvement

Souches	PDA	Pain de mie	Fromage frais	Crème fraîche	Total (matrices alimentaires)
<i>Cladosporium halotolerans</i> UBOCC-A-116001	90% (3-8 j*)	0% (5 j*) 20% (6-8 j*)	0% (4-6 j*) 22% (7-8 j*)	Non testé	15%
<i>Mucor racemosus</i> UBOCC-A-116002	100% (3-8 j*)	100% (7-8 j*)	36% (3-5 j*) 80% (6-8 j*)	88% (3-8 j*)	75%
<i>Penicillium commune</i> UBOCC-A-116003	91% (3-8 j*)	0% (3 j*) 21% (4-8 j*)	55% (3-8 j*)	0% (3-5 j*) 88% (6-8 j*)	35%
Pourcentage total de spectres correctement identifiés	94%	27%	45%	70%	

*Temps d'incubation avant analyse par MALDI-TOF MS

Les performances d'identification se sont avérées très variables en fonction de la matrice alimentaire et de l'espèce fongique étudiée. Les résultats les plus satisfaisants ont été obtenus pour *M. racemosus*, pour lequel 75% des spectres obtenus à partir des matrices alimentaires ont pu être identifiés correctement. Ces résultats ne sont pas surprenants, car il s'agit d'un champignon filamenteux à croissance rapide, qui sporule abondamment. Il est intéressant de noter que si une identification correcte est obtenue dès 3 jours après culture sur milieu PDA et crème fraîche, les performances ne sont satisfaisantes sur fromage frais qu'à partir de 6 jours d'incubation. Quant au pain de mie, la croissance de *M. racemosus* est visible qu'après 7 jours d'incubation et tous les spectres obtenus à 7 et 8 jours ont été bien identifiés. L'identification de *P. commune* a également été possible sur les trois matrices testées, avec des résultats variables. Sur la crème fraîche, 6 jours d'incubation ont été nécessaires pour obtenir une identification correcte alors qu'une croissance était visible dès 3 jours. De même, pour le pain de mie, les premières identifications correctes n'ont été obtenues qu'à partir de 4 jours d'incubation, avec des pourcentages d'identification faibles (seulement 21% de spectres correctement identifiés). Enfin pour le fromage frais, une identification a pu être obtenue dès 3 jours d'incubation mais de nombreux spectres n'étaient pas correctement assignés à l'espèce. Par comparaison avec *M. racemosus*, *P. commune* se développe plus lentement, même si cette espèce n'est pas considérée comme une moisissure à croissance lente, ce qui

explique peut-être les moins bonnes performances d'identification de cette espèce. Enfin, de moins bons résultats ont été obtenus pour *C. halotolerans*. Pour les deux matrices sur lesquels *C. halotolerans* avaient pu croître, des performances similaires à celles obtenues avec *P. commune* ont été observées, avec seulement 20% de spectres correctement identifiés. Cette espèce est celle qui se développe le moins rapidement parmi les espèces testées. Ces tests préliminaires semblent indiquer qu'il est nécessaire d'attendre un développement important du contaminant fongique pour obtenir une identification fiable, particulièrement pour les espèces fongiques à vitesse de croissance moyenne voire lente. En effet, en l'absence d'un développement suffisant, les spectres sont de qualité suffisante pour permettre leur identification. Toutefois, il est intéressant de noter que le prélèvement direct sur matrice n'a pas conduit à des erreurs d'identification, lorsque seule la biomasse fongique a été prélevée. Pour évaluer l'impact de la matrice, certains spectres ont été acquis sur un mélange biomasse fongique/matrice alimentaire (en prélevant un peu de chaque lors du protocole d'extraction) et les performances d'identification de ces spectres se sont révélées proches de zéro, ce qui semble confirmer l'importance de prélever uniquement de la biomasse fongique pour l'analyse (résultats non montrés). Il sera nécessaire de conduire d'autres essais sur d'autres contaminants fongiques mais également sur d'autres matrices alimentaires pour confirmer les résultats obtenus. En conclusion, ces premiers résultats sont prometteurs et semblent indiquer une possible application de la technique à l'identification directe sans modification du protocole, contrairement aux résultats obtenus par Freimoser et al. (2016). En effet, dans cette étude, une modification du protocole d'extraction avait dû être réalisée afin d'identifier des espèces de *Monilinia* directement à partir de fruits contaminés.

Chapitre 2 : Application de la spectrométrie de masse MALDI-TOF à la différenciation de complexes d'espèces et au typage de champignons filamenteux d'altération – Application aux espèces appartenant à *Aspergillus* section *Flavi* et à *Penicillium roqueforti*

I. Résumé des travaux

Comme évoqué dans le chapitre précédent, les champignons filamenteux sont fréquemment impliqués dans l'altération des denrées alimentaires et représentent une cause majeure de pertes économiques (Filtenborg et al. 1996; Pitt et Hocking 2009). Les champignons filamenteux ont la capacité de se développer sur de nombreux substrats, et certaines espèces peuvent également produire des mycotoxines, représentant ainsi un danger pour la santé humaine et animale (Waśkiewicz, 2014). L'identification de ces contaminants est donc une étape clé dans la maîtrise de la qualité et de la sécurité des denrées alimentaires. Depuis plusieurs années, la spectrométrie de masse MALDI-TOF a été appliquée avec succès à l'identification de micro-organismes, d'abord aux bactéries (Basile et al. 1998) puis aux organismes fongiques (Welham et al. 2000). Aujourd'hui, plusieurs instruments et bases de données spectrales commerciales sont disponibles pour une utilisation en routine de la technique appliquée à l'identification microbienne (Deak et al. 2015). De plus, cette technique a également été appliquée à la discrimination de complexes d'espèces d'intérêt clinique comme le complexe *Fusarium fujikuroi* (Al-Hatmi et al. 2015), qui comprend des espèces cryptiques. Fegan et Prior (2005) ont défini les complexes d'espèces comme des clusters d'isolats très proches, qui peuvent correspondre à une ou plusieurs espèces, tandis que les espèces cryptiques sont des unités biologiques et phylogénétiques qui ne sont pas différenciables morphologiquement (Hawksworth et al. 2006). Dans la plupart des cas, l'identification de ces espèces repose sur l'analyse de plusieurs gènes spécifiques et requiert une expertise pour l'analyse des données (Balasundaram et al. 2015). Ces complexes d'espèces et espèces cryptiques peuvent être problématiques en industrie, notamment concernant la production de mycotoxines. Par exemple, au sein de la section *Flavi* du genre *Aspergillus*, plusieurs espèces très proches sont connues pour produire diverses mycotoxines, notamment *A. flavus*, *A. nomius* et *A. parasiticus* (Baquião et al. 2013). Une autre problématique de cette section est l'identification fiable entre *A. flavus* (toxigène) et *A. oryzae* qui est non-toxigène et utilisée dans la production d'aliments fermentés comme le saké ou la sauce soja. Selon plusieurs auteurs, *A. oryzae* serait une forme domestiquée d'*A. flavus* qui aurait perdu sa capacité à produire des mycotoxines (Gibbons et al. 2012; Chang et al. 2006), voire même un simple écotype d'*A. flavus* et non une espèce distincte (Rokas et al. 2007). Aujourd'hui, l'identification fiable et la classification des espèces du genre *Aspergillus* reposent généralement sur la combinaison de plusieurs méthodes (approche polyphasique) comme l'étude de plusieurs gènes, de la morphologie, des métabolites produits

et/ou encore la capacité à produire des mycotoxines (Frisvad et al. 2019). Quelques études se sont intéressées avec succès à l'application de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification d'espèce proches dans le genre *Aspergillus*, mais la plupart portaient seulement sur une dizaine d'espèces, quand chaque section compte généralement plus de 20 espèces (Gautier et al. 2016). Pour aller plus loin, la spectrométrie de masse MALDI-TOF a également été appliquée avec succès à la discrimination intra-spécifique (typage) de souches bactériennes (Kuhns et al. 2012; Ueda et al. 2015; Fujinami et al. 2011), se révélant un outil aussi fiable que les techniques classiques de typage, basées sur l'analyse de l'ADN (Hafiane et Ravaoarino 2008; Mathimaran et al. 2008). Les techniques généralement utilisées sont la Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE, basée sur la comparaison du profil de restriction des génomes par électrophorèse en champ pulsé), la Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP, basée sur la restriction de l'ADN par des enzymes puis sur la comparaison des fragments générés par électrophorèse), la Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD, basée sur l'amplification aléatoire de l'ADN par des amorces courtes définies arbitrairement), le MultiLocus Sequence Typing (MLST, basée sur la comparaison du polymorphisme nucléotidique de 5 à 7 gènes). Et enfin l'utilisation des microsatellites ou « simple sequence repeats » qui sont de petites séquences nucléotidiques répétées très abondantes dans le génome des eucaryotes, qui peuvent être amplifiées et séquencés afin d'évaluer la diversité génétique. La spectrométrie de masse MALDI-TOF a également été utilisée pour le typage d'organismes d'intérêt industriel comme les levures de brasserie (Lauterbach et al. 2017) ou les bactéries d'altération également retrouvée dans la bière (Kern et al. 2014). Par comparaison aux bactéries, les relations phylogénétiques des organismes fongiques sont plus complexes, et les limites entre espèces plus difficiles à définir, constituant un défi majeur pour le typage des champignons filamenteux (Bader, 2013). Cependant, une méthode de typage fongique rapide et fiable présenterait de nombreux intérêts parmi lesquels une meilleure compréhension des processus de domestication des espèces technologiques, une identification précise de l'origine des champignons filamenteux d'altération ou encore une différenciation des isolats toxigènes et non toxigènes au sein d'une même espèce (Belen-Florez et al., 2007). Au cours des quinze dernières années, plusieurs études ont porté sur la classification des souches de champignons filamenteux, en particulier les isolats technologiques utilisés dans la production fromagère. L'espèce *P. roqueforti* a fait l'objet de plusieurs études (Belen-Florez et al., 2007, Fontaine et al., 2015) qui ont permis via la technique RAPD de classer les souches étudiées en fonction de leur origine (fromage ou environnement). L'utilisation de marqueurs microsatellites (Ropars et al., 2014, Gillot et al.,

2015) a également permis la classification d'isolats de *P. roqueforti* en plusieurs populations génétiques. Via l'utilisation de quatre marqueurs sur 164 isolats de *P. roqueforti*, Gillot et al. (2015) ont pu mettre en évidence 28 haplotypes classés en trois populations distinctes. Alors que la spectrométrie de masse MALDI-TOF a pu être appliquée à la discrimination d'espèces proches et au typage chez les bactéries, peu d'études ont porté sur son application aux champignons filamenteux d'intérêt alimentaire. Dans ce contexte, l'objectif de notre étude était dans un premier temps d'évaluer le potentiel de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification de 23 espèces d'*Aspergillus* appartenant à la section *Flavi*. Puis, dans un deuxième temps, d'évaluer l'application de la technique à la différenciation d'isolats de *P. roqueforti* appartenant à trois populations génétiquement différenciées, décrites par Gillot et al. (2015). Pour cela, des spectres ont été acquis pour 68 souches correspondant à 23 espèces et 7 clades d'*Aspergillus* section *Flavi*. La similarité des spectres obtenus a ensuite été évaluée par une analyse MDS, qui a permis de visualiser les distances entre les spectres des différentes espèces étudiées. Lorsque tous les spectres étaient représentés, trois groupes ont pu être visualisés, deux groupes correspondant aux spectres des espèces du clade *Aspergillus flavus*, ainsi qu'à ceux des espèces des clades *nomius* et *avenaceus*. Deux autres MDS ont donc été réalisés pour représenter plus précisément chacun des deux groupes identifiés. Concernant les espèces du clade *A. flavus*, les spectres d'une même espèce étaient correctement regroupés et la plupart des espèces étaient bien distinguées les unes des autres. Pour les espèces très proches, deux cas ont été observés. Les spectres d'*A. parasiticus* et *A. sojae* présentaient une forte similarité, tandis que les spectres d'*A. flavus* et *A. oryzae* étaient assez éloignés, les spectres d'*A. flavus* présentant plus de similarité avec ceux d'*A. minisclerotigenes* qu'avec ceux d'*A. oryzae*, ces trois espèces figurant dans le même cluster lors de l'analyse combinée de trois gènes (Frisvad et al., 2019). Lors de la représentation des spectres des autres clades étudiés, plusieurs groupes ont pu être identifiés. Les spectres des espèces du clade *A. tamaraii* se sont avérés peu similaires avec trois groupes distincts, un groupe avec les spectres d'*A. tamaraii*, un avec les spectres d'*A. pseudotamaraii*, et un autre groupe avec les spectres de deux espèces proches, *A. caelatus* et *A. pseudocaelatus*. Les spectres de ces espèces présentaient a priori peu de similarité avec les spectres des espèces des autres clades étudiés, qui étaient regroupés au sein d'un même groupe. Les spectres ont ensuite été analysés et intégrés à une base de données spectrales selon la même méthodologie que celle utilisée pour la construction de la base de données spectrales présentée au chapitre 1 des travaux de thèse (Quéro et al., 2018), c'est-à-dire en utilisant l'algorithme ASC. Suite à la construction de la base de données, les performances d'identification ont été évaluées par

validation croisée et plus de 99% des spectres ont été correctement attribués à l'espèce. Aucune confusion n'a été observée entre les spectres appartenant à des clades différents, et au sein d'un même clade, les espèces testées ont également pu être parfaitement séparées. Ces résultats montrent que l'analyse des spectres obtenus par spectrométrie de masse MALDI-TOF a permis une séparation des espèces d'*Aspergillus* section *Flavi* équivalente aux résultats obtenus par une approche polyphasique reposant sur l'analyse combinée de 3 gènes codant respectivement pour la β -tubuline, la calmoduline et le RPB2, sur l'analyse de la morphologie et des métabolites produits (Frisvad et al. 2019). Ces résultats sont très prometteurs quant à l'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour la différenciation et l'identification en routine de complexes d'espèces, il serait toutefois intéressant de poursuivre cette étude avec l'ajout d'autres espèces de la section *Flavi* et également avec une étape de validation externe pour évaluer les performances d'identification sur des isolats non utilisés pour construire la base de données spectrales.

Concernant l'étude portant sur *Penicillium roqueforti*, 63 isolats appartenant à trois populations génétiques ont été choisis parmi les 164 étudiés par Gillot et al. (2015) et des spectres ont été acquis pour chacun de ces isolats. Les spectres étant issus de souches provenant de la même espèce, il a été nécessaire de passer par une double étape de re-calibration des spectres afin de pouvoir obtenir une différenciation optimale de ces derniers. Dans un premier temps, une calibration linéaire a été appliquée, les pics spécifiques de *P. roqueforti* ont été identifiés parmi les spectres présents dans la base de données spectrales commerciale (version 3.2) et ont été recherchés dans les spectres acquis pour notre étude. Parmi ces pics spécifiques, 9 ont été retrouvés dans plus de 70% des isolats et sélectionnés pour évaluer les différences entre les masses théoriques de ces pics et les masses observées dans les spectres acquis, et ainsi corriger les éventuelles déviations de masses mesurées. Après cette étape de re-calibration linéaire, une seconde étape de re-calibration quadratique a été appliquée sur toute la gamme des masses mesurées (3000-20000 Da). Dans cette gamme de masse, 42 pics présents dans 83% des spectres ont été utilisés pour construire un modèle quadratique entre les masses théoriques et observées, permettant un alignement correct des spectres en corrigeant les éventuelles déviations. Pour évaluer l'impact de la re-calibration sur la séparation des spectres, une analyse MDS a été utilisée pour représenter les distances entre ces derniers en fonction de leur similarité. Les spectres ont été représentés avant et après re-calibration. De manière générale, la re-calibration des spectres a permis une meilleure séparation de ces derniers en 3 populations distinctes, les spectres des souches

appartenant à la population 2 étant bien isolés, tandis que ceux des populations 1 et 3 présentaient plus de similarité. Les spectres des souches de la population 2 étaient plus dispersés que ceux des deux autres populations, indiquant une plus grande hétérogénéité de ces derniers, ce qui concorde avec les résultats obtenus par Gillot et al. (2015) qui avaient observé une diversité génétique plus importante au sein de cette population. En effet, la population 2 correspond majoritairement aux souches de *P. roqueforti* ne provenant pas de fromage tandis que les populations 1 et 3 contiennent majoritairement des souches isolées de différents fromages.

Par la suite, les spectres de 42 souches ont été utilisés pour construire une base de données spectrales, les spectres des 21 souches restantes étant destinés à être utilisés pour une étape de validation externe. Après construction de la base de données spectrales, les performances de cette dernière ont été évaluées par validation croisée, ce qui a permis d'obtenir des résultats satisfaisants. En effet, 94,1% des spectres ont été correctement attribués à leur population génétique d'origine. Les spectres des populations 2 et 3 ont été correctement attribués à 96,67% et 98,72% respectivement, tandis que les spectres des souches appartenant à la population 1 ont été correctement attribués à 86,90%. Les 13,1% de spectres incorrectement attribués appartenaient à deux souches, la souche F81, pour laquelle 3 spectres ont été incorrectement attribués à la population 3, 1 spectre n'a été attribué à aucune population et les 2 spectres restants ont été correctement attribués, indiquant une forte variabilité pour les spectres obtenus à partir de cette souche. L'autre souche était la souche F77-1 pour laquelle les 6 spectres acquis ont été incorrectement attribués à la population 2, ce résultat n'étant pas surprenant car lors de la représentation des spectres par analyse MDS, les spectres de cette souche présentaient une forte similarité avec ceux des souches de la population 2.

Suite à la validation croisée, les performances de la base de données spectrales ont également été évaluées par validation externe. Pour cela, les spectres de 21 souches appartenant aux 3 populations ont été analysés pour évaluer la capacité de l'algorithme à les attribuer à la bonne population. De manière générale, les résultats ont été satisfaisants avec 95,24% de spectres correctement attribués. Tous les spectres des souches appartenant aux populations 1 et 2 ont été correctement attribués à l'exception de 4 spectres, correspondant à deux souches pour chacune desquelles deux spectres n'ont été attribués à aucune espèce ou incorrectement attribués. Pour les souches de la population 3, seuls 71,43% des spectres ont été correctement attribués. Les spectres restants appartenaient à deux souches, la souche F28-3, pour laquelle 5 spectres n'ont été attribués à aucune population et 1 spectre a été incorrectement attribué à la

population 2. Concernant la souche UBOCC-A-101449, 3 spectres ont été incorrectement attribués à la population 1, et 3 spectres ont été faiblement discriminés et incorrectement attribués aux populations 1 et 2. Il est intéressant de noter que les souches sélectionnées pour la validation externe l'ont été car elles présentaient des profils alléliques atypiques lors de leur analyse génétique par Gillot et al. (2015). En effet, bien qu'elles aient été attribuées à une des trois populations génétiques, elles ne présentaient pas toutes un profil typique et partageaient parfois des allèles avec les autres populations, ce qui pourrait expliquer la difficulté à les classer dans la bonne population lors de notre analyse. Cependant, les souches aux profils alléliques atypiques des populations 1 et 2 ont été attribuées sans problème à leurs populations respectives lors de la validation externe, indiquant que leurs profils étaient probablement similaires à ceux des spectres référencés dans la base de données.

Pour aller plus loin, et afin de comprendre les différences principales entre les profils des spectres des différentes populations, les intervalles de masses ayant le plus d'impact (positif ou négatif) dans l'attribution des spectres à une population ont été examinés. Tous les intervalles se situaient dans la gamme de masse 3000 à 7116,1 Da et les intervalles ayant le plus d'impact sur l'identification se sont avérés différents pour les 3 populations, sauf pour l'intervalle 3000 à 3004 Da, qui a permis de discriminer la population 3 des deux autres populations. À terme, l'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF en tandem pourrait permettre d'identifier les protéines correspondant à ces intervalles de masses et ainsi déterminer les marqueurs utilisés pour discriminer les 3 populations génétiques.

De manière générale, les résultats obtenus pour *P. roqueforti* lors de notre étude montrent que la spectrométrie de masse MALDI-TOF a permis d'obtenir des résultats similaires à ceux générés par l'analyse génétique de 3 marqueurs microsatellites pour la différenciation d'isolats en trois populations distinctes. De la même manière, l'analyse spectrale de différentes espèces d'*Aspergillus* de la section *Flavi* a généré des résultats d'identification similaires à ceux obtenus par une approche polyphasique impliquant l'analyse de plusieurs caractères comme la morphologie et surtout l'analyse combinée de plusieurs gènes d'intérêt. En conclusion, bien qu'elle ne soit pas basée sur les mêmes marqueurs, la spectrométrie de masse MALDI-TOF s'est avérée presque aussi puissante que l'analyse génétique pour différencier non seulement des espèces fongiques proches, mais également pour discriminer des isolats d'une même espèce en différentes populations. Ces résultats sont très prometteurs et permettent d'élargir le champ des possibles pour les applications de la spectrométrie de masse MALDI-TOF en contexte industriel.

II. Article à soumettre dans *International Journal of Food Microbiology*

Quéro L., Courault P., Cellière B., Lorber S., Jany J., Puel O., Girard V., Vasseur V., Nodet P., Mounier J., 2017. Application of MALDI-TOF MS to species complex differentiation and strain typing of food related fungi : case studies with *Aspergillus* section *Flavi* species and *Penicillium roqueforti* isolates. *To be submitted to International Journal of Food Microbiology*.

1 **Application of MALDI-TOF MS to species complex differentiation and strain typing of**
2 **food related fungi : case studies with *Aspergillus* section *Flavi* species and *Penicillium***
3 ***roqueforti* isolates.**

4
5 Laura Quéro^{a,b}, Priscillia Courault^b, Beatrice Cellière^b, Sophie Lorber^c, Jean-Luc Jany^a,
6 Olivier Puel^c, Victoria Girard^b, Valérie Vasseur^a, Patrice Nodet^a, Jérôme Mounier^a

7
8 ^aUniversité de Brest, EA 3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie
9 Microbienne, LUBEM, ESIAB, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané

10 ^bbioMérieux, R&D Microbiologie, route de Port Michaud, 38390 La Balme les Grottes

11 ^cToxalim, Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, 31027 Toulouse

12
13 **Keywords :** MALDI-TOF MS ; filamentous fungi ; species complex ; strain typing

14
15 **Abstract**

16 Filamentous fungi are one of the main causes of food losses worldwide, with an estimated
17 waste of 1 billion tons each year. Moreover, their ability to produce mycotoxins which can
18 later be found in food and feed products represents a hazard for human and animal health.
19 Their correct and rapid identification is thus crucial to manage food safety. In recent years,
20 MALDI-TOF MS has emerged as a rapid and reliable tool for the identification of fungi both
21 in clinical and industrial context, with the implementation of several commercial spectral
22 databases. Beyond species identification, the technique was also applied to fungal species
23 complex resolution and typing of bacteria and yeasts, but few studies focused on its
24 application to filamentous fungi. Therefore, the aim of this study was first to evaluate the
25 potential of MALDI-TOF MS to accurately identify species of the *Aspergillus Flavi* section,
26 and then to assess if it could differentiate *Penicillium roqueforti* isolates previously described
27 as belonging to three distinct genetic populations. To this end, spectra were acquired for 68
28 strains of *Aspergillus* species from the *Flavi* section, integrated into a spectral database with
29 the ASC algorithm and performances of the database were evaluated by cross validation.
30 More than 99% of the spectra were correctly attributed to the right species even for closely
31 related species like *A. parasiticus* and *A. sojae*. For *P. roqueforti*, spectra were acquired for
32 63 strains and a two-step calibration procedure was applied prior to analysis to allow better
33 spectra alignment and comparison. a spectral database was then constructed and
34 performances were evaluated by cross-validation and external validation. Cross-validation

35 lead to 94% of spectra correctly attributed to the right genetic population and 95% of spectra
36 used for external validation were also attributed to the correct genetic population. Overall,
37 results obtained here suggested very good agreement between MALDI-TOF MS spectra
38 analysis and genetic data analysis for both closely related *Aspergillus* species and *P.*
39 *roqueforti* genetic populations. This study demonstrates the applicability of MALDI-TOF MS
40 as an fast and easy alternative to molecular techniques for species complex differentiation
41 and strain typing of filamentous fungi.

42

43 **1. Introduction**

44 Fungi are frequently involved in food spoilage and represent a major cause of food and
45 economic losses. Indeed, among food losses and waste which represent 1 billion tons each
46 year (FAO, 2011), it is estimated that 5 to 10% of them are due to fungal spoilage (Filtenborg
47 et al. 1996; Pitt and Hocking 2009). Fungi can spoil a large variety of feeds and foods,
48 causing organoleptic properties deterioration such as visible growth on the product surface,
49 off-flavor production, texture and color changes. Moreover, a large number of species such as
50 *Penicillium* and *Aspergillus* spp. are potential mycotoxin producers, and may represent a
51 great hazard for human health (Waśkiewicz, 2014). Hence, rapid and reliable identification
52 of filamentous fungi is a key step for a better management of food safety and quality.

53 For several years now, MALDI-TOF MS has been successfully applied to microorganism
54 identification, from bacteria (Basile et al. 1998) to fungi (Welham et al. 2000) including
55 food-related fungi (Quéro et al. 2018). In the latter study, a spectral database comprising 619
56 strains belonging to 136 species of food interest was built and 90 % correct identification at
57 the species level were achieved after external validation. Several commercial instruments and
58 databases are available (Deak et al. 2015) for routine identification. Besides identification at
59 species level, MALDI-TOF MS has been shown as a powerful tool to discriminate fungal
60 species complex and cryptic fungal species. As an example, Al-Hatmi et al. (2015) were able
61 to correctly identify species of clinical interest belonging to the *Fusarium fujikuroi* complex,
62 some of which being cryptic species. (Allen et al. 2005) defined species complex as a cluster
63 of related isolates which individuals may represent more than one species while cryptic
64 species are morphologically indiscernible biological/phylogenetic units that are only revealed
65 using DNA-based molecular analysis (Hawksworth, 2006). In most cases, the identification
66 of such species requires the analysis of several specific genes and expertise in data analysis
67 (Balasundaram et al. 2015). Species complex are an issue not only in clinical context but also
68 in the food context, particularly regarding mycotoxin production. For example, in the

69 *Aspergillus* genera, and more particularly in the *Flavi* section, species have different
70 mycotoxin production abilities, some species being able to produce B1, B2, G1 and G2
71 aflatoxins (e.g. *A. nomius*, *A. novoparasiticus*, *A. parasiticus*) while others only produce B1
72 and B2 aflatoxins (*A. flavus*, *A. pseudotamarii* and *A. togoensis*) or no aflatoxins (*A.*
73 *caelatus*, *A. subflavus* and *A. tamarii*) (Frisvad et al. 2019). Another challenge within this
74 section is the discrimination between the toxigenic *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* and
75 the non-toxigenic *A. oryzae* and *A. sojae*, the latter being used in the production of numerous
76 fermented products like sake or soy sauce (Gibbons et al. 2012). In order to discriminate
77 these species, MALDI-TOF MS could be a good alternative to molecular techniques and
78 several studies already pointed out its use for different *Aspergillus* sections including the
79 *Flavi* section. For example, Alanio et al. (2011) used MALDI-TOF MS for discriminating 10
80 species of *Aspergillus* section *Fumigati* while (Hettick et al. 2008b) and (De Carolis et al.
81 2012) could differentiate *A. flavus* from *A. parasiticus*, and *A. parasiticus*, *A. flavus* and *A.*
82 *oryzae*, respectively. In a more extensive study, (Rodrigues et al. 2011) could identify 9
83 species of *Aspergillus* section *Flavi* but could not distinguish aflatoxigenic and non-
84 aflatoxigenic isolates of *A. flavus*. However, it should be noted that section *Flavi* currently
85 comprises 33 phylogenetically distinct species as recently shown by Frisvad et al. (2019).
86 To another extent, MALDI-TOF MS could also be of great interest for differentiating strains
87 from a same species, i.e. for strain typing. In the past 10 years, it has been applied to bacteria
88 of different genera and species such as *Salmonella enterica* (Kuhns et al. 2012),
89 *Staphylococcus aureus* (Ueda et al. 2015), *Legionella* spp. (Fujinami et al. 2011) or
90 *Arthrobacter* spp. (Vargha et al. 2006) and could be in some cases as effective as traditional
91 typing methods such as multi-locus sequence typing (MLST) or Pulsed-Field Gel
92 Electrophoresis (PFGE). In a recent study, (Kern et al. 2014) showed the ability of MALDI
93 TOF MS to differentiate *Lactobacillus brevis* isolates at the strain level, and correlations
94 could also be made between spectra classification and strain physiological properties.
95 MALDI-TOF MS typing was also applied to yeasts of clinical interest, for which it could be
96 as powerful as microsatellite markers for monitoring the spread of nosocomial infections
97 (Pulcrano et al. 2012). This technique was also recently applied for the typing of brewing
98 yeast strains allowing their classification into different major beer types (Lauterbach et al.
99 2017) as well as for the typing of 33 wine yeasts which could be sorted according to their
100 genetic background (Usbeck et al. 2014). One of the main challenges of fungal typing is that,
101 as compared to bacteria, their phylogenetic relationships are more complex and species
102 boundaries are not easily drawn (Bader, 2013). Nevertheless, a rapid and reliable method for

103 fungal typing would be of great interest in several contexts, *e.g.*, to help understanding the
104 domestication process and history of numerous species used in industry, for source-tracking
105 of spoilage fungi in the food industry, to differentiate toxigenic and atoxigenic strains of a
106 same species, to discriminate the different strains involved in natural fermentation processes
107 for the selection of starter cultures and for deciphering the tenuous limits between
108 contaminant and biotechnological isolates (Belén Flórez et al. 2007). In the past 15 years,
109 several studies focused on strain-level classification of filamentous fungi with technological
110 interest such as those used in cheese manufacture. Belén Flórez et al. (2007) and Fontaine et
111 al. (2015), using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR, could discriminate, at
112 the intraspecies level, *P. roqueforti* isolates from cheese and environmental origins.
113 Microsatellite markers were also used to investigate the genetic diversity within *Penicillium*
114 *roqueforti* isolates (Ropars et al. 2014; Gillot et al. 2015), and these studies allowed the
115 differentiation of isolates in several genetically divergent populations. For instance, Gillot et
116 al. (2015), using 4 polymorphic microsatellite markers, distinguished 28 haplotypes among a
117 worldwide collection of 164 *P. roqueforti* isolates from cheese and other environments.
118 Furthermore, these 28 haplotypes could be clustered into three well-defined genetically
119 differentiated populations.

120 While there is a strong body of evidence that MALDI-TOF MS can be applied to
121 discriminate closely-related bacterial species and bacterial strains, only few studies have
122 evaluated MALDI-TOF MS as a rapid tool to differentiate closely-related fungal species and
123 strains or genetic populations from a same species. Therefore, the aim of this study was first
124 to evaluate the potential of MALDI-TOF MS to accurately identify 23 closely-related
125 species of *Aspergillus* section *Flavi*, and then to assess whether this technique could be used
126 for discriminating *Penicillium roqueforti* isolates previously shown by Gillot et al. (2015) to
127 belong to three distinct genetic populations.

128

129 **2. Materials and methods**

130 **2.1 Fungal strains and cultivation**

131 Sixty-eight strains belonging to 23 species from the *Aspergillus* section *Flavi* were obtained
132 from different culture collections. They are listed in Table 1.

133 Sixty-three *Penicillium roqueforti* isolates obtained from the Université de Bretagne
134 Occidentale Culture Collection (UBOCC), Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS),
135 Mycology laboratory of the Institute of Hygiene and Epidemiology (IHEM), Mycothèque de
136 l'Université Catholique de Louvain (MUCL), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

137 und Zellkulturen (DSMZ), and Laboratoire Cryptogamie Paris (LCP) collections belonging to
138 28 haplotypes and classified into three genetically distinct populations (1, 2 and 3) were
139 chosen among the 164 isolates which were studied by Gillot et al. (2015). Twenty-one, 22
140 and 20 isolates belonged to population 1, 2 and 3, respectively (Supplementary Table 1).

141
142 To assess viability and purity before spectra acquisition, all strains were first cultivated at
143 25°C on Malt Extract Agar (20 g.L⁻¹ malt extract, 3 g.L⁻¹ yeast extract, 15 g.L⁻¹ agar) and
144 Potato Dextrose Agar (PDA, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), for *Aspergillus* spp. and *P.*
145 *roqueforti*, respectively. Then, they were cultivated on their respective media for 8 days at
146 25°C before spectra acquisition. Three culture replicates were made for each strain.

147

148 **2.2 Sample preparation and spectra acquisition**

149 After cultivation, isolates were processed following the manufacturer's instructions
150 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) as described previously (Quéro et al. 2018). Briefly,
151 fungal biomass was suspended in 70% ethanol, before formic acid/acetonitrile protein
152 extraction and centrifugation. After samples and matrix were deposited on target slides,
153 spectra were acquired using the VITEK MS system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)
154 equipped with the Launchpad V2.8.4 acquisition software. Each sample was analyzed in
155 duplicate.

156 All spectra were acquired in linear positive ion extraction mode in a mass range from 2000 to
157 20,000 Da. Individual spectra were accumulated from 500 laser shots (100 profiles with 5
158 shots per profile) with the 'Auto-Quality' option activated. The system was calibrated
159 externally with fresh cells of *Escherichia coli* ATCC 8739. Raw spectra were automatically
160 processed by smoothing and peak detection procedures implemented in the Launchpad
161 acquisition software (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

162 Raw spectra were then controlled for peak resolution, signal-to-noise ratio and absolute
163 signal intensity as described previously (Girard et al. 2016). The spectra that did not reach the
164 specified quality criteria were discarded.

165

166 **2.3 Discrimination of *Aspergillus* section *Flavi* species complex**

167 Two approaches were used to evaluate the power of MALDI-TOF MS to discriminate
168 *Aspergillus* species from the *Flavi* section. First, a non-supervised approach was used in
169 which the distances between all spectra were determined using the classical multidimensional
170 scaling function (cmdscale) of Matlab (2014, The Mathworks Inc., USA). The calculated

171 distances between spectra were based on the absence or presence of peaks and their
172 intensities. These distances were then visualized using a multidimensional scaling (MDS)
173 graphic. Secondly, a supervised approach was used after building a spectral database with 61
174 strains as previously described (Girard et al. 2016; Quéro et al. 2018). Briefly, peak lists were
175 binned and a predictive model was established using the Advanced Spectra Classifier (ASC)
176 algorithm developed by bioMerieux (Marcy l'Etoile, France). Briefly, the ASC algorithm
177 assigns weights to each bin depending on the absence or presence of a peak. For example, if a
178 peak is always present in a bin for spectra of population 1 and absent in the same bin for the
179 other groups, the algorithm will assign a high positive weight to that bin for classification of
180 unknown spectra. On the contrary, if a peak is always absent for population 1 and present in
181 the other populations, it will have a high negative weight. Moreover, if a peak is either
182 present or absent in spectra of the same population, it will have a low weight as it is poorly
183 discriminant. This decision algorithm was applied to only retain significant matches and a
184 single choice identification was obtained when only one species was retained. When more
185 than one species was retained, a low discrimination result was proposed. In case more than 4
186 species were retained or if no significant match was found, it was considered as a non-
187 identification result.

188 Spectra acquired from 7 species, i.e., *A. bertholletius*, *A. coremiiformis*, *A. cerealis*, *A.*
189 *mottae*, *A. oryzae*, *A. pseudocaelatus* and *A. pseudonomius* were not included in the database
190 as the number of tested strains was not sufficient. Indeed, the ASC algorithm used for
191 database construction requires a minimum of 2 strains per species. Performances of this
192 database were then evaluated by cross-validation as described previously (Quero et al. 2018).
193 The spectral data were randomly split into 5 subsets, 4 subsets used as learning phase and the
194 last one used to validate the identification performances (or in this case, the attribution to the
195 right group). This procedure was repeated 5 times, each subset being used once as a test. A
196 correct identification was defined when the same identification occurred between cross-
197 validation result and the reference identification. Low discrimination results were considered
198 as correct if the expected identification was included in the matches. A misidentification
199 result was defined as a discordant identification between the cross-validation result and the
200 reference identification.

201

202

203 **2.4 Discrimination of *Penicillium roqueforti* isolates**

204 Prior to similarity comparison of spectra and database construction, a two-step calibration
205 was applied on all spectra, involving a linear calibration step to correct any possible global
206 mass shift and a quadratic calibration step on the spectra entire mass range.

207 For linear calibration, specific MS peaks of *P. roqueforti* spectra were used. To do so, MS
208 spectra of *P. roqueforti* isolates recorded in the bioMérieux commercial database (version
209 3.2) were screened for specific MS peaks, which were then searched in the spectra acquired
210 in the present study. Thirteen specific MS peaks with masses ranging from 3704.84 to
211 14431.15 Da were found. Then, only MS peaks present in more than 70% of isolates
212 belonging to two of the three genetic populations were kept which led to the selection of 9
213 MS peaks with a mass of 3704.84, 3746.12, 4972.23, 6242.47, 6777.90, 6840.56, 7409.58,
214 7437.67 and 14431.14 Da. The selected theoretical MS peaks were then compared to those
215 observed in the spectra acquired in the present study, allowing the application of a linear
216 model to correct eventual mass deviations. After mass correction with linear calibration, a
217 quadratic calibration was applied. For this calibration step, the entire mass range (3000-20000
218 Da) was targeted, in which masses ranging between 3000 and 6000 Da, 6000 and 10000 Da
219 and 10000 and 20000 Da were screened using a 1-,2- and 3-Da interval, respectively. For
220 quadratic calibration, mass tolerance was more restrictive than previously and only MS peaks
221 present in more than 83% of isolates belonging to two of the three genetic populations were
222 kept. These selected masses which included 42 MS peaks (data not shown) were then used to
223 build a quadratic model between theoretical and observed masses, allowing a good alignment
224 of spectra.

225
226 A spectral database in which the spectra derived from *P. roqueforti* isolates were assigned to
227 one of the three genetic populations identified by Gillot et al. (2015) was then implemented,
228 using an algorithm derived from the ASC one (unpublished data).

229 Performances of this database were first evaluated by cross-validation as described above and
230 database performances were also evaluated by external validation using 21 strains not used to
231 build the database. Spectra derived from these strains were used to challenge the database to
232 assess whether they could be correctly assigned to the correct genetic population.

233

234

235 3. Results and discussion

236 3.1 Evaluation of MALDI-TOF MS for discriminating *Aspergillus* section *Flavi* species

237 The distances between spectra of all the tested species can be visualized in Figure 1, which
238 shows the results of MDS analysis for all spectra (Figure 1A), spectra of the *A. flavus*-clade
239 (Figure 1B) and spectra from the other clades (Figure 1C). Overall, spectra from each species
240 were quite well separated (Figure 1A). Based on spectra similarity, 3 groups of species could
241 be distinguished except for spectra of *A. pseudotamarii* which stood apart from these groups
242 (Figure 1A). The first two groups (group A and B, Figure 1A) contained spectra of all species
243 of the *A. flavus*-clade with the exception of *A. mottae* and *A. oryzae* as well as spectra from
244 *A. pseudonomius* and *A. avenaceus* from the *nomius*- and *avenaceus*-clade. Interestingly,
245 Group B contained all species that are closely phylogenetically related to *A. parasiticus*,
246 namely *A. arachidicola*, *A. novoparasiticus*, *A. transmontanensis*, *A. sojae* and *A. sergii*. All
247 of these species are considered in the literature as pertaining to the *A. parasiticus*-clade
248 (Rodrigues et al. 2011; Carvajal-Campos et al. 2017). It is worth mentioning that the separate
249 grouping of *A. parasiticus*-clade MALDI-TOF MS spectra from other *A. flavus*-clade species
250 was also reported by Rodrigues et al. (2011) but on a smaller number of species. Group C
251 contained all the species from the other clades.

252 When only representing spectra from species of the *A. flavus*-clade (Figure 1B), it can be
253 observed that most of these species were clearly separated. Interestingly, spectra of *A. flavus*
254 and *A. oryzae* (the likely domesticated form of *A. flavus*) clearly stood apart despite their very
255 close phylogenetic relatedness (Frisvad et al. 2019), reflecting the fact that *A. oryzae*
256 expressed many proteins that differed from those of *A. flavus*. Indeed, it is well established
257 that domestication of *A. flavus* has led to important genetic and functional changes in its
258 metabolism (Gibbons et al. 2012). Instead, spectra of *A. oryzae* were more similar to those of
259 *A. minisclerotigenes* which is also closely phylogenetically related to *A. oryzae* (Frisvad et
260 al., 2019). In contrast to *A. flavus* and *A. oryzae*, spectra profiles of *A. parasiticus* and its
261 likely domesticated form, *A. sojae*, shared much more common characteristics. Figure 1C
262 shows the distance between spectra of the 11 other tested species belonging to the other
263 clades of *Aspergillus* section *Flavi*. Spectra of species from the *A. tamarii*-clade were
264 completely separated from the other ones but not grouped together. Indeed, spectra of *A.*
265 *tamarii* and *A. pseudotamarii* were clearly separated from each other while those of *A.*
266 *caelatus* and *A. pseudocaelatus* were more similar. Though they belonged to different clades,
267 spectra of the remaining species were grouped together except those of *A. pseudonomius*
268 stains and *A. avenaceus* which were grouped together. Overall, spectra of the tested species

269 were quite well separated, indicating that it should be possible to differentiate and identify
270 them using a supervised approach.

271 Spectra of the 16 species which were represented by at least two strains were integrated into
272 the bioMérieux spectral database and identification performances were assessed by cross-
273 validation (Table 2). Overall, more than 99% of spectra (271/272) were assigned to the
274 correct species. Only one spectrum of *A. novoparasiticus* was not identified, and one
275 spectrum of *A. avenaceus* was attributed to both *A. avenaceus* and *A. flavus*. These results
276 show that, even if the species of *Aspergillus* section *Flavi* tested here are closely related, their
277 spectra are sufficiently different to yield correct identification when implemented into a
278 spectral database and analyzed with the ASC algorithm. Results obtained here are of
279 particular interest, especially for *A. parasiticus* and *A. sojae* whose spectra were perfectly
280 separated and identified during cross-validation. It should be noted that these species are very
281 similar from a morphological point of view; cannot be distinguished from each other based
282 only on gene sequencing of taxonomic markers such as β -tubulin, calmodulin and RPB2
283 genes and an extrolite analysis is necessary to differentiate them (i.e., in contrast to *A.*
284 *flavus*, *A. sojae* does not produce aflatoxins and aflatrem) (Frisvad et al. 2019). In the same
285 way, *A. parasiticus* and *A. novoparasiticus* were shown to share similar β -tubulin sequences,
286 requiring the sequencing of other specific genes for identification (Frisvad et al. 2019),
287 whereas the analysis of their MS spectra was enough to discriminate them. This analysis also
288 allowed separation of aflatoxin-producing species (*A. aflatoxiformans*, *A. arachidicola*, *A.*
289 *flavus*, *A. luteovirescens*, *A. minisclerotigenes*, *A. nomius*, *A. novoparasiticus*, *A. parasiticus*,
290 *A. pseudotamarii*, *A. sergii*, *A. transmontanensis*) from non-aflatoxin producing ones (*A.*
291 *avenaceus*, *A. caelatus*, *A. leporis*, *A. sojae*, *A. tamarii*). To our best knowledge, this is the
292 first time that as many species of the *Flavi* section are studied and correctly identified by
293 MALDI-TOF MS analysis. Indeed, several papers focused on the identification of
294 *Aspergillus* section *Flavi* species of clinical interest such as *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. nomius* or
295 *A. tamarii* and though a separate clustering of species was obtained using hierarchical
296 analysis, no commercial databases were able to accurately identify them (De Carolis et al.
297 2012; Li et al. 2017; Masih et al. 2016; Park et al. 2017; Rodrigues et al. 2011; Tam et al.
298 2014). This underlines the need of expanding spectral databases to reach good identification
299 performances.

300 Regarding the results obtained in the present study, MALDI-TOF MS spectra analysis
301 appeared as powerful as the polyphasic approach commonly used to identify *Aspergillus*
302 species of this section which may include morphological, physiological, molecular and/or

303 extrolite data analysis (Frisvad et al., 2019). These results are very promising even though
304 they are based on a relatively low number of strains and spectra. The next step would be to
305 integrate more species and strains to the database and also to challenge the database with
306 external isolates, in order to assess if spectra and strains that were not used to build the
307 database can be correctly identified.

308

309 **3.2 Evaluation of MALDI-TOF MS for typing of *P. roqueforti* isolates**

310 **3.2.1 Two-step calibration**

311 Screening of the experimental spectra led to the selection of 58 MS peaks present in all
312 spectra and among these MS peaks, 42 were present in more than 83% of isolates belonging
313 to 2 of the 3 genetic populations and were used in the quadratic model for spectra alignment.

314

315 **3.2.2 Similarity comparison and effect of calibration on the grouping of *P. roqueforti* 316 isolates**

317 The distances between all spectra according to their genetic populations and the impact of
318 calibration on the separation of these three populations can be visualized in Figure 2 which
319 shows the results of MDS analysis before (Figure 2A) and after calibration (Figure 2B).
320 Overall, there was a good separation of *P. roqueforti* MS spectra according to their respective
321 genetic population and the two-step calibration approach applied in the present study
322 improved separation of these spectra, thus confirming the potential of MALDI-TOF MS to
323 discriminate filamentous fungi at the intraspecific level when combined with recalibration.
324 Indeed, *P. roqueforti* isolates from population 2 were clearly separated from those of
325 populations 3 and 1 (Figure 2B), even though, for the latter population, spectra from few
326 strains, e.g., strain F77-1 which belonged to population 1, showed a high similarity with other
327 spectra from population 2. It is also worth mentioning that spectra derived from population 2
328 isolates, in contrast to population 1 and 3 spectra, showed a high heterogeneity, as underlined
329 by the distances between spectra of population 2 isolates. It was especially true for spectra
330 derived from strain F41-4 that formed a separated group from other population 2 isolates. A
331 higher genetic diversity was also reported in isolates from this population as compared to
332 other populations in the study of Gillot et al. (2015), which confirms the results obtained
333 here. Indeed, population 2 contained almost all non-cheese isolates which harbored a larger
334 number of allelic profiles to that of cheese isolates (Gillot et al. 2015). Moreover, cheese
335 isolates from this population were systematically retrieved from a given Protected
336 Designation of Origin (PDO) or Protected Geographical Indication (PGI) cheese type (i.e.

337 Roquefort, Bleu d’Auvergne and Bleu de Gex). The two-step calibration approach used in the
338 present study also improved separation of spectra derived from populations 1 and 3 isolates
339 which mainly corresponded to cheese isolates from different PDO or PGI, with population 3
340 and 1 isolates originating mainly from Gorgonzola-Type cheeses and other cheeses (i.e.
341 Stilton, Cabrales, Danablu, Fourme d’ambert Bleu de Gex and Jihoceska Niva), respectively.
342 It is also worth mentioning that, as previously reported by Gillot et al. (2015), a common
343 macroscopic aspect was observed within population 3 isolates, with both a velvety to weakly
344 floccose texture and a light greenish gray to pale green color. As shown in Figure 2B, spectra
345 of several isolates from these two populations could not be clearly distinguished using MDS
346 analysis underlining the fact that they shared highly similar MS profiles and therefore
347 expressed features. The fact that spectra derived from populations 1 and 3 isolates shared
348 quite similar MS profiles may be explained by the fact that most isolates from these 2
349 populations were cheese isolates, which have been selected by cheese producers and/or by the
350 natural conditions prevailing during cheese ripening (Gillot et al. 2015). Similar results were
351 also obtained after investigating the relationship between the intraspecific variability of the
352 biological response to temperature and a_w and the different genetic populations within the
353 selected *P. roqueforti* strains (Nguyen et al. submitted).

354

355 **3.2.3 Database construction and validation**

356 To go further in the assessment of the MALDI-TOF MS discriminative power at the
357 intraspecific level, a database was constructed with 252 spectra, representing 42 strains, with
358 14, 15 and 13 isolates belonging to populations 1, 2 and 3, respectively. Cross-validation
359 results are shown in Table 3. Overall, the results of cross-validation showed that 94.1% of all
360 spectra (235 out of 252 spectra) were correctly assigned to their corresponding genetic
361 population. All spectra derived from population 2 and 3 isolates were either correctly
362 assigned to the right population (96.67-98.72 % of all spectra) or not identified at all (3.33-
363 1.28 % of all spectra corresponding to 3 and 1 spectra, respectively). These non-identified
364 spectra were derived from strain F41-4 from population 2 and strain F34-1 from population 3.
365 Other spectra derived from these strains were correctly assigned to their respective genetic
366 population. Identification performances of spectra derived from population 1 isolates were
367 lower than those obtained with the other two populations with 84.52% of spectra (71 out of
368 84 spectra) correctly assigned. The two spectra which yielded low discrimination results
369 corresponded to two spectra of strain F84, that were either attributed to population 1 and 3
370 while other spectra of this strain were correctly identified. One of the two unidentified spectra

371 with no identification results corresponded to one spectrum of strain F21-1, for which the
372 other five spectra were correctly assigned. The second one corresponded to one spectrum of
373 strain F81, for which three other spectra yielded discordant results as they were attributed to
374 population 3, while the last two were correctly assigned to population 1. Finally, the six
375 incorrectly assigned spectra belonged to strain F77-1 for which all spectra were incorrectly
376 assigned to population 2. This result could be explained by the fact that this isolate had MS
377 spectra which were more similar to those of several population 2 isolates (Figure 2B).

378 For external validation, 126 spectra corresponding to 21 independent isolates including 7
379 isolates from each genetic population, were used to challenge the database. The results are
380 shown in Table 4. 95.24 % of all spectra (110 out of 126 spectra) were correctly assigned to
381 their corresponding population. Spectra acquired from external isolates from populations 1
382 and 2 were all correctly assigned, with the exception of one spectrum from the strain
383 IHEM3196 and F53 from population 1 and two spectra from strain LCP03969 from
384 population 2. Finally, for external isolates from population 3, 71.43% of spectra (30 out of 42
385 spectra) were accurately assigned to their respective population. All incorrectly assigned
386 spectra (either yielding no or discordant identification) belonged to strains F28-3 and
387 UBOCC-A-101449. For strain F28-3, five out of six spectra were not identified, and the last
388 one was incorrectly attributed to population 2 while for strain UBOCC-A-101449, three out
389 of six spectra were incorrectly identified to population 1 and the other three were assigned to
390 both populations 1 and 2 by the algorithm. Interestingly, when looking in details at the allelic
391 profiles of strains F28-3 and UBOCC-A-101449, we observed that the 2 strains, despite being
392 classified in population 3 by Gillot et al. (2015), shared 1 similar allele with that of isolates
393 from population 2 and 1, respectively. Hence, it could explained why their assignment to the
394 right population was problematic.

395 Noteworthy, several strains from populations 1 and 2 that were chosen for external validation
396 also shared common alleles with isolates from other populations (Gillot et al. 2015). Indeed,
397 strains IHEM3196 and F53, that were assigned to population 1 by Gillot et al. (2015), also
398 shared 1 common allele with isolates from population 2, while strains UBOCC-A-111178,
399 DSMZ1999 and UBOCC-A-111170, assigned to population 2 by Gillot et al. (2015) shared 2
400 common alleles with population 2 and for the two other alleles, presented alleles that were
401 different from those of other isolates from population 3. Nevertheless, spectra of these
402 isolates were correctly assigned after external validation suggesting that their MS peak
403 profiles were much more closely related to that of the isolates which were used to build the
404 database.

405 As indicated in the ‘Materials and methods’ section, for database construction, peak lists of
406 spectra from each population were binned and a predictive model was established. In order to
407 understand what were the main differences in the MS spectra of the three *P. roqueforti*
408 populations, we investigated which bins (or mass-intervals) had a high impact (positive or
409 negative) for population assignment. The two bins that had the higher and lower impact on
410 population assignment are shown in Table 5. All these bins had masses ranging from 3000 to
411 7716.1 Da. In comparison, Hettick et al. (2008) found differences between spectra of
412 *Aspergillus flavus* isolates in a mass range from 7000 to 10000 Da, but in contrast to the
413 present study in which the ASC algorithm was used, such comparison was performed on
414 whole spectra based on peak lists. It is also interesting to note that high-impact weights for
415 population 2 were slightly higher than those of the two other populations and that overall,
416 high-impact bins were different depending on the population, except for the [3000.0;3004.0]
417 bin which allowed to discriminate population 3 isolates from population 1 and 2 isolates
418 (Table 5). Thus, it would be of great interest to look closer into the different bins that allowed
419 population separation during MALDI-TOF MS analysis, especially those which were
420 identified by the algorithm as having a high-impact weight. The application of MALDI-TOF
421 MS/MS could help to determine the exact m/z of proteins which allowed to discriminate *P.*
422 *roqueforti* isolates at the population level as performed previously by Freimoser et al. (2016)
423 on different *Monilinia* species. Then, after comparison with theoretical masses of proteins
424 predicted from available sequenced genomes of *P. roqueforti*, it may be possible to identify
425 which are the proteins (and their functions) that permit to discriminate one population from
426 another. However, such comparison can lead to the identification of several different proteins
427 for one single peak because different proteins can share the same m/z value (Spinali et al.
428 2015).

429 Altogether, these results suggest that there is a very good agreement between genetic data and
430 MS peak profiles and that MALDI-TOF MS could be used as a rapid tool for typing of *P.*
431 *roqueforti* isolates using a dataset of well characterized isolates at the intraspecific level.
432 Indeed, MALDI-TOF MS was able to highlight intra-specific polymorphism and yielded
433 similar results to those obtained from genetic analysis based on the study of three
434 microsatellites markers of *Penicillium roqueforti* isolates. In addition, it was even possible to
435 assign external isolates to the right populations by constructing a spectral database. However,
436 two strains which possessed allelic profiles found in other genetic populations, could not be
437 classified accurately with the approach used in the present study. Despite a very good
438 agreement between genetic data and MS profiles, it must be noted that that differentiation

439 between the three populations is not made on the same markers in each analysis. Indeed,
440 genetic analysis is based on microsatellite markers, short and repeated DNA sequences
441 (Mathimaran et al. 2008), while MALDI-TOF MS detects predominantly ribosomal proteins
442 and other proteins, that are constantly expressed and highly abundant (Santos et al. 2010).

443

444 In conclusion, the results obtained in this study, together with those previously published by
445 Quéro et al. (2018) confirm that MALDI-TOF MS can be a powerful tool to differentiate and
446 identify filamentous fungi not only at the species level but can also be applied to differentiate
447 species complex and cryptic species as well populations from a same species. This method
448 could be of great interest for the management of mycological safety and quality of foods.
449 Indeed, correct species identification of moulds is of high importance and the possibility of
450 going beyond species identification could also be a valuable asset for source tracking of fungi
451 in the food chain.

452

453 **Acknowledgements**

454 This work was done as part of a CIFRE PhD funded by bioMérieux and the French
455 Association for Research and Technology (ANRT) [Convention #2015/0821] in collaboration
456 with the LUBEM laboratory.

457

458 **Conflict of interest**

459 LQ, PC, BC and VG are employees of bioMérieux, a company developing and selling *in vitro*
460 diagnostic assays including the VITEK MS used in this study.

461

462 **References**

463 Alanio, A., J. -L. Beretti, B. Dauphin, E. Mellado, G. Quesne, C. Lacroix, A. Amara, P. Berche, X.
464 Nassif, and M. -E. Bougnoux. 2011. "Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight
465 Mass Spectrometry for Fast and Accurate Identification of Clinically Relevant *Aspergillus* Species."
466 *Clinical Microbiology and Infection* 17 (5): 750–55. [https://doi.org/10.1111/j.1469-](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03323.x)
467 [0691.2010.03323.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03323.x).

468 Al-Hatmi, Abdullah MS, Anne-Cécile Normand, Anne D van Diepeningen, Marijke Hendrickx, G
469 Sybren de Hoog, and Renaud Piarroux. 2015. "Rapid Identification of Clinical Members of *Fusarium*
470 *Fujikuroi* Complex Using MALDI-TOF MS." *Future Microbiology* 10 (12): 1939–52.
471 <https://doi.org/10.2217/fmb.15.108>.

472 Allen, C., Ph Prior, and A. C. Hayward, eds. 2005. *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia*
473 *Solanacearum Species Complex*. St. Paul, Minn: American Phytopathological Society.

474 Bader, Oliver. 2013. "MALDI-TOF-MS-Based Species Identification and Typing Approaches in
475 *Medical Mycology*." *PROTEOMICS* 13 (5): 788–99. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200468>.

476 Balasundaram, Sudhagar V., Ingeborg B. Engh, Inger Skrede, and Håvard Kauserud. 2015. "How
477 Many DNA Markers Are Needed to Reveal Cryptic Fungal Species?" *Fungal Biology* 119 (10): 940–
478 45. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.07.006>.

479 Basile, Franco, Michael B Beverly, Kent J Voorhees, and Ted L Hadfield. 1998. "Pathogenic
480 Bacteria: Their Detection and Differentiation by Rapid Lipid Profiling with Pyrolysis Mass
481 Spectrometry." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 17 (2): 95–109. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(97\)00103-9](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(97)00103-9).

483 Belén Flórez, Ana, Pablo Álvarez-Martín, Teresa María López-Díaz, and Baltasar Mayo. 2007.
484 "Morphotypic and Molecular Identification of Filamentous Fungi from Spanish Blue-Veined Cabrales
485 Cheese, and Typing of *Penicillium Roqueforti* and *Geotrichum Candidum* Isolates." *International*
486 *Dairy Journal* 17 (4): 350–57. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.04.002>.

487 Carvajal-Campos, Amaranta, Ama Lethicia Manizan, Souria Tadrast, David Koffi Akaki, Rose Koffi-
488 Nevry, Geromy G. Moore, Stephen O. Fapohunda, et al. 2017. "Aspergillus Korhogoensis, a Novel
489 Aflatoxin Producing Species from the Côte d'Ivoire." *Toxins* 9 (11).
490 <https://doi.org/10.3390/toxins9110353>.

491 De Carolis, Elena, Antonietta Vella, Ada R. Florio, Patrizia Posteraro, David S. Perlin, Maurizio
492 Sanguinetti, and Brunella Posteraro. 2012. "Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time
493 of Flight Mass Spectrometry for Caspofungin Susceptibility Testing of *Candida* and *Aspergillus*
494 Species." *Journal of Clinical Microbiology* 50 (7): 2479–83. <https://doi.org/10.1128/JCM.00224-12>.

495 Deak, Eszter, Carmen L. Charlton, April M. Bobenchik, Shelley A. Miller, Simon Pollett, Ian H.
496 McHardy, Max T. Wu, and Omai B. Garner. 2015. "Comparison of the Vitek MS and Bruker
497 Microflex LT MALDI-TOF MS Platforms for Routine Identification of Commonly Isolated Bacteria
498 and Yeast in the Clinical Microbiology Laboratory." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*
499 81 (1): 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.018>.

500 Filtenborg, O., J. C. Frisvad, and U. Thrane. 1996. "Moulds in Food Spoilage." *International Journal*
501 *of Food Microbiology, Specific Spoilage Organisms*, 33 (1): 85–102. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01153-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01153-1).

503 Fontaine, Kévin, Nolwenn Hymery, Marlène Z. Lacroix, Sylvie Puel, Olivier Puel, Karim Rigalma,
504 Vincent Gaydou, Emmanuel Coton, and Jérôme Mounier. 2015. "Influence of Intraspecific Variability
505 and Abiotic Factors on Mycotoxin Production in *Penicillium Roqueforti*." *International Journal of*
506 *Food Microbiology* 215 (December): 187–93. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.021>.

507 Freimoser, Florian Matthias, Maja Hilber-Bodmer, René Brunisholz, and David Drissner. 2016.
508 "Direct Identification of *Monilinia* Brown Rot Fungi on Infected Fruits by Matrix-Assisted Laser

509 Desorption/Ionization (MALDI) Mass Spectrometry.” *Chemical and Biological Technologies in*
510 *Agriculture* 3 (1): 7. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0058-4>.

511 Frisvad, J. C., V. Hubka, C. N. Ezekiel, S. -B. Hong, A. Nováková, A. J. Chen, M. Arzanlou, et al.
512 2019. “Taxonomy of *Aspergillus* Section *Flavi* and Their Production of Aflatoxins, Ochratoxins and
513 Other Mycotoxins.” *Studies in Mycology* 93 (June): 1–63.
514 <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.06.001>.

515 Fujinami, Yoshihito, Hitomi S. Kikkawa, Yohei Kurosaki, Koichi Sakurada, Mineo Yoshino, and Jiro
516 Yasuda. 2011. “Rapid Discrimination of *Legionella* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
517 Time-of-Flight Mass Spectrometry.” *Microbiological Research* 166 (2): 77–86.
518 <https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.02.005>.

519 Gibbons, John G., Leonidas Salichos, Jason C. Slot, David C. Rinker, Kriston L. McGary, Jonas G.
520 King, Maren A. Klich, David L. Tabb, W. Hayes McDonald, and Antonis Rokas. 2012. “The
521 Evolutionary Imprint of Domestication on Genome Variation and Function of the Filamentous Fungus
522 *Aspergillus Oryzae*.” *Current Biology: CB* 22 (15): 1403–9.
523 <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.033>.

524 Gillot, Guillaume, Jean-Luc Jany, Monika Coton, Gaétan Le Floch, Stella Debaets, Jeanne Ropars,
525 Manuela López-Villavicencio, et al. 2015. “Insights into *Penicillium Roqueforti* Morphological and
526 Genetic Diversity.” *PLOS ONE* 10 (6): e0129849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129849>.

527 Girard, Victoria, Sandrine Mailler, Martin Welker, Maud Arsac, Béatrice Cellière, Pierre-Jean Cotte-
528 Pattat, Sonia Chatellier, et al. 2016. “Identification of *Mycobacterium* Spp. and *Nocardia* Spp. from
529 Solid and Liquid Cultures by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–time of Flight Mass
530 Spectrometry (MALDI-TOF MS).” *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 86 (3): 277–83.
531 <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.07.027>.

532 Hawksworth, David L. 2006. “Pandora’s Mycological Box: Molecular Sequences vs. Morphology in
533 Understanding Fungal Relationships and Biodiversity.” *Revista Iberoamericana De Micologia* 23 (3):
534 127–33.

535 Hettick, Justin M., Brett J. Green, Amanda D. Buskirk, Michael L. Kashon, James E. Slaven, Erika
536 Janotka, Françoise M. Blachere, Detlef Schmechel, and Donald H. Beezhold. 2008. “Discrimination
537 of *Aspergillus* Isolates at the Species and Strain Level by Matrix-Assisted Laser
538 Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Fingerprinting.” *Analytical Biochemistry*
539 380 (2): 276–81. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.05.051>.

540 Kern, Carola C., Rudi F. Vogel, and Jürgen Behr. 2014. “Differentiation of *Lactobacillus Brevis*
541 Strains Using Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry with
542 Respect to Their Beer Spoilage Potential.” *Food Microbiology* 40 (June): 18–24.
543 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.11.015>.

544 Kuhns, Martin, Andreas E. Zautner, Wolfgang Rabsch, Ortrud Zimmermann, Michael Weig, Oliver
545 Bader, and Uwe Groß. 2012. “Rapid Discrimination of *Salmonella Enterica* Serovar Typhi from Other

546 Serovars by MALDI-TOF Mass Spectrometry.” *PloS One* 7 (6): e40004.
547 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040004>.

548 Lauterbach, Alexander, Julia C. Usbeck, Jürgen Behr, and Rudi F. Vogel. 2017. “MALDI-TOF MS
549 Typing Enables the Classification of Brewing Yeasts of the Genus *Saccharomyces* to Major Beer
550 Styles.” *PLOS ONE* 12 (8): e0181694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181694>.

551 Li, Ying, He Wang, Yu-Pei Zhao, Ying-Chun Xu, and Po-Ren Hsueh. 2017. “Evaluation of the
552 Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry
553 System for Identification of *Aspergillus* Species Directly from Growth on Solid Agar Media.”
554 *Frontiers in Microbiology* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01209>.

555 Masih, Aradhana, Pradeep K. Singh, Shallu Kathuria, Kshitij Agarwal, Jacques F. Meis, and
556 Anuradha Chowdhary. 2016. “Identification by Molecular Methods and Matrix-Assisted Laser
557 Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry and Antifungal Susceptibility Profiles of
558 Clinically Significant Rare *Aspergillus* Species in a Referral Chest Hospital in Delhi, India.” *Journal*
559 *of Clinical Microbiology* 54 (9): 2354–64. <https://doi.org/10.1128/JCM.00962-16>.

560 Mathimaran, Natarajan, Laurent Falquet, Kurt Ineichen, Cyril Picard, Dirk Redecker, Thomas Boller,
561 and Andres Wiemken. 2008. “Microsatellites for Disentangling Underground Networks: Strain-
562 Specific Identification of *Glomus* Intraradices, an Arbuscular Mycorrhizal Fungus.” *Fungal Genetics*
563 *and Biology* 45 (6): 812–17. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.02.009>.

564 Park, Ju Heon, Jong Hee Shin, Min Ji Choi, Jin Un Choi, Yeon-Joon Park, Sook Jin Jang, Eun Jeong
565 Won, et al. 2017. “Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Fight Mass
566 Spectrometry for Identification of 345 Clinical Isolates of *Aspergillus* Species from 11 Korean
567 Hospitals: Comparison with Molecular Identification.” *Diagnostic Microbiology and Infectious*
568 *Disease* 87 (1): 28–31. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.10.012>.

569 Pitt, John, and Ailsa Hocking. 2009. *Fungi and Food Spoilage*. 3rd ed. New York, USA: Springer
570 Science & Business media.

571 Pulcrano, G., E. Roscetto, V. D. Iula, D. Panellis, F. Rossano, and M. R. Catania. 2012. “MALDI-
572 TOF Mass Spectrometry and Microsatellite Markers to Evaluate *Candida Parapsilosis* Transmission in
573 Neonatal Intensive Care Units.” *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*:
574 Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology 31 (11): 2919–28.
575 <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1642-6>.

576 Quéro, Laura, Victoria Girard, Audrey Pawtowski, Sylvie Tréguer, Amélie Weill, Sandrine Arend,
577 Béatrice Cellière, et al. 2018. “Development and Application of MALDI-TOF MS for Identification
578 of Food Spoilage Fungi.” *Food Microbiology*, May. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.05.001>.

579 Rodrigues, P., C. Santos, A. Venâncio, and N. Lima. 2011. “Species Identification of *Aspergillus*
580 Section *Flavi* Isolates from Portuguese Almonds Using Phenotypic, Including MALDI-TOF ICMS,
581 and Molecular Approaches.” *Journal of Applied Microbiology* 111 (4): 877–92.
582 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05116.x>.

583 Ropars, Jeanne, Manuela López-Villavicencio, Joëlle Dupont, Alodie Snirc, Guillaume Gillot,
584 Monika Coton, Jean-Luc Jany, Emmanuel Coton, and Tatiana Giraud. 2014. "Induction of Sexual
585 Reproduction and Genetic Diversity in the Cheese Fungus *Penicillium Roqueforti*." *Evolutionary*
586 *Applications* 7 (4): 433–41. <https://doi.org/10.1111/eva.12140>.

587 Santos, C., R. R. M. Paterson, A. Venâncio, and N. Lima. 2010. "Filamentous Fungal
588 Characterizations by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass
589 Spectrometry." *Journal of Applied Microbiology* 108 (2): 375–85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04448.x>.

591 Spinali, Sébastien, Alex van Belkum, Richard V. Goering, Victoria Girard, Martin Welker, Marc Van
592 Nuenen, David H. Pincus, Maud Arsac, and Géraldine Durand. 2015. "Microbial Typing by Matrix-
593 Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: Do We Need Guidance for
594 Data Interpretation?" *Journal of Clinical Microbiology* 53 (3): 760–65.
595 <https://doi.org/10.1128/JCM.01635-14>.

596 Tam, Emily W. T., Jonathan H. K. Chen, Eunice C. L. Lau, Antonio H. Y. Ngan, Kitty S. C. Fung,
597 Kim-Chung Lee, Ching-Wan Lam, Kwok-Yung Yuen, Susanna K. P. Lau, and Patrick C. Y. Woo.
598 2014. "Misidentification of *Aspergillus Nomius* and *Aspergillus Tamarii* as *Aspergillus Flavus*:
599 Characterization by Internal Transcribed Spacer, β -Tubulin, and Calmodulin Gene Sequencing,
600 Metabolic Fingerprinting, and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass
601 Spectrometry." *Journal of Clinical Microbiology* 52 (4): 1153–60.
602 <https://doi.org/10.1128/JCM.03258-13>.

603 Ueda, O., S. Tanaka, Z. Nagasawa, H. Hanaki, T. Shobuike, and H. Miyamoto. 2015. "Development
604 of a Novel Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrum (MALDI-
605 TOF-MS)-Based Typing Method to Identify Meticillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Clones."
606 *Journal of Hospital Infection* 90 (2): 147–55. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.11.025>.

607 Usbeck, Julia C., Caroline Wilde, Dave Bertrand, Jürgen Behr, and Rudi F. Vogel. 2014. "Wine Yeast
608 Typing by MALDI-TOF MS." *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (8): 3737–52.
609 <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5586-x>.

610 Vargha, Márta, Zoltán Takáts, Allan Konopka, and Cindy H. Nakatsu. 2006. "Optimization of
611 MALDI-TOF MS for Strain Level Differentiation of *Arthrobacter* Isolates." *Journal of*
612 *Microbiological Methods* 66 (3): 399–409. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.01.006>.

613 Waśkiewicz, A. 2014. "MYCOTOXINS | Natural Occurrence of Mycotoxins in Food." In
614 *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, edited by Carl A. Batt and Mary Lou
615 Tortorello, 880–86. Oxford: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00231-7>.

616 Welham, K. J., M. A. Domin, K. Johnson, L. Jones, and D. S. Ashton. 2000. "Characterization of
617 Fungal Spores by Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry." *Rapid*
618 *Communications in Mass Spectrometry* 14 (5): 307–10. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(20000315\)14:5<307::AID-RCM823>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(20000315)14:5<307::AID-RCM823>3.0.CO;2-3).

620 Table 1 : *Aspergillus* spp. isolates from *Aspergillus* section *Flavi* analyzed by MALDI-TOF MS in the
 621 present study.

Clade	Species	Strain number	Origin substrate
<i>Avenaceus</i>	<i>Aspergillus avenaceus</i>	NRRL 517 ^T	Green pea
		NRRL 4517	Unknown
<i>Bertholletius</i>	<i>Aspergillus bertholletius</i>	CCT 7615 ^T	Rain forest soil
<i>Coremiiformis</i>	<i>Aspergillus coremiiformis</i>	NRRL 13603 ^T	Soil
<i>Flavus</i>	<i>Aspergillus aflatoxiformans</i> (<i>ex A. parvisclerotigenus</i>)	CBS 121.62	Arachis hypogea
		SF1	Rain forest soil
		SF6	Rain forest soil
<i>Flavus</i>	<i>Aspergillus arachidicola</i>	UBOCC-A-117374 = CBS 117612	Arachis glabrata leaf
		UBOCC-A-117375 = CBS 117611	Arachis glabrata leaf
		UBOCC-A-117376 = CBS 117614	Arachis glabrata leaf
		UBOCC-A-117377 = CBS 117615	Arachis glabrata leaf
		UBOCC-A-117373 = CBS 117610 ^T	Arachis glabrata leaf
<i>Flavus</i>	<i>Aspergillus cerealis</i> (<i>ex A. korhogoensis</i>)	NRRL 66708	Peanut pods
<i>Flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	UBOCC-A-108068 = LCP 89.4253	Molten cheese
		UBOCC-A-108067 = CBS 100927 ^T	Cellophane
		UBOCC-A-101061	Pig feed
		UBOCC-A-101063	Cotton oil cake
		UBOCC-A-106028	Wheat
		UBOCC-A-106029	Pig feed
		UBOCC-A-106030	Wheat
		UBOCC-A-106031	Maize
		UBOCC-A-106032	Barley
UBOCC-A-106033	Poultry feed		
<i>Flavus</i>	<i>Aspergillus minisclerotigenes</i>	UBOCC-A-117303 = CBS 117635 ^T	Arachis hypogea seed
		UBOCC-A-117304 = CBS 117633	Arachis hypogea seed
		UBOCC-A-117305 = CBS 117634	Arachis hypogea seed
		UBOCC-A-117306 = CBS 117620	Arachis hypogea seed
		UBOCC-A-117307 = CBS 117639	Arachis hypogea seed
		NRRL 29000	Peanut soil
<i>Flavus</i>	<i>Aspergillus mottae</i>	MUM 10.231 ^T	Maize kernel
<i>Flavus</i>	<i>Aspergillus novoparasiticus</i>	AFc32 = NRRL 62795	Cassava
		UBOCC-A-117379 = CBS 126850	Air sample
		UBOCC-A-117378 = CBS 126849 ^T	Human sputum
		LEMI 267	Human sputum
<i>Flavus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	CBS 100925 ^T	Unknown
<i>Flavus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>	UBOCC-A-111038 = CBS 100308	Unknown
		UBOCC-A-111039	Unknown
		UBOCC-A-111041 = CBS 971.97	Indian sweets
		UBOCC-A-110223 = CBS 100926 ^T	Sugar cane mealy bug
		NRRL 492	Unknown

Clade	Species	Strain number	Origin substrate
<i>Flavus</i>	<i>Aspergillus sergii</i>	MUM 10.219 ^T MUM 10.251	Prune fruit Almond shell
<i>Flavus</i>	<i>Aspergillus sojae</i>	CBS 134.52 CBS 100928 ^T	Soy sauce Soy sauce
<i>Flavus</i>	<i>Aspergillus transmontanensis</i>	MUM 10.205 MUM 10.214 ^T	Almond Almond
<i>Leporis</i>	<i>Aspergillus leporis</i>	NRRL 3216 ^T NRRL 6599	Dung of <i>Lepus townsensii</i> Soil
<i>Nomius</i>	<i>Aspergillus luteovirescens</i> (ex <i>A bombycis</i>)	NRRL 25010 NRRL 25593	Frass in silkworm house Frass in silkworm house
<i>Nomius</i>	<i>Aspergillus nomius</i>	CBS 123901 NRRL 13137 ^T NRRL 6552	Keratitis Wheat Pine sawfly
<i>Nomius</i>	<i>Aspergillus pseudonomius</i>	NRRL 3353 ^T	Diseased alkali bee
<i>Tamarii</i>	<i>Aspergillus caelatus</i>	CBS 763.97 ^T NRRL 25568	Soil Soil
<i>Tamarii</i>	<i>Aspergillus pseudocaelatus</i>	CBS 117616 ^T	Arachis burkartii leaf
<i>Tamarii</i>	<i>Aspergillus pseudotamarii</i>	CBS 766.97 ^T CBS 117628 NRRL 443 NRRL 25518	Teafield soil Teafield soil Unknown Teafield soil
<i>Tamarii</i>	<i>Aspergillus tamarii</i>	UBOCC-A-110176 = CBS 104.13 ^T UBOCC-A-110179 = CBS 104.14 UBOCC-A-110219 = CBS 129.49 UBOCC-A-110225 = CBS 590.68 UBOCC-A-111043 UBOCC-A-111045 UBOCC-A-111046	Charcoal Tomato Coffee tree seed Nutmeg Charcoal Coffee tree seed Nutmeg

622 ^TType strain

623 UBOCC, Université de Bretagne Occidentale Culture Collection ; CBS, Centraalbureau voor

624 Schimmelcultures Collection ; MUM, Micoteca da Universidad do Minho ; NRRL, National Center

625 for Agricultural Utilization Research

626 Table 2 : Identification performances of *Aspergillus* section *Flavi* species after cross-
627 validation.

Species	Overall correct	Single choice	Low discrimination	No identification	Discordant
<i>A. aflatoxiformans</i>	100% (11/11)*	100% (11/11)	0% (0/11)	0% (0/11)	0% (0/11)
<i>A. arachidicola</i>	100% (18/18)	100% (18/18)	0% (0/18)	0% (0/18)	0% (0/18)
<i>A. avenaceus</i>	100% (10/10)	90% (9/10)	10% (1/10)	0% (0/10)	0% (0/10)
<i>A. luteovirescens</i>	100% (12/12)	100% (12/12)	0% (0/12)	0% (0/12)	0% (0/12)
<i>A. caelatus</i>	100% (12/12)	100% (12/12)	0% (0/12)	0% (0/12)	0% (0/12)
<i>A. flavus</i>	100% (38/38)	100% (38/38)	0% (0/38)	0% (0/38)	0% (0/38)
<i>A. leporis</i>	100% (12/12)	100% (12/12)	0% (0/12)	0% (0/12)	0% (0/12)
<i>A. minisclerotigenes</i>	100% (25/25)	100% (25/25)	0% (0/25)	0% (0/25)	0% (0/25)
<i>A. nomius</i>	100% (12/12)	100% (12/12)	0% (0/12)	0% (0/12)	0% (0/12)
<i>A. novoparasiticus</i>	95% (19/20)	95% (19/20)	0% (0/20)	5% (1/20)	0% (0/20)
<i>A. parasiticus</i>	100% (20/20)	100% (20/20)	0% (0/20)	0% (0/20)	0% (0/20)
<i>A. pseudotamarii</i>	100% (24/24)	100% (24/24)	0% (0/24)	0% (0/24)	0% (0/24)
<i>A. sergii</i>	100% (11/11)	100% (11/11)	0% (0/11)	0% (0/11)	0% (0/11)
<i>A. sojae</i>	100% (12/12)	100% (12/12)	0% (0/12)	0% (0/12)	0% (0/12)
<i>A. tamarii</i>	100% (26/26)	100% (26/26)	0% (0/26)	0% (0/26)	0% (0/26)
<i>A. transmontanensis</i>	100% (9/9)	100% (9/9)	0% (0/9)	0% (0/9)	0% (0/9)
Global performances	99.65% (271/272)	99.3% (270/272)	0.35% (1/272)	0.35% (1/272)	0% (0/272)

628 *number of spectra out of the total number of spectra acquired

629 Table 3 : Classification performance of *P. roqueforti* isolates into three genetic populations after
 630 cross-validation.

Population	Overall correct	Single choice	Low discrimination	No identification	Discordant
1	86.9 % (73/84)*	84.52% (71/84)	2.38% (2/84)	2.38% (2/84)	10.71% (9/84)
2	96.67 % (87/90)	96.67% (87/90)	0% (0/90)	3.33% (3/90)	0% (0/90)
3	98.72 % (77/78)	98.72% (77/78)	0% (0/78)	1.28% (1/78)	0% (0/78)
Total	94.1 % (237/252)	93.3% (235/252)	0.79% (2/252)	2.33% (6/252)	3.57% (9/252)

631 *number of spectra out of the total number of spectra acquired

632

633 Table 4 : Classification performance of *P. roqueforti* isolates into three genetic populations after
 634 external validation.

Population	Correct identification	No identification	Discordant
1	95.24% (40/42)*	4.76% (2/42)	0% (0/42)
2	95.24% (40/42)	2.38% (1/42)	2.38% (1/42)
3	71.43% (30/42)	11.90% (5/42)	16.67% (7/42)
Total	87.3% (110/126)	6.35% (8/126)	6.35% (8/126)

635 *number of spectra out of the total number of spectra acquired

636

637 Table 5 : List of bins allowing classification with the ACS algorithm of *P. roqueforti* isolates into
 638 three distinct genetic population after MALDI-TOF MS analysis.

	High positive weight group 1	High negative weight group 1	High positive weight group 3	High negative weight group 3
High negative weight group 2	[4423.3;4429.3]* [3938.5;3943.8]		[3943.8;3949.1] [3382.8;3387.3]	
High positive weight group 2		[7208.4;7218.1] [6470.0;6478.6]		[3000;3004] [7705.8;7716.1]
High negative weight group 3	[3000.0;3004.0] [44423.3;4429.3]			
High positive weight group 3		[5410.7;5417.9] [3056.6;3060.6]		

639

640 *Mass range in Da

641 Supplementary Table 1 : *P. roqueforti* isolates analysed by MALDI-TOF MS in the present study,
 642 origin, haplotype and genetic population as determined by Gillot et al. (2015).

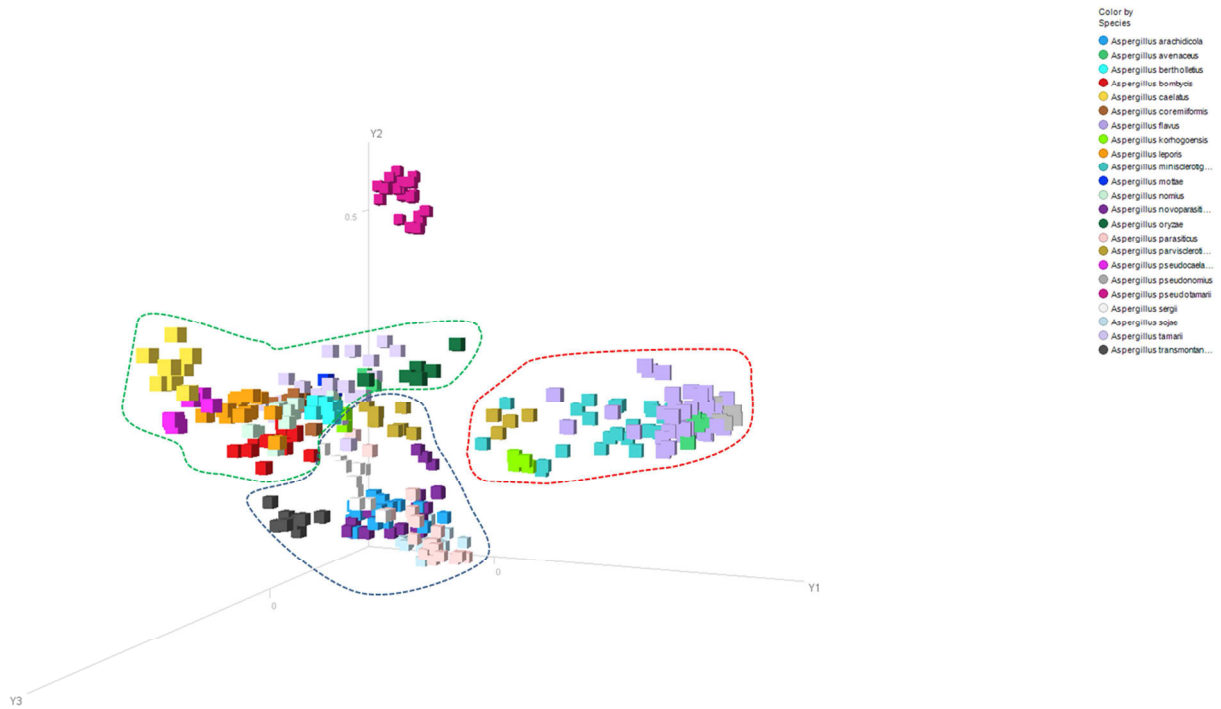
Strain number	Origin substrate	Haplotype number	Genetic population
IHEM 3196*	Human sputum	13	1
F20-1	Cabrales cheese	14	1
F21-1	Cabrales cheese	14	1
F24-2*	Blue cheese	14	1
PTX.PR.8.4	Blue cheese	14	1
UBOCC-A-111277*	Pitted prunes	14	1
F75-6	Blue cheese	14	1
F77-1	Blue Stilton cheese	14	1
F81	Jihoceska Niva cheese	14	1
F89*	Danablu cheese	14	1
F9-1	Fourme d' Ambert cheese	15	1
F15-3*	Blue cheese	15	1
F26-2	Blue cheese	15	1
PTX.PR.6.1	Blue cheese	15	1
PTX.PR.20.2	Blue cheese	15	1
PTX.PR.22.2	Bleu de Gex cheese	15	1
F54	Blue cheese	15	1
F84	Jihoceska Niva cheese	15	1
F36-1	Blue cheese	15	1
PTX.PR.19.1*	Blue cheese	17	1
F53*	Blue cheese	21	1
DSMZ 1999*	Beef meat	1	2
UBOCC-A-111170*	Surface (dairy industry)	2	2
CBS 304.97	Mozarella cheese	3	2
MUCL 18048	Cork	4	2
F52	Blue cheese	5	2
F18-6	Blue cheese	6	2
F41-4	Bleu d' Auvergne cheese	6	2

Strain number	Origin substrate	Haplotype number	Genetic population
PTX.PR.11.2*	Roquefort cheese	6	2
PTX.PR.18.3	Roquefort cheese	6	2
F43-1	Roquefort cheese	7	2
F65	Blue cheese	8	2
UBOCC-A-110052	Olive brine	9	2
UBOCC-A-111178*	Air (dairy industry)	10	2
CBS 112579	Sulphite liquor	19	2
MUCL 35036	Wood in process of drying in the open air	20	2
CBS 498.73	Apple	22	2
UBOCC-A-109090	Apricot preparation	23	2
UBOCC-A-111033	Corn silage	25	2
LCP 03969*	Fruit compote	26	2
CBS 221.30*	Roquefort cheese	27	2
PTX.PR.27.2*	Bleu de Gex cheese	28	2
UBOCC-A-111172	Air (dairy industry)	28	2
F28-3*	Blue cheese	11	3
F2-1	Blue cheese	12	3
F6-1*	Gorgonzola cheese	12	3
F6-3*	Gorgonzola cheese	12	3
F7-1	Gorgonzola cheese	12	3
F8-1	Gorgonzola cheese	12	3
F28-1	Blue cheese	12	3
F29-1	Soft ripened cheee	12	3
F30-1*	Blue cheese	12	3
F33-1	Soft ripened cheese	12	3
F34-1	Blue cheese	12	3
PTX.PR.13.6*	Blue cheese	12	3
PTX.PR.13.7	Blue cheese	12	3
FM164*	Gorgonzola cheese	12	3

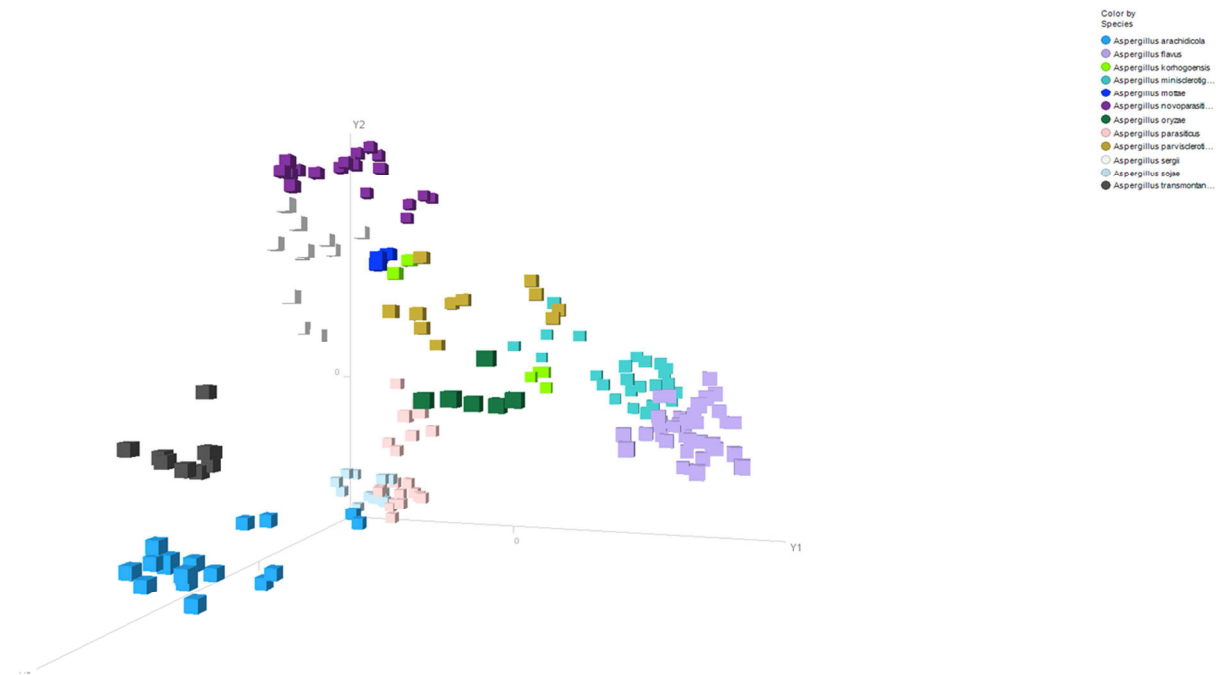
Strain number	Origin substrate	Haplotype number	Genetic population
F59-2	Blue cheese	12	3
F60-1	Blue cheese	12	3
F61-6	Blue cheese	12	3
F62-4	Blue cheese	12	3
F74-3	Soft ripened cheese	12	3
UBOCC-A-101449*	Fruit preparation	18	3

643 *Strain used for external validation of the database

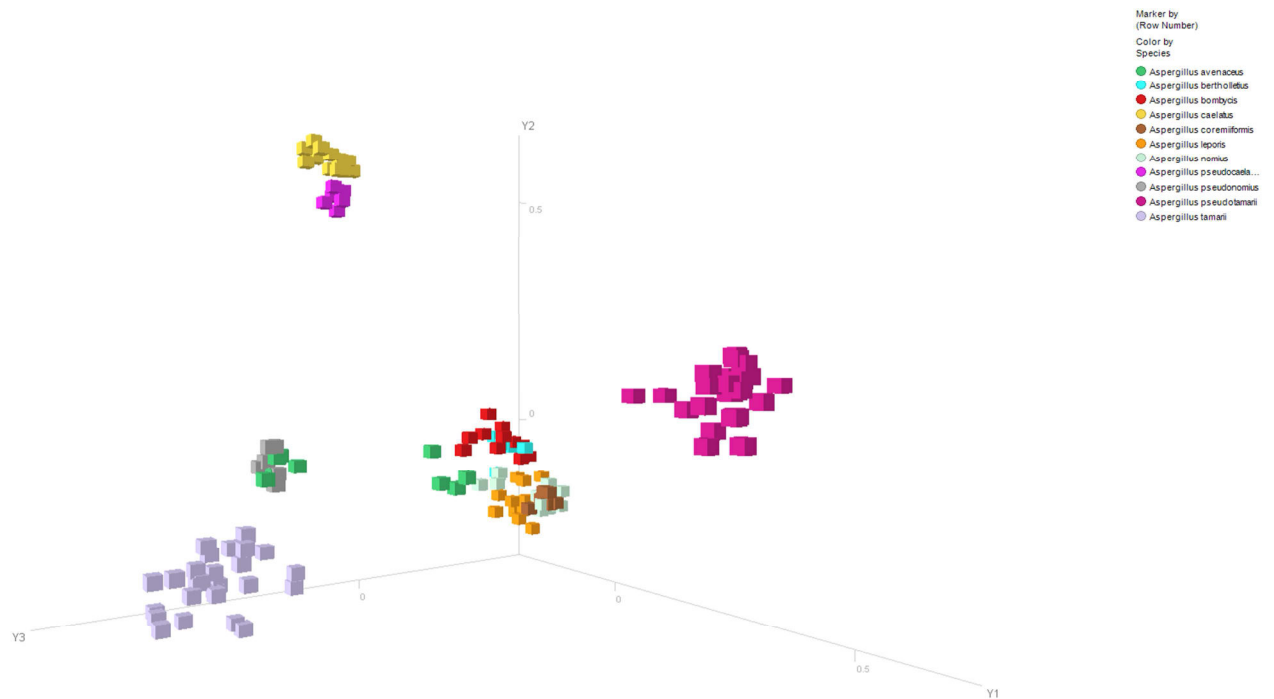
644 UBOCC, Université de Bretagne Occidentale Culture Collection ; CBS, Centraalbureau voor
645 Schimmelcultures Collection ; IHEM, Mycology laboratory of the Institute of Hygiene and
646 Epidemiology ; MUCL, Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain ; DSMZ, Deutsche
647 Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen ; LCP, Laboratoire Cryptogamie Paris.



648
 649 Figure 1A : Multidimensional scaling (MDS) of the spectra dataset obtained after MALDI-TOF MS
 650 analysis of 23 species of *Aspergillus* belonging to the *Flavi* section. Spectra are colored according to
 651 the respective species to which they belong. Spectra circled in dashed-red, dashed-blue and dashed
 652 green correspond to spectra of group A, B and C, respectively.
 653

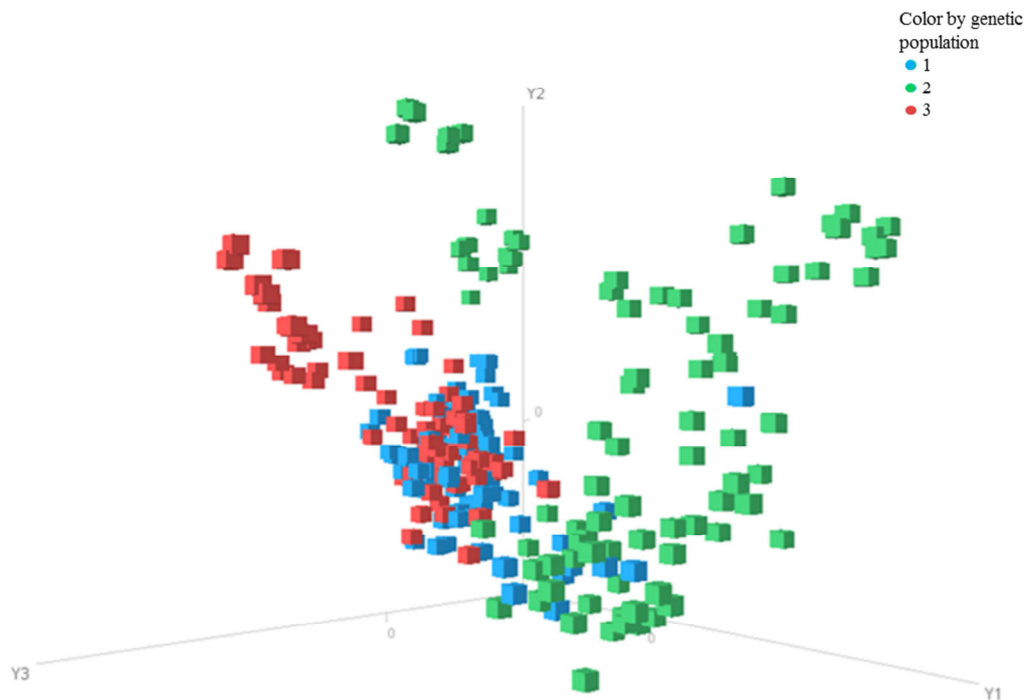


654
 655 Figure 1B : Multidimensional scaling (MDS) of the spectra dataset obtained after MALDI-TOF MS
 656 analysis of 12 species of *Aspergillus* belonging to the *A. flavus* clade of *Flavi* section. Spectra are
 657 colored according to the respective species to which they belong.



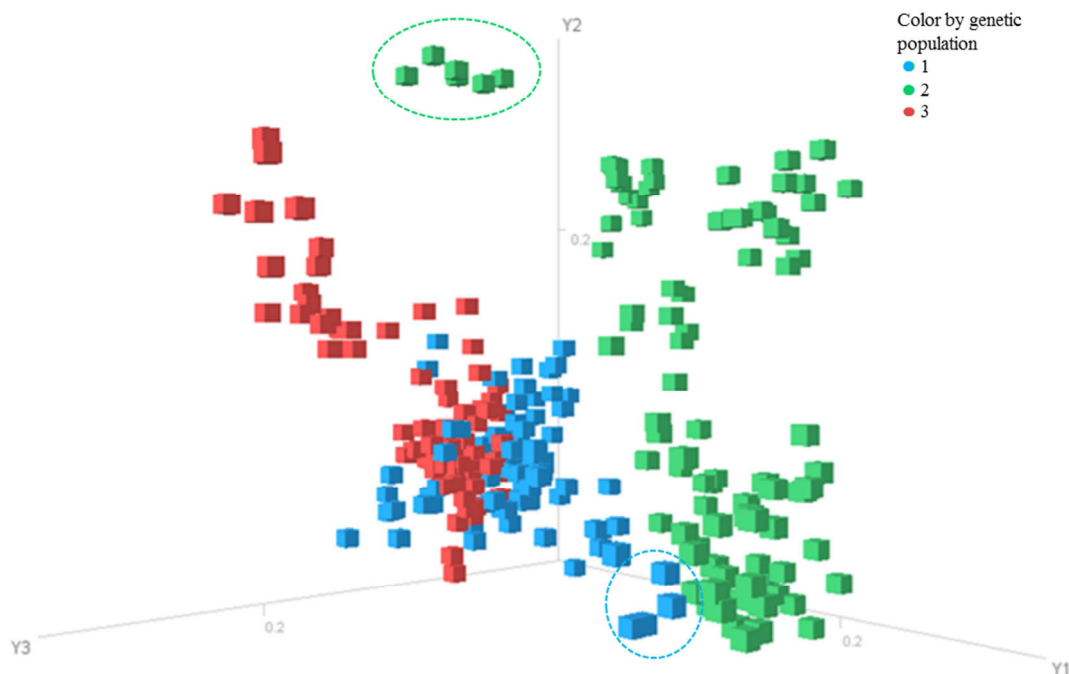
658
659
660
661
662
663

Figure 1C : Multidimensional scaling (MDS) of the spectra dataset obtained after MALDI-TOF MS analysis of 11 species of *Aspergillus* belonging to the *A. tamarai*, *A. berholletius*, *A. nomius*, *A. coremiiformis*, *A. leporis* and *A. avenaceus* clades of *Flavi* section. Spectra are colored according to the respective species to which they belong.



664
665
666
667
668
669
670

Figure 2A : Multidimensional scaling (MDS) of the spectra dataset obtained after MALDI-TOF MS analysis of *P. roqueforti* isolates based on 6 replicates per strain (3 biological replicates and 2 technical replicates), before calibration of the spectra. Spectra are colored according to the respective genetic populations to which the isolates belong.



671
672
673
674
675
676
677

Figure 2B : Multidimensional scaling (MDS) of the spectra dataset obtained after MALDI-TOF MS analysis of *P. roqueforti* isolates based on 6 replicates per strain (3 biological replicates and 2 technical replicates), after calibration of the spectra. Spectra are colored according to the respective genetic populations to which the isolates belong. Spectra circled in dashed-green and -blue correspond to spectra from *P. roqueforti* F41-4 and F77-1 respectively.

Chapitre 3 : Evaluation de la néphélogométrie laser comme méthode haut-débit pour déterminer la résistance fongiques aux conservateurs – Etude préliminaire

I. Résumé des travaux

Afin de prévenir et de contrôler les altérations fongiques des produits alimentaires, de nombreuses méthodes peuvent être utilisées comme par exemple l'application de traitements thermiques, le conditionnement sous atmosphère modifiée, ou encore l'ajout de conservateurs. Au sein des conservateurs, les acides organiques faibles tels que les acides benzoïque et sorbique sont généralement ajoutés sous la forme de sels pour faciliter leur solubilisation dans les aliments, et leur activité est dépendante du pH des aliments. Ces acides sont utilisés dans de nombreux produits alimentaires comme les produits de boulangerie et les boissons. Dans d'autres produits et particulièrement les fromages et salaisons, la natamycine est un antibiotique de la famille des polyènes, et peut être appliquée en surface afin de prévenir leur altération par les organismes fongiques. Cependant, l'utilisation prolongée des conservateurs à des concentrations sub-inhibitrices peut conduire au développement de tolérances à ces derniers chez les champignons filamenteux (Piper et al. 2011). C'est pourquoi il est crucial de déterminer la réponse des contaminants fongiques aux conservateurs couramment utilisés, afin de détecter d'éventuelles résistances, mais également afin de pouvoir adapter les concentrations utilisées. Pour évaluer l'impact de facteurs abiotiques sur la croissance fongique, plusieurs méthodes peuvent être mises en place comme le suivi de la germination des spores ou la mesure de croissance radiale. Ces méthodes sont peut-être fastidieuses, surtout lorsque de nombreuses conditions doivent être testées, et longues, notamment pour le suivi de croissance radiale qui peut être effectué sur plusieurs semaines. Dans ce contexte, des méthodes alternatives ont été évaluées, comme les méthodes spectrophotométriques, basées sur la mesure de densité optique (DO) mais l'inconvénient majeur de ces méthodes est que la relation DO / densité cellulaire n'est proportionnelle que pour de faibles valeurs de DO (Meletiadis et al. 2003). La technique de néphélométrie laser, quant à elle, ne souffre pas de cet inconvénient car elle est basée sur la mesure de la lumière dispersée. Son utilisation pour mesurer la croissance fongique a été décrite par Joubert et al. (2010), et une relation linéaire entre la mesure des unités relatives néphélométriques (RNU) et la mesure du poids sec a été établie chez *Alternaria alternata*. Cette technique a également été appliquée pour évaluer l'efficacité de composés antifongiques contre *Aspergillus fumigatus* et *Alternaria dauci* (Joubert et al. 2010, Lecomte et al. 2012).

Dans ce contexte, l'objectif de notre étude était d'évaluer le potentiel de la néphélométrie laser comme outil haut-débit pour suivre la croissance fongique en présence de conservateurs,

et d'évaluer si les cinétiques obtenues pouvaient être utilisées pour estimer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de ces conservateurs.

Pour cela, 64 souches fongiques appartenant à 14 espèces de champignons filamenteux fréquemment retrouvés en tant que flore d'altération ont été sélectionnées. La croissance de ces souches a ensuite été mesurée par néphélométrie laser en présence de 3 conservateurs, le benzoate de sodium, le sorbate de potassium et la natamycine, à différentes concentrations. Les cinétiques de croissance obtenues ont ensuite été ajustées avec un modèle primaire pour déterminer les paramètres de croissance μ_{\max} (taux de croissance maximale) et λ (temps de latence) dans chacune des conditions testées. Les paramètres de croissance obtenus ont ensuite été ajustés avec un modèle secondaire en fonction des concentrations testées de conservateur afin d'estimer leur concentration minimale inhibitrice (CMI). Enfin, les CMI estimées avec le modèle secondaire ont été validées en milieu liquide et en milieu solide pour 6 souches appartenant à 3 espèces fongiques. Pour ce faire, la capacité à croître, aux bornes supérieures et inférieures de l'intervalle de confiance des valeurs de CMI estimées a été évaluée.

La néphélométrie laser s'est avérée être un outil efficace pour suivre la croissance fongique pour la plupart des souches testées avec l'obtention de cinétiques de croissance répétables et utilisables pour déterminer les paramètres μ_{\max} et λ . Cependant, une formation d'enchevêtrements de mycélium assimilés à des pellets a été observée au cours de la croissance des souches testées d'*Aspergillus niger* et d'une souche de *Cladosporium sphaerospermum* en présence de benzoate de sodium, et chez les souches de *Penicillium brevicompactum* dans toutes les conditions, même en l'absence de conservateur. La présence de pellets dans les puits n'a pas permis d'obtenir des cinétiques de croissance exploitables pour en déterminer les paramètres associés. En effet, l'acquisition des données en néphélométrie repose sur la mesure de la lumière dispersée en un point central du puits, et donc nécessite une répartition homogène de la biomasse afin d'obtenir une mesure représentative, ce qui n'était pas le cas lors de la formation de pellets. Une alternative pour pallier à cet inconvénient pourrait être d'effectuer la mesure en plusieurs points du puits et de moyenniser les valeurs obtenues, mais cette fonctionnalité n'était pas disponible sur l'instrument utilisé. La formation de pellets est un phénomène connu lors de la culture en milieu liquide des champignons filamenteux et certains auteurs ont démontré qu'il était possible de réduire leur formation en modifiant les paramètres d'incubation comme l'agitation ou la taille de l'inoculum (Nielsen et al. 1995). Il est intéressant de noter que les

souches d'*A. niger* et de *C. sphaerospermum* n'ont formé des pellets qu'en présence de benzoate de sodium, indiquant qu'il pourrait s'agir d'une réponse au stress provoqué par l'ajout de conservateur, la formation de pellet procurant potentiellement une protection aux cellules fongiques comme cela peut être observé chez les levures ou les bactéries se développant sous forme de biofilms (Chandra et al. 2001).

De manière générale, la natamycine était le conservateur le plus antifongique, suivie par le sorbate de potassium et le benzoate de sodium. Plusieurs espèces, notamment *Cladosporium halotolerans* et *Fusarium domesticum*, se sont avérées très sensibles au benzoate de sodium et au sorbate de potassium, avec une inhibition totale de leur croissance dès la première concentration testée. *Penicillium bialowiezense* était quant à lui, très sensible à la natamycine. Par conséquent, le modèle secondaire n'a pas pu être utilisé pour estimer les CMI de ces espèces.

L'effet des acides organiques était variable selon les espèces étudiées. Pour le benzoate de sodium, les CMI estimées allaient de 0,25 g/L pour les espèces les plus sensibles (*C. halotolerans* et *F. domesticum*) à 1,8 g/L pour *A. niger* qui s'est avérée être l'espèce la plus tolérante. Pour les autres espèces étudiées, plusieurs cas ont été observés. Certaines espèces, *Aspergillus* et *Mucor* spp., *Penicillium commune* et *Penicillium roqueforti*, présentaient une forte tolérance au benzoate de sodium avec des CMI supérieures ou égales à 1 g/L. Les autres espèces testées de *Penicillium*, *C. sphaerospermum* et *Rhizopus stolonifer* avaient une résistance intermédiaire avec des CMI comprises entre 0,5 et 0,83 g/L. Concernant les paramètres de croissance, une concentration croissante de benzoate de sodium diminuait μ_{\max} chez toutes les souches étudiées, tandis que le λ des souches d'*A. niger*, *A. flavus*, *P. commune* et *P. roqueforti* n'était pas influencé par la présence de benzoate de sodium.

Concernant le sorbate de potassium, les CMI estimées se trouvaient entre 0,1 g/L pour les espèces les plus sensibles (*C. halotolerans* et *F. domesticum*) et 0,7 g/L pour *P. roqueforti*. Pour les autres espèces, deux groupes ont été observés, avec des espèces sensibles dont les CMI étaient comprises entre 0,22 et 0,3 g/L (*A. versicolor*, *C. sphaerospermum*, *P. bialowiezense*, *P. chrysogenum* et *P. commune*) et des espèces plus tolérantes dont les CMI étaient comprises entre 0,34 et 0,6 g/L (*A. flavus*, *A. niger*, *M. circinelloides*, *M. racemosus* et *P. brevicompactum*). Concernant les paramètres de croissance, le sorbate de potassium engendrait une augmentation du temps de latence chez toutes les souches testées sauf chez une souche de *P. commune*, tandis que μ_{\max} n'était impacté chez aucune des espèces étudiées.

Dans l'ensemble, les CMI estimées des acides faibles étaient du même ordre de grandeur que celles obtenues dans d'autres études (Le Lay et al. 2016, Lopez-Malo et al. 2005), bien que celles-ci soient légèrement inférieures à celles de la littérature. Il est à noter que la plupart des CMI retrouvées dans la littérature ont été déterminées en milieu solide, dans certains cas, sur des milieux de composition différente à celui utilisé lors de cette étude et avec des inoculums de concentrations différentes.

Concernant la natamycine, les CMI estimées étaient comprises entre 1,25 mg/L pour *P. bialowiezense* et 7,5 mg/L pour *R. stolonifer*. La plupart des espèces testées (9 sur 14) se sont avérées relativement sensibles avec des CMI comprises entre 1,25 et 3,5 mg/L tandis que les 5 espèces restantes étaient plus tolérantes, avec des CMI comprises entre 4 et 7,5 mg/L. Concernant les paramètres de croissance, la natamycine avait un impact plus marqué λ que sur μ_{\max} , mais il n'y avait pas de relation linéaire entre les paramètres de croissance estimés et la concentration en natamycine. De plus, bien que la gamme de concentrations testées ait été choisie d'après les travaux existants, la croissance d'un nombre important de souches a été inhibée dès la deuxième concentration testée (2,5 mg/L). Par conséquent, le modèle secondaire n'a pas pu être appliqué pour estimer les CMI de ces souches. L'effet de concentrations intermédiaire devra être testé. Lorsque le modèle secondaire a pu être appliqué, il est apparu que les valeurs de CMI estimées à partir des valeurs de μ_{\max} étaient largement surestimées par rapport aux CMI apparentes pour la plupart des espèces. Les CMI estimées à partir du temps de latence se sont avérées plus cohérentes. De manière générale, les résultats obtenus pour la natamycine semblent indiquer un effet « tout ou rien » plutôt qu'une relation dose-effet. De plus, la relation entre la concentration en natamycine et les paramètres de croissance n'étant pas linéaire, le modèle secondaire choisi pour cette étude n'est pas approprié pour estimer la CMI. En revanche, les CMI apparentes des espèces testées sont cohérentes avec celles retrouvées dans la littérature (Lalitha et al. 2008, Streekstra et al. 2016, Xu et al. 2009).

Dans cette étude, la résistance de plusieurs souches de chaque espèce a été déterminée afin d'évaluer si, au sein d'une même espèce, la réponse aux conservateurs variait en fonction de la souche étudiée. Dans le cas du benzoate de sodium, les souches de la plupart des espèces testées (12 sur 14) avaient des CMI identiques. Deux espèces présentaient une certaine variabilité intra-spécifique, *P. bialowiezense*, pour lequel trois souches étaient très sensibles au benzoate de sodium (CMI apparente de 0,25 g/L) tandis que les deux autres souches testées étaient quatre fois plus tolérantes (CMI apparente de 1 g/L) et *P. chrysogenum*, pour

lequel, deux souches étaient deux fois plus sensibles (CMI apparente de 0,5 g/L) que les trois autres testées (CMI apparente de 1 g/L). La variabilité de réponse au sorbate de potassium était légèrement plus importante. Chez 6 des 14 espèces testées, la résistance des différentes souches de chaque espèce au sorbate de potassium était similaire. Pour six autres espèces, une des souches s'est avérée plus sensible ou plus tolérante que les autres. La plus grande variabilité a été observée chez *P. bialowiezense*, pour lequel deux souches étaient plus sensibles (CMI apparente de 0,1 g/L) que les trois autres (CMI apparente de 0,3 g/L) et pour *P. roqueforti*, pour lequel deux souches étaient plus tolérantes (CMI apparente de 1 g/L) que les trois autres (CMI de 0,5 g/L). Enfin, concernant la natamycine, alors que les souches de la plupart des espèces testées avaient une tolérance similaire, une des souches appartenant aux espèces *A. flavus*, *A. niger*, *F. domesticum* et *M. racemosus* s'est avérée plus sensible ou plus tolérante que les autres, et une variabilité plus importante a été observée pour les trois espèces restantes, *C. halotolerans*, *M. circinelloides* et *R. stolonifer*. En effet, deux souches de *C. halotolerans* et *M. circinelloides* étaient deux fois plus tolérantes à la natamycine que les autres, et pour *R. stolonifer*, l'espèce la plus tolérante, la CMI apparente était de 5 mg/L pour deux souches et de 10 mg/L pour les deux autres.

La validation des CMI estimée a été réalisée en milieu de culture liquide et solide chez respectivement deux souches d'*Aspergillus flavus*, *Mucor racemosus* et *Penicillium chrysogenum*. La croissance ou l'absence de croissance a été évaluée pour ces souches aux bornes de l'intervalle de confiance à 95% des CMI estimées précédemment pour le benzoate de sodium et pour le sorbate de potassium. La validation des CMI estimées pour la natamycine n'a pas été effectuée car les CMI obtenues par le modèle n'étaient pas cohérentes avec les CMI apparentes. En milieu liquide, les valeurs supérieures de l'intervalle de confiance de la CMI ont été validées pour deux souches de *M. racemosus* pour le benzoate de potassium, et pour deux souches de *P. chrysogenum* et une souche de *M. racemosus* pour le sorbate de potassium. Cependant, chez les autres souches et indépendamment du conservateur, une croissance a été détectée, mais après un temps plus long que celui utilisé pour estimer les valeurs de CMI. En milieu solide, des résultats similaires ont été obtenus mais après un temps plus long, la croissance étant détectée après 3 à 14 jours d'incubation. Ces résultats sont cohérents car le suivi de croissance par néphélométrie laser permet une détection précoce de la croissance fongique et notamment de la germination des spores, tandis que la mesure en milieu solide repose sur l'observation de la formation d'un thalle, qui correspond généralement à la fin de la germination des spores (Marin et al. 2008).

En conclusion, les résultats obtenus montrent que parmi les espèces fongiques testées, *Fusarium domesticum* ainsi que les espèces de *Cladosporium* et *Penicillium* sont plus sensibles aux conservateurs testés, tandis que *Rhizopus stolonifer* et les *Aspergillus* et *Mucor* spp. sont plus tolérantes. La plupart des espèces testées ont présenté une faible variabilité intra-spécifique quant à leur sensibilité aux conservateurs, et ces derniers ont eu un impact plus important sur μ_{\max} que sur λ sauf dans le cas de la natamycine, ce qui avait déjà été mis en évidence par d'autres auteurs (Yogendrarajah et al. 2016). Enfin, la néphélométrie laser a permis d'effectuer un suivi rapide et haut-débit de la croissance fongique comparée aux méthodes classiques. Cependant, les données ont souligné que pour estimer de manière plus précise la CMI, il serait nécessaire d'augmenter le temps de suivi aux concentrations sub-inhibitrices et d'utiliser un modèle secondaire différent, particulièrement dans le cas de la natamycine.

II. Article à soumettre dans *International Journal of Food Microbiology*

Quéro L., Didelot F., Vasseur V., Coroller L., Nodet P., Mounier J., 2018. Evaluation of laser nephelometry as a high-throughput method for determining the resistance of filamentous fungi towards food preservatives : a preliminary study. *To be submitted to International Journal of Food Microbiology.*

1 **Evaluation of laser nephelometry as a high throughput method for determining the**
2 **resistance of filamentous fungi towards food preservatives: a preliminary study**

3
4 Laura Quéro^a, Frédérique Didelot^b, Valérie Vasseur^a, Louis Coroller^c, Patrice Nodet^a, Jérôme
5 Mounier^a

6
7 ^aUniversité de Brest, EA 3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie
8 Microbienne, ESIAB, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané

9 ^bUniversité d'Angers, UMR 1345, Institut de Recherche en Horticulture et Semences, 42 rue
10 Geroges Morel, 49071 Beaucouzé

11 ^cUniversité de Brest, EA 3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie
12 Microbienne, ESIAB, 6 rue de l'Université, 29334 Quimper

13
14 **Keywords**

15 Laser nephelometry, Fungal growth, Preservatives, Minimal inhibitory concentration

16
17 **Abstract**

18 A large diversity of filamentous fungi can spoil food products including raw materials and
19 processed foods, causing major food and economic losses. Preservatives such as weak
20 organic acids and natamycin are commonly used in the food industry to control fungal
21 growth. In this context, it is important to assess fungal sensitivity towards these preservatives.
22 Traditionally, the determination of fungal resistance towards biocides is performed by
23 measuring spore germination or radial growth in liquid or solid agar media, respectively.
24 However, such experiments are laborious and time-consuming. The aim of this study was
25 therefore to evaluate whether laser nephelometry could be applied as a high throughput
26 method to follow fungal growth for determining such resistance. To this end, growth in the
27 presence of sodium benzoate, potassium sorbate and natamycin (5 tested concentrations) of
28 64 strains belonging to 14 fungal species commonly involved in food spoilage was monitored
29 for 30 to 72h by laser nephelometry. The logistic model modified by Zwietering was then
30 used to determine μ_{\max} (i.e., the maximum specific growth rate) and λ (i.e., the lag time)
31 growth parameters. These two parameters were then modeled as a function of preservative
32 concentration to determine minimal inhibitory concentrations (MIC). The obtained MIC
33 values \pm confidence intervals at 95% were then evaluated in potato dextrose broth (PDB) and
34 potato dextrose agar (PDA) for 6 strains belonging to 3 species to check whether these MIC

35 were representative of growth/no growth boundaries. In most tested conditions, laser
36 nephelometry allowed to monitor fungal growth. However, for several strains, in the presence
37 or not of preservative, growth occurred in the form of pellets precluding accurate growth
38 measurements. Depending on the tested fungi, apparent MIC ranged from 0.25 to 2 g/L, 0.1
39 to 0.5 g/L and 1.25 to 5 mg/L for sodium benzoate, potassium sorbate and natamycin,
40 respectively. When data modelization was possible, predicted MIC were in the same range as
41 apparent MIC, except for strains exposed to natamycin. Overall, *Cladosporium*, *Fusarium*
42 and *Penicillium* species were more sensitive to the tested preservatives than *Aspergillus*,
43 *Mucor* and *Rhizopus* species. Validation of the predicted MIC showed that growth/no growth
44 boundaries of the tested strains were only validated for one to three of the tested strains
45 depending on the medium used for validation and the tested preservative. In conclusion, laser
46 nephelometry can be applied as a tool for monitoring fungal growth in the presence of
47 various preservative concentrations. However, the results obtained in this study also suggest
48 that increased duration of fungal growth follow-up at high sub-inhibitory doses (which in turn
49 will reduce the throughput of laser nephelometry) and the use of other secondary models are
50 necessary for accurate MIC determination of the tested preservatives.

51

52 **1. Introduction**

53 Filamentous fungi are able to grow on a wide variety of substrates that makes them a very
54 important group among the spoilage microorganisms (Pitt and Hocking 2009). Contamination
55 by fungal spores can occur at different stages of production, from raw materials to processing
56 and storage. Their growth in food products can lead to changes in aspect, odor and/or taste
57 causing food and economic losses for industrials and consumers. Moreover, many species
58 responsible for spoilage of food product such as *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* spp.
59 may produce mycotoxins that can be toxic for human health (Bryden, 2012).

60 Several methods including preventive and control methods are implemented in the industry to
61 prevent fungal spoilage of foods. Among control methods, the use of preservatives combined
62 with other so-called hurdle technologies (pH, aw, temperature, modified atmosphere
63 packaging etc.) is commonly used in a large variety of food products (Plumridge et al. 2004).
64 Preservatives are often added as salts to facilitate their solubility in aqueous solution and their
65 effectiveness is related to their dissociation level, that depends on their pKa and food pH.
66 Among weak organic acids, benzoic and sorbic acids are widely used to lengthen the shelf-
67 flife of foods such as dairy products, bakery products, jams and soft drinks (Guynot et al.
68 2005). Another commonly used preservative is natamycin, a polyethylene antibiotic produced

69 by *Streptomyces natalensis*, which can be applied for surface treatment of cheeses and
70 sausages to prevent spoilage mold growth (Delves-Broughton, 2008).

71 Besides the fact that natural fungal resistance to preservatives is species- and strain-
72 dependent (León Peláez et al. 2012), fungal strains may adapt and develop increased
73 tolerance towards those molecules (Piper, 2011; Streekstra et al. 2016), especially when they
74 are exposed repeatedly to sublethal concentrations. That is why it is crucial to assess the
75 resistance of spoilage fungi to preservatives so the right concentrations can be used in food
76 products to prevent spoilage mold growth and ensure food safety and quality. To assess the
77 impact of abiotic factors such as temperature or preservatives, spore germination or mycelial
78 growth are usually monitored in liquid or solid agar medium using phase-contrast microscopy
79 or by measuring thallus diameter, respectively. However, such approaches are generally time-
80 consuming and fastidious, especially if many different experimental conditions have to be
81 evaluated. Spectrophotometric methods, which are well adapted for growth measurement of
82 most bacteria, have also been adapted to filamentous fungi in a small number of studies,
83 mainly in the medical field (Meletiadis et al. 2001) but one drawback is the fact that optical
84 density (OD) measurements are only proportional to cell density at low OD values
85 (Meletiadis et al. 2003). As an alternative, laser nephelometry does suffer from this drawback
86 as it measures scattered light, in contrast to spectrophotometry that measures non-transmitted
87 light. Since its first application to yeasts growth measurements (Peskett, 1927), laser
88 nephelometry has successfully been applied for growth monitoring of filamentous fungi.
89 Joubert et al. (2010) showed that there was a linear relationship between Relative
90 Nephelometric Unit (RNU) values and dry weight measurements during growth of *Alternaria*
91 *alternata*. Growth monitoring by laser nephelometry yields typical growth curves with a lag
92 phase, an exponential growth phase and a plateau, which usually corresponds to detector
93 saturation rather than a classical stationary phase. Joubert et al. (2010) and Lecomte et al.
94 (2012) also successfully applied this technique to evaluate the effect of antifungal compounds
95 on growth parameters of *Aspergillus fumigatus* and *Alternaria dauci*. However, it should be
96 noted that such an approach has never been applied on a large extent of fungal species of
97 food interest and besides the determination of growth parameters, data modelization to
98 predict MIC values was not undertaken in the latter studies.

99 Thus, the objective of this study was to evaluate whether laser nephelometry could be applied
100 as a high throughput method to monitor fungal growth of 14 spoilage fungal species in the
101 presence of three food preservatives. Growth parameters were then modeled as a function of

102 preservative concentration to estimate minimal inhibitory concentrations (MIC) and predicted
103 values were then validated.

104

105 **2. Materials and methods**

106 **2.1 Fungal isolates**

107 Sixty-four strains, representing 14 species, were selected (Table 1). They were obtained from
108 the Université de Bretagne Occidentale Culture Collection (UBOCC, Plouzané, France) and
109 previous research project (Gillot et al. 2015) for *Penicillium roqueforti* isolates.

110

111 **2.2 Growth monitoring of fungi using laser nephelometry**

112 Fungal strains were first pre-cultured on Potato Dextrose Agar (PDA, bioMérieux, Marcy
113 l'Etoile, France) and incubated at 25°C for 10 days. Spores were harvested from the PDA
114 cultures by gently washing the agar surface with 0.01% Tween 80. Conidial concentrations
115 were determined using a haemocytometer (Malassez, Preciss, Paris, France) and standardized
116 to 3×10^5 conidia/mL.

117 Resistance to sodium benzoate, potassium sorbate and natamycin was evaluated *in vitro* at
118 pH 5 for concentrations ranging from 0 to 2 g/L for sodium benzoate (tested concentrations :
119 0, 0.25, 0.5, 1 and 2 g/L), from 0 to 1 g/L for potassium sorbate (tested concentrations : 0,
120 0.1, 0.3, 0.5 and 1 g/L) and from 0 to 10 mg/L for natamycin (tested concentrations : 0, 1.25,
121 2.5, 5 and 10 mg/L). For weak acid preservatives, the adequate amount of sodium benzoate
122 and potassium sorbate was added to Potato Dextrose Broth (PDB) and the pH was adjusted to
123 5 with 1 M NaOH or HCl before sterilization at 121°C for 20 min. The pH was then verified
124 after sterilization. For natamycin, it was directly dissolved in sterile PDB (pH 5) at the
125 required concentration. After distribution of 290µL of the tested medium into sterile flat-
126 bottomed 96-well plates (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France), 10µL of the
127 standardized spore suspension was added to each well. For all experimental conditions,
128 growth at 25°C was automatically recorded for 30h to 70h, depending on the species, using a
129 nephelometric reader (NEPHELOstar Galaxy, BMG Labtech, Offenburg, Germany),
130 equipped with a 635-nm laser source. During incubation, the 96-well plates were shaken at
131 300 rpm for 10 sec before each reading. Measurements were made every 10 min with a laser
132 intensity of 80%. Each well was measured for 0.4 sec with a laser beam focus of 2.5 mm.
133 Growth of each strain in all tested conditions was monitored in triplicate.

134

135

136 2.3 Growth parameters calculation and MIC estimation

137 After incubation, growth in each well was visually checked as well as an eventual pellet
138 formation into the well. Relative nephelometric unit (RNU) data were exported from
139 Nephelostar Galaxy software (NEPHELOstar Galaxy, BMG Labtech, Offenburg, Germany)
140 and further processed with Microsoft Excel 2010 to visualize growth curves. For each strain
141 and preservative, apparent Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined as the
142 lowest concentration for which no growth was observed during incubation. For each
143 experimental condition, both lag time (λ , h⁻¹) and maximal growth rate (μ_{\max} , RNU.h⁻¹)
144 parameters were calculated from the growth curves using the Matlab curve fitting tool (2014,
145 The Mathworks Inc., USA) with Eq. (1) (Zwietering et al. 1994) :

$$146 \quad RNU = RNU_0 + \frac{A}{(1 + e^{\frac{(\mu_{\max} \times (\lambda - t) + 2)}{A}})} \quad \text{Eq. (1)}$$

148 Where RNU_0 is the measured RNU value at $t=0$, A is the RNU_{\max} or the maximum RNU value
149 reached in stationary phase.

151 Then, for each species, the μ_{\max} and λ values were plotted against the tested concentrations
152 and MIC values were estimated using Eq. (2) (Judet-Correia et al. 2011) :

$$153 \quad a = b \times (1 - (\frac{C}{MIC})) \quad \text{Eq. (2)}$$

156 Where a is either μ_{\max} or λ , b is either μ_{\max} or λ for $C=0$, C is the tested concentration and
157 MIC is the estimated MIC.

158

159 2.4 Validation of MIC prediction

160 In order to investigate whether the MIC values estimated with the model were accurate,
161 growth was assessed at the MIC obtained for 3 of the tested species (2 strains tested per
162 species), i.e., *Aspergillus flavus*, *Mucor racemosus* and *Penicillium chrysogenum*. Two
163 concentrations of each preservative were tested including the upper and lower boundaries of
164 the estimated MIC 95% confidence interval (Table 2). Monitoring of liquid growth was used
165 according to the protocol described above. This validation was performed in PDB medium as
166 described above and in solid agar medium. Briefly, Potato Dextrose Agar (PDA) was
167 supplemented with the appropriate concentration of each preservative and distributed into 24-
168 well plates. After solidification, wells were centrally inoculated using 10 μL of a 3×10^5
169 conidia/mL suspension. Both 96-well and 24-well plates were incubated at 25°C for 21 days.

170 For validation in PDB, growth or absence of growth was automatically recorded using laser
171 nephelometry as described above while for validation in PDA, 24-well plates were visually
172 inspected every day to evaluate time to visible growth.

173

174

175 **3. Results and discussion**

176 **3.1 Application of laser nephelometry for growth monitoring of filamentous fungi**

177 Laser nephelometry was confirmed as a useful tool for monitoring growth of filamentous
178 fungi exposed to biocide such as food preservatives as previously described in the literature
179 for other antifungal molecules such as antifungal drugs (Joubert et al. 2010). Indeed,
180 characteristic growth curves could be obtained for 55 out of the 64 tested strains as shown in
181 supplementary Figure 1 for strain UBOCC-A-109063 of *Mucor racemosus* exposed to
182 various concentrations of sodium benzoate. However, for several species grown under certain
183 conditions, characteristic growth curves could not be obtained. Indeed, for these species, i.e.,
184 *Aspergillus niger* (all tested strains in the presence of sodium benzoate), *Cladosporium*
185 *sphaerospermum* UBOCC-A-101111 (in the presence of sodium benzoate) and *Penicillium*
186 *brevicompectum* (all tested strains in all tested conditions including those in the absence of
187 preservatives), we observed the formation of mycelial pellets into the wells. One possible
188 explanation is that the formation of pellets led to an inhomogeneous distribution of fungal
189 biomass precluding correct measurement of scattered light. In addition, scattered light
190 measurements were only performed in the central position of each well. This drawback could
191 be overcome by making several measurements at different positions of a single well, but this
192 functionality was not available for kinetic measurements in the instrument used in the present
193 study. Pellet formation is a frequently occurring phenomenon during submerged cultivation
194 of filamentous fungi. As underlined recently by (Nair et al. 2016), pellet formation, which
195 results from the agglomeration of mycelial hyphae, may be induced by various environmental
196 factors (nutrient availability, oxygen transfer rate, etc.) and greatly depends on the species
197 and strains studied. As shown for *Penicillium chrysogenum* (Nielsen et al. 1995), pellet
198 formation may be reduced by modulating the cultivation parameters such as the inoculum
199 size and increasing the agitation rate during cultivation. Such parameters as well as other
200 parameters including agitation duration and frequency could be optimized for reducing pellet
201 formation in the studied strains. Regarding our observation that pellet formation in *A. niger*
202 and *C. sphaerospermum* occurred only in the presence of sodium benzoate, but not with other
203 preservatives, it can be hypothesized that sodium benzoate triggered a specific stress

204 response, different from that obtained with other preservatives, which led to mycelial pellet
205 formation. It can be speculated that pellet formation provided a protection of fungal cells
206 inside the pellet similar to that observed for bacterial and yeast cells growing in biofilms,
207 thereby increasing fungal resistance to this specific preservative (Chandra et al. 2001). As a
208 consequence, for these strains and conditions, only apparent MIC could be determined by
209 visually inspecting the absence of growth into the wells after incubation.

210

211 **3.2 Fungal resistance to food preservatives**

212 For all other tested strains, apparent MIC were determined by visually inspecting each well
213 and analyzing their respective growth curves (Table S1). Growth parameters (μ_{\max} and λ)
214 were estimated, and when possible, MIC were estimated after secondary modelling of the
215 effect of preservative concentrations on λ and μ_{\max} (Table S1). Apparent and estimated MIC
216 of each species are shown in Table 3. Overall, natamycin followed by potassium sorbate and
217 sodium benzoate were the most effective preservatives as previously reported (Le Lay et al.
218 2016; Garnier et al. 2017). Several species showed a very high sensitivity to the tested
219 preservatives as their growth was inhibited at the lowest tested preservative concentration,
220 *i.e.*, all strains of *Cladosporium halotolerans* and *Fusarium domesticum* exposed to sodium
221 benzoate and potassium sorbate and all strains of *Penicillium bialowiezense* exposed to
222 natamycin. Therefore, their MIC could not be estimated and their tolerance to preservatives
223 was not investigated further. Noteworthy, for several strains and conditions, an increase in
224 RNU signal could be visually inferred at the end of the incubation time but growth curves
225 were not complete so growth parameters could not be determined.

226

227 **3.3 Effect of weak organic acids**

228 In the present study, fungal resistance to two weak organic acids, *i.e.* sodium benzoate and
229 potassium sorbate was evaluated. As expected based on literature data (Praphailong and Fleet
230 1997; Guynot et al. 2005) and independently of the studied fungal species, potassium sorbate
231 was more effective than sodium benzoate (Table 3). Indeed, MIC of potassium sorbate were
232 ~2 to 4 times lower than that of sodium benzoate. Sodium benzoate totally inhibited growth
233 of the tested strains at concentrations ranging from 0.25 g/L (*i.e.*, *C. halotolerans* and *F.*
234 *domesticum*) to 1.80 g/L for *A. niger*, which was the most resistant species to this
235 preservative. At least 1 g/L of sodium benzoate was required to completely inhibit growth the
236 two tested *Aspergillus* species, as well as *Mucor* species, *P. commune* and *P. roqueforti*
237 (Table 3). The three other *Penicillium* species tested showed higher sensitivity with apparent

238 mean MIC ranging between 0.55 and 0.83 g/L, while *Rhizopus stolonifer* sensitivity was in
239 the same range. Finally, for *C. sphaerospermum*, sodium benzoate had an apparent MIC of
240 0.5 g/L, which was higher than that obtained for *C. halotolerans*. Concerning growth
241 parameters, we observed that sodium benzoate had more impact on μ_{\max} than on λ . Indeed,
242 lag time was not affected by sodium benzoate in all tested *A. niger*, *A. flavus*, *P. commune*
243 and *P. roqueforti* strains (which precluded MIC determination using this parameter for these
244 strains) whereas μ_{\max} decreased with increased benzoate concentration for all strains for
245 which this parameter could be estimated (Figure 2A). Overall, MIC obtained in this study
246 were also in agreement but slightly lower than those obtained in previous studies. For
247 example, Le Lay et al. (2016) found sodium benzoate MIC of <1.12 g/L in solid agar medium
248 at pH 5 for *A. versicolor*, *C. sphaerospermum*, *P. bevicompactum*, *P. chrysogenum* and *P.*
249 *roqueforti* and 2 g/L for *A. niger*, while (López-Malo et al. 2005) obtained MIC of 1.5 g/L for
250 *A. flavus*. However, it should be noted that different strains were used in the latter studies and
251 that experimental procedures to determine MIC were different. For example, Le Lay et al.
252 (2016) used a different medium, i.e., malt extract agar which was supplemented with 5%
253 NaCl.

254

255 Potassium sorbate showed a higher efficacy than sodium benzoate with apparent MIC
256 ranging from 0.1 g/L (*C. halotolerans* and *F. domesticum*) to 0.7 g/L (*P. roqueforti*). Several
257 species were quite sensitive with MIC between 0.22 and 0.3 g/L, i.e., *P. bialowiezense*, *C.*
258 *sphaerospermum*, *A. versicolor*, *P. chrysogenum*, *P. commune* and *R. stolonifer*. *A. flavus*, *P.*
259 *brevicompactum*, *M. circinelloides*, *M. racemosus* and *A. niger* showed higher tolerance with
260 MIC ranging from 0.34 to 0.6 g/L. Potassium sorbate had an effect on μ_{\max} for most strains
261 except for all strains of *A. niger*, *M. circinelloides*, 3 strains of *A. versicolor*, 2 strains of *P.*
262 *bialowiezense* and 1 strain of *C. sphaerospermum* for which μ_{\max} did not vary as a function
263 of potassium sorbate concentration. In contrast, λ values varied as a function of potassium
264 sorbate concentration, except for *P. commune* UBOCC-A-110177. Overall, MIC estimated
265 from μ_{\max} and λ values were consistent with apparent MIC for most species, but when
266 compared to previous studies, MIC obtained in the present study were generally lower than
267 the one obtained on solid media in other studies. Le Lay et al. (2016) obtained MIC of 1 g/L
268 for *A. versicolor*, *C. sphaerospermum*, *P. bevicompactum*, *P. chrysogenum* and *P. roqueforti*
269 and 4 g/L for *A. niger*, while López-Malo et al. (2005) obtained MIC of 0.8 g/L for *A. flavus*.

270

271 As 3 to 5 strains per species were studied, eventual intra-specific variability towards
272 preservatives could be observed in our study. Phenotypic heterogeneity at the strain level and
273 within clonally-derived population is a well-established phenomenon, and is reported across a
274 wide range of phenotypes including preservative resistance (Hewitt et al. 2016). For most
275 species, *i.e.*, *A. flavus*, *A. versicolor*, *C. halotolerans*, *C. sphaerospermum*, *F. domesticum*,
276 *M. racemosus*, *P. commune* and *P. roqueforti*, all tested strains showed the same response to
277 sodium benzoate. One strain was more sensitive than the other ones for *A. niger*, *P.*
278 *brevicompactum* and *R. stolonifer*, while one strain was more tolerant than the others for *M.*
279 *circinelloides*. In contrast, a larger variability was observed in *Penicillium bialowiezense*, for
280 which 3 strains were very sensitive to sodium benzoate (MIC of 0.25 g/L), and 2 strains were
281 more tolerant (MIC of 1 g/L) while for *Penicillium chrysogenum*, 2 strains were slightly more
282 sensitive (MIC of 0.5 g/L) than the 3 other tested ones (MIC of 1 g/L).

283

284 Regarding potassium sorbate MIC at the intra-species level, a higher variability was observed
285 as compared to that observed with sodium benzoate except for all tested strains of *C.*
286 *halotolerans*, *F. domesticum*, *M. circinelloides*, *M. racemosus*, *P. commune* and *R. stolonifer*
287 which had similar MIC (Table S1). For *A. flavus*, *A. niger* and *P. brevicompactum*, one strain
288 was slightly more tolerant than the others while for *A. versicolor*, *C. sphaerospermum* and *P.*
289 *chrysogenum*, one strain was more sensitive than the others. Finally, the two species that
290 presented the higher intra-specific variability were *P. bialowiezense* (2 strains with a MIC of
291 0.1 g/L and 3 strains with a MIC of 0.3 g/L) and *P. roqueforti* (3 strains with a MIC of 0.5
292 g/L and 2 strains with a MIC of 1g/L). Interestingly, *P. bialowiezense* UBOCC-A-116016
293 and *P. chrysogenum* UBOCC-A-112077, which were more sensitive to potassium sorbate
294 than the other tested strains of those species, were also more sensitive to sodium benzoate.

295

296 **3.4 Effect of natamycin**

297 Natamycin inhibited growth of the tested species at concentrations ranging from 1.25 mg/L
298 (*P. bialowiezense*) to 7.5 mg/L (*R. stolonifer*). Most species were quite sensitive with MIC
299 values comprised between 1.25 and 3.5 mg/L, *i.e.*, *A. niger*, both *Cladosporium* species, *F.*
300 *domesticum* and all tested *Penicillium* species. The remaining species showed less sensitivity
301 with MIC values between 4 and 7.5 mg/L, *i.e.*, *A. flavus*, *A. versicolor*, both tested *Mucor*
302 species and *R. stolonifer*. Concerning the effect of natamycin on growth parameters,
303 natamycine had a more important impact on λ values than on μ_{\max} values. Even when an
304 effect was observed, there was not a good linear relationship between growth parameters and

305 natamycin concentration as illustrated by the relatively low r^2 values of the models (Table
306 S1). Although the range of tested concentrations was chosen based on literature values,
307 several strains belonging to *A. flavus*, *A. niger*, *F. domesticum*, *M. racemosus* (one strain
308 each), *M. circinelloides* (2 strains), *C. halotolerans* (3 strains), *C. sphaerospermum* and all
309 tested *Penicillium* species (all strains), only grew in the presence of 1.25 mg/L natamycin
310 (i.e., the lowest tested concentration) meaning their apparent MIC was 2.5 mg/L.
311 For these species, MIC could not be predicted after secondary modelling and testing the
312 effect of intermediate concentrations on growth parameters would be necessary to modelize
313 their tolerance to natamycin. For strains for which growth parameters could be determined for
314 at least two natamycin concentrations, we observed that MIC estimated with μ_{\max} values were
315 highly over-estimated when compared to apparent MIC values for *C. halotolerans*, both
316 *Mucor* species and *P. chrysogenum* but were concordant for *R. stolonifer*. Results were
317 slightly better for MIC estimated with λ values as they were in good agreement with the
318 apparent MIC for *A. flavus*, *M. circinelloides*, *M. racemosus* and *Rhizopus stolonifer* but
319 discordant for *A. versicolor*, *C. halotolerans*, *C. sphaerospermum*, *P. chrysogenum* and *P.*
320 *roqueforti*. Overall, our data suggested that natamycin induced an “all-or-nothing” response
321 rather than a dose-response effect. As it can be seen in Figure 2B for *A. versicolor* and *Mucor*
322 strains, natamycin had no or little impact on $1/\lambda$ values at a concentration of 1.25 mg/L while
323 at 2.5 mg/L, a sudden decrease in $1/\lambda$ values was observed. These results show that the model
324 used in the present study is not appropriate for predicting natamycine MIC values. When
325 compared with data from the literature, the apparent MIC obtained here for natamycin are in
326 agreement with results from previous studies. Natamycin MIC values for *Fusarium* spp., *A.*
327 *flavus* and *A. niger* corresponded to 2-8, 8 and 1-4mg/L, respectively (Lalitha et al. 2008; Xu
328 et al. 2009). In a recent study, Streekstra et al. (2016) obtained MIC values ranging from 1 to
329 8 mg/L for several species of *Aspergillus*, *Mucor* and *Penicillium*. Concerning intra-specific
330 variability, there were no differences in MIC values in strains of *A. versicolor*, *C.*
331 *sphaerospermum*, and all 5 tested *Penicillium* species. For *A. flavus* and *M. racemosus*, one
332 strain showed a higher sensitivity than the other ones, whereas for *A. niger* and *F.*
333 *domesticum*, one strain showed lower sensitivity than the other ones. Finally, more variability
334 was observed for *C. halotolerans* and *M. circinelloides*, for which higher MIC were observed
335 for 2 and 3 strains, respectively. *R. stolonifer* was the most tolerant species to natamycin with
336 two strains with apparent MIC of 5 mg/L and the other two with an apparent MIC of 10
337 mg/L.
338

339 3.5 Validation of predicted MIC

340 In the last part of this study, we checked whether predicted MIC \pm confidence intervals at
341 95% reflected growth/no growth boundaries in PDB and PDA on a subset of 6 strains
342 belonging to 3 fungal species (Table 4). The validation of predicted MIC was only
343 performed for sodium benzoate and potassium sorbate, because for natamycin, the utilized
344 model yielded low r^2 and predicted MIC values were not in agreement with the apparent
345 ones. As shown in Table 4, in PDB, predicted MIC of sodium benzoate and potassium
346 sorbate were validated for 2 (*M. racemosus* UBOCC-A-109063 and UBOCC-A-109155) and
347 3 (*M. racemosus* UBOCC-A-109155 and *P. chrysogenum* UBOCC-A-106023 and UBOCC-
348 A-112108) strains, respectively, at concentrations equal to the upper confidence limit (CL).
349 However, for all other strains, growth was still detected, but within a longer time range than
350 the one used to estimate the MIC. For example, in the validation experiment, *A. flavus*
351 UBOCC-106033 growth was detected after 35h (upper CL of 0.9 g/L for sodium benzoate)
352 while initially, no growth was observed after 31h (apparent MIC of 1 g/L). The only
353 exceptions were *A. flavus* UBOCC-A-111232 exposed to sodium benzoate and *P.*
354 *chrysogenum* UBOCC-A-112108 exposed to potassium sorbate, for which growth was
355 observed after an incubation time slightly lower (~8h) than that observed for the
356 determination of their respective MIC indicating a certain biological variability.

357

358 Concerning validation of predicted MIC in PDA, the predicted values corresponding to the
359 MIC upper confidence limits were validated for 3 and 1 strains exposed to sodium benzoate
360 and potassium sorbate, respectively. In contrast to the study of Streekstra et al. (2016),
361 growth on solid medium was detected within a longer time range than on liquid medium,
362 which is not surprising since growth monitoring in liquid medium was performed using laser
363 nephelometry which allowed early detection of conidial germination corresponding to the
364 latency of germination, while growth monitoring on agar medium was performed visually
365 and corresponded to radial growth latency (Marín et al. 2008). Finally, growth of several
366 strains such as those of *P. chrysogenum* was inhibited in PDB but could grow on PDA in the
367 presence of potassium sorbate, while the opposite was observed for the same strains
368 cultivated in the presence of sodium benzoate. Such differences are not surprising giving the
369 great differences between solid and liquid cultivation parameters such as oxygen availability,
370 a_w or exposure to the tested preservative. Indeed, Marin et al. (2008) stated that the use of
371 liquid media for modeling fungal growth was not realistic, due to the explorative nature of

372 filamentous fungi for colonizing solid substrates though Joubert et al. (2010) proved good
373 correlation between laser nephelometry measurements in liquid medium and radial growth on
374 solid agar medium.

375

376 In conclusion, data obtained for this study suggest that among the tested species,
377 *Cladosporium* and *Penicillium* species altogether with *Fusarium domesticum* were quite
378 sensitive to the tested preservatives, whereas *Rhizopus stolonifer* as well as *Aspergillus* and
379 *Mucor* species appeared to be more tolerant. Overall, low intra-specific variability was
380 observed among the tested strains. Potassium sorbate appeared to be effective on fungal
381 growth at lower concentrations than sodium benzoate, which was already observed in other
382 studies (Guynot et al., 2005). As for growth parameters (μ_{\max} and λ), the tested preservatives
383 had a stronger impact on μ_{\max} than on λ , which was already observed in most papers dealing
384 with fungal growth modelization (Marin et al. 2008). As reported by Yogendrarajah et al.
385 (2016), there does not seem to be a systematic trend in lag phases of many strains/species as
386 compared to growth rate. Hence, growth rate appears as a more suitable indicator of fungal
387 growth than lag phase. Finally, laser nephelometry allowed rapid and high-throughput
388 screening of fungal growth over short period of time scales compared to conventional
389 methods although more concentration points would have been needed for more accurate MIC
390 estimations. Nevertheless, it is clear from this data that MIC prediction based on laser
391 nephelometry growth measurements needs further work that would include an increased
392 duration of fungal growth follow-up at high sub-inhibitory doses (which in turn will reduce
393 the throughput of laser nephelometry) and the use of another secondary model especially in
394 the case of natamycin. Future work should also include validation of predicted MIC in real
395 food products.

396

397 **Acknowledgements**

398 This work was done as part of a CIFRE PhD funded by bioMérieux and the French
399 Association for Research and Technology (ANRT) [Convention #2015/0821] in collaboration
400 with the LUBEM laboratory.

401

402 **References**

403 Bryden, Wayne L. 2012. "Mycotoxin Contamination of the Feed Supply Chain: Implications for
404 Animal Productivity and Feed Security." *Animal Feed Science and Technology*, Special Issue:

405 Nutrition and Pathology of Non-Ruminants, 173 (1): 134–58.
406 <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.014>.

407 Chandra, Jyotsna, Duncan M. Kuhn, Pranab K. Mukherjee, Lois L. Hoyer, Thomas McCormick, and
408 Mahmoud A. Ghannoum. 2001. “Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida Albicans*:
409 Development, Architecture, and Drug Resistance.” *Journal of Bacteriology* 183 (18): 5385–94.
410 <https://doi.org/10.1128/JB.183.18.5385-5394.2001>.

411 Delves-Broughton, J. 2008. “16 - Use of the Natural Food Preservatives, Nisin and Natamycin, to
412 Reduce Detrimental Thermal Impact on Product Quality.” In *In-Pack Processed Foods*, edited by
413 Philip Richardson, 319–37. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.
414 Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845694692.4.319>.

415 Garnier, Lucille, Florence Valence, Audrey Pawtowski, Lizaveta Auhustsinava-Galerie, Nicolas
416 Frotté, Riccardo Baroncelli, Franck Deniel, Emmanuel Coton, and Jérôme Mounier. 2017. “Diversity
417 of Spoilage Fungi Associated with Various French Dairy Products.” *International Journal of Food*
418 *Microbiology* 241 (Supplement C): 191–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.026>.

419 Gillot, Guillaume, Jean-Luc Jany, Monika Coton, Gaétan Le Floch, Stella Debaets, Jeanne Ropars,
420 Manuela López-Villavicencio, et al. 2015. “Insights into *Penicillium Roqueforti* Morphological and
421 Genetic Diversity.” *PLOS ONE* 10 (6): e0129849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129849>.

422 Guynot, M. E., A. J. Ramos, V. Sanchis, and S. Marín. 2005. “Study of Benzoate, Propionate, and
423 Sorbate Salts as Mould Spoilage Inhibitors on Intermediate Moisture Bakery Products of Low PH
424 (4.5–5.5).” *International Journal of Food Microbiology* 101 (2): 161–68.
425 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.003>.

426 Hewitt, Sarah K., David S. Foster, Paul S. Dyer, and Simon V. Avery. 2016. “Phenotypic
427 Heterogeneity in Fungi: Importance and Methodology.” *Fungal Biology Reviews* 30 (4): 176–84.
428 <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.09.002>.

429 Joubert, Aymeric, Benoît Calmes, Romain Berruyer, Marc Pihet, Jean-Philippe Bouchara, Philippe
430 Simoneau, and Thomas Guillemette. 2010. “Laser Nephelometry Applied in an Automated
431 Microplate System to Study Filamentous Fungus Growth.” *BioTechniques* 48 (5): 399–404.
432 <https://doi.org/10.2144/000113399>.

433 Judet-Correia, D., C. Charpentier, M. Bensoussan, and P. Dantigny. 2011. “Modelling the Inhibitory
434 Effect of Copper Sulfate on the Growth of *Penicillium Expansum* and *Botrytis Cinerea*.” *Letters in*
435 *Applied Microbiology* 53 (5): 558–64. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03149.x>.

436 Lalitha, P., R. Vijaykumar, N. V. Prajna, and A. W. Fothergill. 2008. “In Vitro Natamycin
437 Susceptibility of Ocular Isolates of *Fusarium* and *Aspergillus* Species: Comparison of Commercially
438 Formulated Natamycin Eye Drops to Pharmaceutical-Grade Powder.” *Journal of Clinical*
439 *Microbiology* 46 (10): 3477–78. <https://doi.org/10.1128/JCM.00610-08>.

440 Le Lay, Céline, Jérôme Mounier, Valérie Vasseur, Amélie Weill, Gwenaëlle Le Blay, Georges
441 Barbier, and Emmanuel Coton. 2016. “In Vitro and in Situ Screening of Lactic Acid Bacteria and

442 Propionibacteria Antifungal Activities against Bakery Product Spoilage Molds.” *Food Control* 60
443 (Supplement C): 247–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.034>.

444 Lecomte, Mickaël, Romain Berruyer, Latifa Hamama, Cora Boedo, Piétrick Hudhomme, Stéphanie
445 Bersihand, Joseph Arul, et al. 2012. “Inhibitory Effects of the Carrot Metabolites 6-Methoxymellein
446 and Falcarindiol on Development of the Fungal Leaf Blight Pathogen *Alternaria Dauci*.”
447 *Physiological and Molecular Plant Pathology* 80 (October): 58–67.
448 <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2012.10.002>.

449 León Peláez, A. M., C. A. Serna Cataño, E. A. Quintero Yepes, R. R. Gamba Villarroel, G. L. De
450 Antoni, and L. Giannuzzi. 2012. “Inhibitory Activity of Lactic and Acetic Acid on *Aspergillus Flavus*
451 Growth for Food Preservation.” *Food Control* 24 (1): 177–83.
452 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.024>.

453 López-Malo, Aurelio, Stella Maris Alzamora, and Enrique Palou. 2005. “*Aspergillus Flavus* Growth
454 in the Presence of Chemical Preservatives and Naturally Occurring Antimicrobial Compounds.”
455 *International Journal of Food Microbiology* 99 (2): 119–28.
456 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.010>.

457 Marín, Sonia, Dolors Cuevas, Antonio J. Ramos, and Vicente Sanchis. 2008. “Fitting of Colony
458 Diameter and Ergosterol as Indicators of Food Borne Mould Growth to Known Growth Models in
459 Solid Medium.” *International Journal of Food Microbiology* 121 (2): 139–49.
460 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.030>.

461 Meletiadis, Joseph, Debbie T. A. te Dorsthorst, and Paul E. Verweij. 2003. “Use of Turbidimetric
462 Growth Curves for Early Determination of Antifungal Drug Resistance of Filamentous Fungi.”
463 *Journal of Clinical Microbiology* 41 (10): 4718–25. [https://doi.org/10.1128/JCM.41.10.4718-](https://doi.org/10.1128/JCM.41.10.4718-4725.2003)
464 [4725.2003](https://doi.org/10.1128/JCM.41.10.4718-4725.2003).

465 Meletiadis, Joseph, Jacques F. G. M. Meis, Johan W. Mouton, and Paul E. Verweij. 2001. “Analysis
466 of Growth Characteristics of Filamentous Fungi in Different Nutrient Media.” *Journal of Clinical*
467 *Microbiology* 39 (2): 478–84. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.2.478-484.2001>.

468 Nair, Ramkumar B., Patrik R. Lennartsson, and Mohammad J. Taherzadeh. 2016. “Mycelial Pellet
469 Formation by Edible Ascomycete Filamentous Fungi, *Neurospora Intermedia*.” *AMB Express* 6 (1):
470 31. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0203-2>.

471 Nielsen, Jens, Claus L. Johansen, Michael Jacobsen, Preben Krabben, and John Villadsen. 1995.
472 “Pellet Formation and Fragmentation in Submerged Cultures of *Penicillium Chrysogenum* and Its
473 Relation to Penicillin Production.” *Biotechnology Progress* 11 (1): 93–98.
474 <https://doi.org/10.1021/bp00031a013>.

475 Peskett, Geoffrey Lewis. 1927. “Studies on the Growth of Yeast.” *Biochemical Journal* 21 (3): 460–
476 66.

477 Piper, Peter W. 2011. “Resistance of Yeasts to Weak Organic Acid Food Preservatives.” *Advances in*
478 *Applied Microbiology* 77: 97–113. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387044-5.00004-2>.

479 Pitt, John, and Ailsa Hocking. 2009. *Fungi and Food Spoilage*. 3rd ed. New York, USA: Springer
480 Science & Business media.

481 Plumridge, Andrew, Stephan J. A. Hesse, Adrian J. Watson, Kenneth C. Lowe, Malcolm Stratford,
482 and David B. Archer. 2004. "The Weak Acid Preservative Sorbic Acid Inhibits Conidial Germination
483 and Mycelial Growth of *Aspergillus Niger* through Intracellular Acidification." *Appl. Environ.*
484 *Microbiol.* 70 (6): 3506–11. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3506-3511.2004>.

485 Praphailong, W, and G. H Fleet. 1997. "The Effect of PH, Sodium Chloride, Sucrose, Sorbate and
486 Benzoate on the Growth of Food Spoilage Yeasts." *Food Microbiology* 14 (5): 459–68.
487 <https://doi.org/10.1006/fmic.1997.0106>.

488 Streekstra, Hugo, Alex E. E. Verkennis, Robbert Jacobs, Angelina Dekker, Jacques Stark, and Jan
489 Dijksterhuis. 2016. "Fungal Strains and the Development of Tolerance against Natamycin." *International*
490 *Journal of Food Microbiology* 238 (December): 15–22.
491 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.006>.

492 Xu, Yan, Guangren Pang, Chuanwen Gao, Dongqing Zhao, Lutan Zhou, Shengtao Sun, and Bingliang
493 Wang. 2009. "In Vitro Comparison of the Efficacies of Natamycin and Silver Nitrate against Ocular
494 Fungi." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (4): 1636–38.
495 <https://doi.org/10.1128/AAC.00697-08>.

496 Yogendrarajah, Pratheeba, An Vermeulen, Liesbeth Jacxsens, Evangelia Mavromichali, Sarah De
497 Saeger, Bruno De Meulenaer, and Frank Devlieghere. 2016. "Mycotoxin Production and Predictive
498 Modelling Kinetics on the Growth of *Aspergillus Flavus* and *Aspergillus Parasiticus* Isolates in Whole
499 Black Peppercorns (*Piper Nigrum* L)." *International Journal of Food Microbiology* 228 (July): 44–57.
500 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.015>.

501 Zwietering, M. H., J. C. de Wit, H. G. A. M. Cuppers, and K. van 't Riet. 1994. "Modeling of
502 Bacterial Growth with Shifts in Temperature." *Applied and Environmental Microbiology* 60 (1): 204–
503 13.

Species	Strain number	Origin
<i>Aspergillus flavus</i>	UBOCC-A-108068	Molten cheese
<i>Aspergillus flavus</i>	UBOCC-A-111232	Aromatised drink
<i>Aspergillus flavus</i>	UBOCC-A-111076	Surface (dairy industry)
<i>Aspergillus flavus</i>	UBOCC-A-108066	Butter
<i>Aspergillus flavus</i>	UBOCC-A-106033	Poultry feed
<i>Aspergillus niger</i>	UBOCC-A-112064	Small sweet bun
<i>Aspergillus niger</i>	UBOCC-A-111267	Fresh dairy product
<i>Aspergillus niger</i>	UBOCC-A-111099	Fresh dairy product
<i>Aspergillus niger</i>	UBOCC-A-112080	Small sweet bun
<i>Aspergillus niger</i>	UBOCC-A-112068	Chocolate croissant
<i>Aspergillus versicolor</i>	UBOCC-A-110226	Cheese
<i>Aspergillus versicolor</i>	UBOCC-A-102012	Egg product
<i>Aspergillus versicolor</i>	UBOCC-A-101088	Rotten sponge
<i>Aspergillus versicolor</i>	UBOCC-A-101087	Wheat
<i>Aspergillus versicolor</i>	UBOCC-A-112085	Pound cake
<i>Cladosporium halotolerans</i>	UBOCC-A-113075	Unknown
<i>Cladosporium halotolerans</i>	UBOCC-A-113074	Unknown
<i>Cladosporium halotolerans</i>	UBOCC-A-113073	Unknown
<i>Cladosporium halotolerans</i>	UBOCC-A-117047	Indoor air
<i>Cladosporium halotolerans</i>	UBOCC-A-116001	Raw milk
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	UBOCC-A-101111	Melon
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	UBOCC-A-112116	Pound cake
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	UBOCC-A-101107	Wheat
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	UBOCC-A-113079	Unknown
<i>Fusarium domesticum</i>	UBOCC-A-117075	Cheese
<i>Fusarium domesticum</i>	UBOCC-A-113010	Unknown
<i>Fusarium domesticum</i>	UBOCC-A-118040	Food
<i>Mucor circinelloides</i>	UBOCC-A-109201	Soda

Species	Strain number	Origin
<i>Mucor circinelloides</i>	UBOCC-A-109192	Factory air
<i>Mucor circinelloides</i>	UBOCC-A-109189	Cheese
<i>Mucor circinelloides</i>	UBOCC-A-109187	Dairy product
<i>Mucor circinelloides</i>	UBOCC-A-112187	Yoghurt
<i>Mucor racemosus</i>	UBOCC-A-109063	Yoghurt
<i>Mucor racemosus</i>	UBOCC-A-109155	Industry
<i>Mucor racemosus</i>	UBOCC-A-109215	Dry sausage
<i>Mucor racemosus</i>	UBOCC-A-108091	Cheese
<i>Mucor racemosus</i>	UBOCC-A-102007	Egg product
<i>Penicillium bialowiezense</i>	UBOCC-A-116015	Salmon cake
<i>Penicillium bialowiezense</i>	UBOCC-A-115023	Chesnut
<i>Penicillium bialowiezense</i>	UBOCC-A-117365	Cheese
<i>Penicillium bialowiezense</i>	UBOCC-A-117332	Bread
<i>Penicillium bialowiezense</i>	UBOCC-A-116016	Cake
<i>Penicillium brevicompactum</i>	UBOCC-A-110065	Crepe
<i>Penicillium brevicompactum</i>	UBOCC-A-108095	Cheese maker
<i>Penicillium brevicompactum</i>	UBOCC-A-101383	Cheese
<i>Penicillium chrysogenum</i>	UBOCC-A-106023	Bread
<i>Penicillium chrysogenum</i>	UBOCC-A-112108	Dry sausage
<i>Penicillium chrysogenum</i>	UBOCC-A-112077	Small sweet bun
<i>Penicillium chrysogenum</i>	UBOCC-A-110067	Grape
<i>Penicillium chrysogenum</i>	UBOCC-A-106024	Milk
<i>Penicillium commune</i>	UBOCC-A-117076	Cheese
<i>Penicillium commune</i>	UBOCC-A-117056	Cheese
<i>Penicillium commune</i>	UBOCC-A-116003	Cheese
<i>Penicillium commune</i>	UBOCC-A-110177	Cheese
<i>Penicillium commune</i>	UBOCC-A-101402	Cheese
<i>Penicillium roqueforti</i>	F75-6	Cheese
<i>Penicillium roqueforti</i>	PTX.PR.22.2	Cheese

Species	Strain number	Origin
<i>Penicillium roqueforti</i>	PTX.PR.18.3	Cheese
<i>Penicillium roqueforti</i>	F41-4	Cheese
<i>Penicillium roqueforti</i>	FM164	Cheese
<i>Rhizopus stolonifer</i>	UBOCC-A-108116	Dry sausage
<i>Rhizopus stolonifer</i>	UBOCC-A-117300	Unknown
<i>Rhizopus stolonifer</i>	UBOCC-A-110252	Bread
<i>Rhizopus stolonifer</i>	UBOCC-A-110251	Waffle

505

506

507 Table 2 : Tested fungal strains and concentrations of sodium benzoate, potassium sorbate and

508 natamycin for validation of predicted MIC .

Tested species/strains	Sodium benzoate MIC (g/L)		Potassium sorbate MIC (g/L)	
	Lower CL*	Upper CL	Lower CL	Upper CL
<i>Aspergillus flavus</i> UBOCC-A-106033	0.59	0.89	0.23	0.3
UBOCC-A-111232	0.73	0.87	0.37	0.52
<i>Mucor racemosus</i> UBOCC-A-109063	1.10	1.6	0.37	0.42
UBOCC-A-109155	1.43	1.53	0.48	0.58
<i>Penicillium chrysogenum</i> UBOCC-A-106023	0.32	0.6	0.35	0.54
UBOCC-A-112108	0.68	0.9	0.36	0.56

509 *CL, confidence limit at MIC \pm confidence interval at 95%

510 Table 3 : MIC of sodium benzoate, potassium sorbate and natamycin for the tested fungal species

Species	Sodium benzoate (g/L)			Potassium sorbate (g/L)			Natamycin (mg/L)		
	Apparent MIC $\pm \sigma^*$	μ_{\max} estimated MIC $\pm \sigma$	λ estimated MIC $\pm \sigma$	Apparent MIC $\pm \sigma$	μ_{\max} estimated MIC $\pm \sigma$	λ estimated MIC $\pm \sigma$	Apparent MIC $\pm \sigma$	μ_{\max} estimated MIC $\pm \sigma$	λ estimated MIC $\pm \sigma$
<i>A. flavus</i>	1.00 \pm 0.00	0.76 \pm 0.04	nd	0.34 \pm 0.09	0.26 \pm 0.08	0.72 \pm 0.47	4.50 \pm 1.12	nd	4.91 \pm 1.21
<i>A. niger</i>	1.80 \pm 0.45	nd*	nd	0.60 \pm 0.22	nd	0.73 \pm 0.07	1.50 \pm 0.56	nd	nd
<i>A. versicolor</i>	1.00 \pm 0.00	0.55 \pm 0.04	nd	0.26 \pm 0.09	0.22 \pm 0.09	0.23 \pm 0.07	5.00 \pm 0.00	nd	9.64 \pm 5.49
<i>C. halotolerans</i>	0.25 \pm 0.00	nd	nd	0.10 \pm 0.00	nd	nd	3.50 \pm 1.37	10.07 \pm 4.65	7.34 \pm 2.28
<i>C. sphaerospermum</i>	0.50 \pm 0.00	0.39 \pm 0.02	0.84 \pm 0.32	0.25 \pm 0.1	0.19 \pm 0.06	0.23 \pm 0.02	2.5 \pm 0.00	4.65 \pm 2.07	12.65 \pm 10.89
<i>F. domesticum</i>	0.25 \pm 0.00	nd	nd	0.10 \pm 0.00	nd	nd	1.67 \pm 0.72	nd	nd
<i>M. circinelloides</i>	1.20 \pm 0.45	1.37 \pm 0.45	1.33 \pm 0.17	0.50 \pm 0.00	nd	0.48 \pm 0.06	4.00 \pm 1.37	8.09 \pm 5.54	4.91 \pm 1.75
<i>M. racemosus</i>	1.00 \pm 0.00	1.68 \pm 0.58	1.27 \pm 0.14	0.50 \pm 0.00	0.42 \pm 0.07	0.52 \pm 0.13	4.50 \pm 1.12	7.01 \pm 3.41	5.92 \pm 3.00
<i>P. bialowiezense</i>	0.55 \pm 0.41	0.40 \pm 0.21	0.69 \pm 0.60	0.22 \pm 0.11	0.31 \pm 0.15	0.20 \pm 0.10	1.25 \pm 0.00	nd	nd
<i>P. brevicompactum</i>	0.83 \pm 0.29	nd	nd	0.37 \pm 0.12	nd	nd	2.5 \pm 0.00	nd	nd
<i>P. chrysogenum</i>	0.80 \pm 0.27	0.50 \pm 0.03	0.75 \pm 0.23	0.26 \pm 0.09	0.37 \pm 0.08	0.54 \pm 0.14	2.5 \pm 0.00	12.39 \pm 6.94	13.59 \pm 5.97
<i>P. commune</i>	1.00 \pm 0.00	0.53 \pm 0.02	nd	0.30 \pm 0.00	0.14 \pm 0.01	0.55 \pm 0.18	2.5 \pm 0.00	nd	nd
<i>P. roqueforti</i>	1.00 \pm 0.00	0.55 \pm 0.03	nd	0.70 \pm 0.27	0.44 \pm 0.09	0.78 \pm 0.34	2.5 \pm 0.00	nd	6.85 \pm 2.62
<i>R. stolonifer</i>	0.88 \pm 0.25	1.92 \pm 1.90	0.65 \pm 0.09	0.30 \pm 0.00	0.30 \pm 0.04	0.17 \pm 0.02	7.50 \pm 2.89	7.34 \pm 0.98	6.43 \pm 0.77

511 *nd = not determined, σ = standard deviation

512 Table 4 : Validation of predicted growth/no growth boundaries in PDB and PDA media

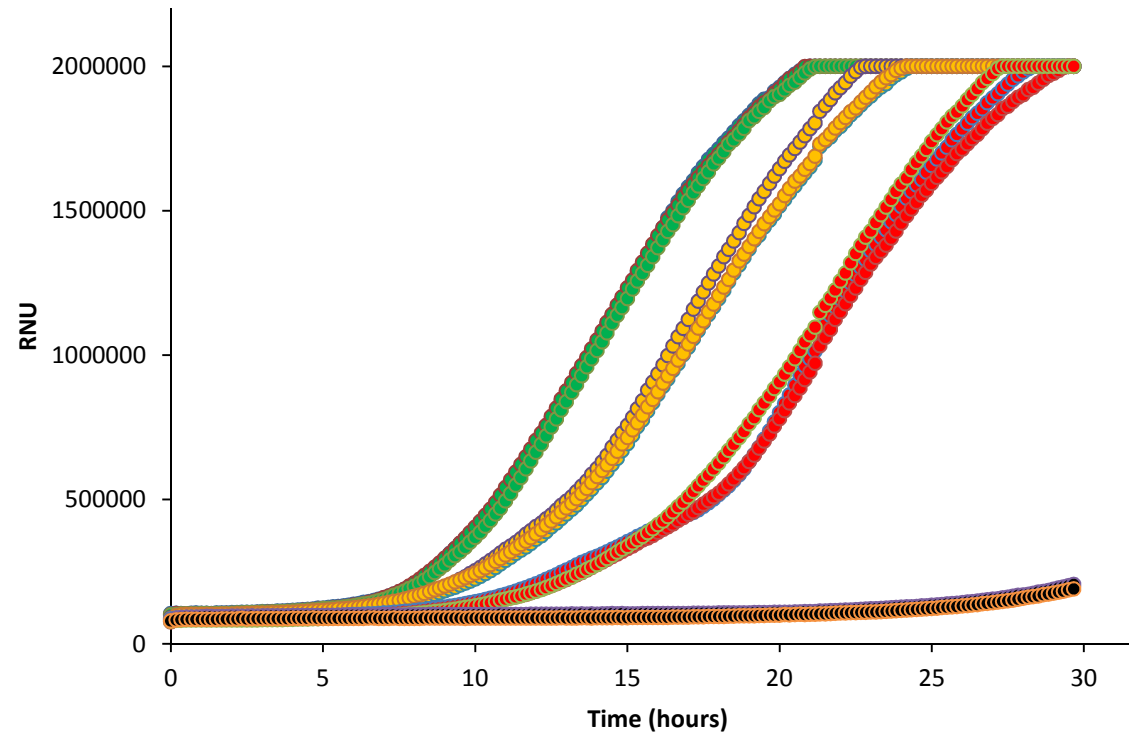
Tested species/strains	Liquid medium				Solid medium			
	Sodium benzoate MIC		Potassium sorbate MIC		Sodium benzoate MIC		Potassium sorbate MIC	
	Lower CL	Upper CL	Lower CL	Upper CL	Lower CL	Upper CL	Lower CL	Upper CL
<i>Aspergillus flavus</i> UBOCC-A-106033	G* (24h)	G (35h)	G (35h)	G (42h)	G (3d)	G (3d)	G (3d)	G (3d)
UBOCC-A-111232	G (30h)	G (30h)	G (40h)	G (40h)	G (3d)	G (3d)	G (5d)	G (5d)
<i>Mucor racemosus</i> UBOCC-A-109063	G (89h)	NG	G (24h)	G (48h)	G (5d)	NG	G (5d)	G (5d)
UBOCC-A-109155	NG*	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG
<i>Penicillium chrysogenum</i> UBOCC-A-106023	G (48h)	G (128h)	G (133h)	NG	NG	NG	G (5d)	G (14d)
UBOCC-A-112108	G (64h)	G (80h)	G (40h)	NG	G (3d)	G (3d)	G (5d)	G (7d)

513 *G = Growth, NG = No Growth

514 Table S1 : Apparent and predicted MIC estimated on the maximal growth rate and latency of the tested strains in presence of sodium benzoate, potassium
515 sorbate and natamycine

Species	Strain number	Sodium benzoate (g/L)					Potassium sorbate (g/L)					Natamycin (mg/L)				
		App. MIC	μ_{\max} MIC	r^2	λ MIC	r^2	App. MIC	μ_{\max} MIC	r^2	λ MIC	r^2	App. MIC	μ_{\max} MIC	r^2	λ MIC	r^2
<i>A. flavus</i>	UBOCC-A-108068	1	0.71	0.93	nd	nd	0.3	0.38	0.96	0.44	0.98	5	nd	nd	5.26	0.94
<i>A. flavus</i>	UBOCC-A-111232	1	0.81	0.97	nd	nd	0.5	0.25	0.92	0.47	0.96	2.5	3.30	0.66	2.87	0.88
<i>A. flavus</i>	UBOCC-A-111076	1	0.75	0.85	nd	nd	0.3	0.25	0.95	0.53	0.90	5	nd	nd	6.10	0.88
<i>A. flavus</i>	UBOCC-A-108066	1	0.76	0.92	nd	nd	0.3	0.15	0.98	1.56	0.53	5	nd	nd	5.11	0.89
<i>A. flavus</i>	UBOCC-A-106033	1	0.75	0.86	nd	nd	0.3	0.28	0.98	0.61	0.99	5	nd	nd	5.18	0.97
<i>A. niger</i>	UBOCC-A-112064	2	nd	nd	nd	nd	0.5	nd	nd	0.82	0.68	1.25	nd	nd	nd	nd
<i>A. niger</i>	UBOCC-A-111267	2	nd	nd	nd	nd	0.5	nd	nd	0.69	0.93	1.25	nd	nd	nd	nd
<i>A. niger</i>	UBOCC-A-111099	2	nd	nd	nd	nd	0.5	nd	nd	0.78	0.97	1.25	nd	nd	nd	nd
<i>A. niger</i>	UBOCC-A-112080	2	nd	nd	nd	nd	0.5	nd	nd	0.7	0.95	2.5	1.68	0.97	nd	nd
<i>A. niger</i>	UBOCC-A-112068	1	nd	nd	nd	nd	1	nd	nd	0.65	0.89	1.25	nd	nd	nd	nd
<i>A. versicolor</i>	UBOCC-A-110226	1	0.58	0.84	nd	nd	0.3	0.22	0.73	0.24	0.97	5	nd	nd	4.46	0.76
<i>A. versicolor</i>	UBOCC-A-102012	1	0.56	0.87	nd	nd	0.3	nd	nd	0.16	0.99	5	nd	nd	7.64	0.75
<i>A. versicolor</i>	UBOCC-A-101088	1	0.57	0.88	nd	nd	0.3	nd	nd	0.15	0.99	5	nd	nd	13.1	0.68
<i>A. versicolor</i>	UBOCC-A-101087	1	0.49	0.81	nd	nd	0.1	nd	nd	0.34	0.82	5	nd	nd	5.57	0.78
<i>A. versicolor</i>	UBOCC-A-112085	1	0.56	0.76	nd	nd	0.3	0.16	0.91	0.24	0.95	5	nd	nd	17.4	0.70
<i>C. halotolerans</i>	UBOCC-A-113075	0.25	nd	nd	nd	nd	0.1	nd	nd	nd	nd	2.5	11.9	0.72	10.2	0.9
<i>C. halotolerans</i>	UBOCC-A-113074	0.25	nd	nd	nd	nd	0.1	nd	nd	nd	nd	5	16.1	0.46	6.17	0.98
<i>C. halotolerans</i>	UBOCC-A-113073	0.25	nd	nd	nd	nd	0.1	nd	nd	nd	nd	5	11.5	0.39	9.45	0.94
<i>C. halotolerans</i>	UBOCC-A-117047	0.25	nd	nd	nd	nd	0.1	nd	nd	nd	nd	2.5	4.54	0.87	5.64	0.92
<i>C. halotolerans</i>	UBOCC-A-116001	0.25	nd	nd	nd	nd	0.1	nd	nd	nd	nd	2.5	6.32	0.78	5.30	0.98
<i>C. sphaerospermum</i>	UBOCC-A-101111	0.5	nd	nd	nd	nd	0.3	0.24	0.89	0.25	0.92	2.5	4.16	0.66	12.0	0.99
<i>C. sphaerospermum</i>	UBOCC-A-112116	0.5	0.37	0.96	0.59	0.85	0.3	0.15	0.99	0.22	0.98	2.5	7.47	0.5	7.19	0.7
<i>C. sphaerospermum</i>	UBOCC-A-101107	0.5	0.40	0.99	1.20	0.93	0.3	nd	nd	0.23	0.94	2.5	4.45	0.65	28.1	0.62
<i>C. sphaerospermum</i>	UBOCC-A-113079	0.5	0.40	0.97	0.73	0.99	0.1	nd	nd	nd	nd	2.5	2.51	0.91	3.35	0.86
<i>F. domesticum</i>	UBOCC-A-117075	0.25	nd	nd	nd	nd	0.1	nd	nd	nd	nd	1.25	nd	nd	nd	nd
<i>F. domesticum</i>	UBOCC-A-113010	0.25	nd	nd	nd	nd	0.1	nd	nd	nd	nd	1.25	nd	nd	nd	nd
<i>F. domesticum</i>	UBOCC-A-118040	0.25	nd	nd	nd	nd	0.1	nd	nd	nd	nd	2.5	6.83	0.87	2.81	0.93
<i>M. circinelloides</i>	UBOCC-A-109201	1	1.06	0.84	1.58	0.99	0.5	nd	nd	0.41	0.99	5	16.0	0.68	6.79	0.82
<i>M. circinelloides</i>	UBOCC-A-109192	1	1.16	0.9	1.30	0.99	0.5	nd	nd	0.43	0.99	2.5	3.02	0.83	3.04	0.81
<i>M. circinelloides</i>	UBOCC-A-109189	1	1.30	0.93	1.24	0.99	0.5	nd	nd	0.55	0.92	2.5	3.03	0.82	3.04	0.82

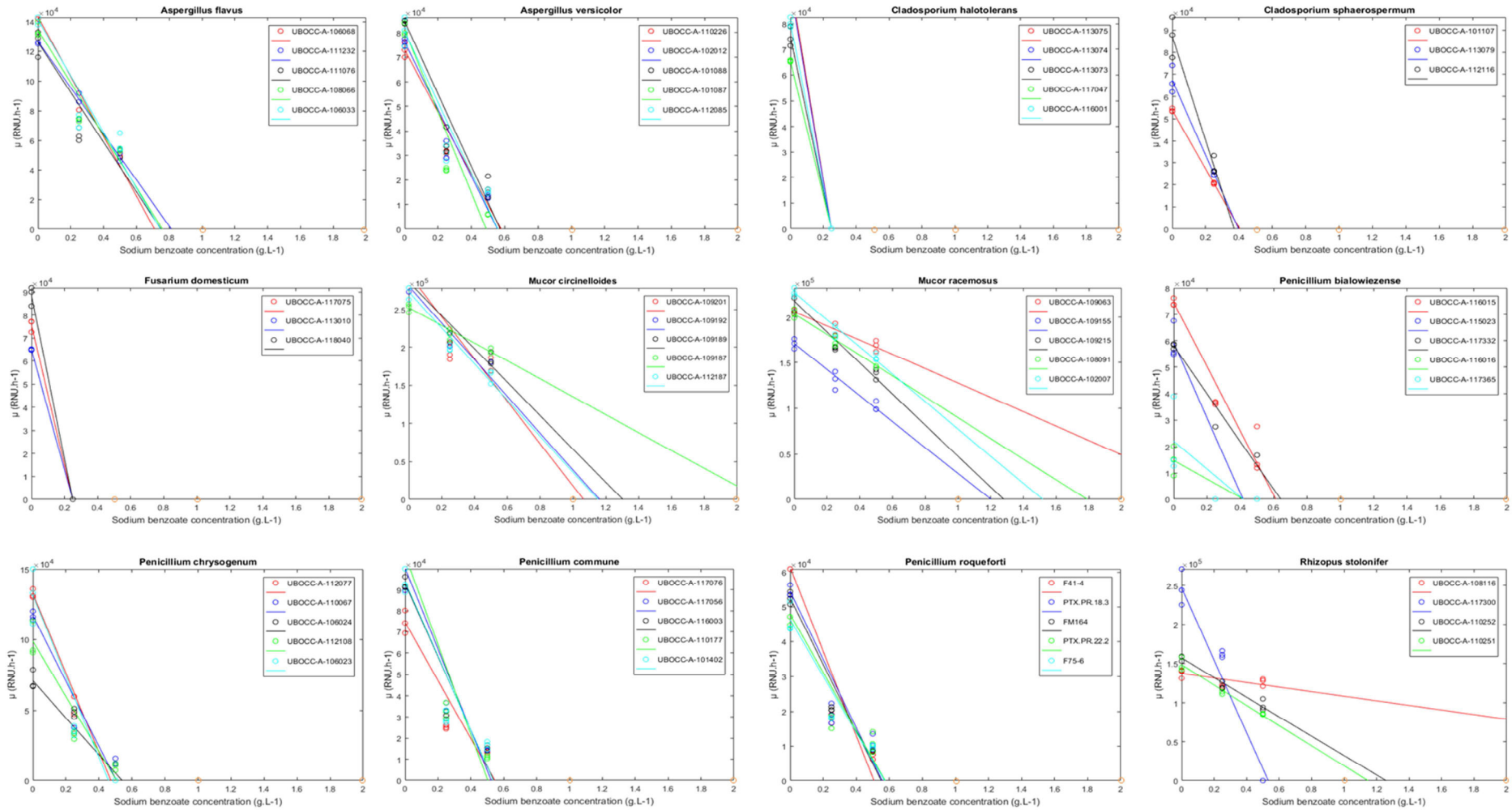
<i>M. circinelloides</i>	UBOCC-A-109187	1	2.15	0.94	1.13	0.98	0.5	nd	nd	0.53	0.97	5	7.31	0.90	5.82	0.85
<i>M. circinelloides</i>	UBOCC-A-112187	2	1.15	0.95	1.39	0.98	0.5	nd	nd	0.48	0.95	5	11.1	0.75	5.86	0.88
<i>M. racemosus</i>	UBOCC-A-109063	1	2.63	0.89	1.31	0.99	0.5	0.42	0.92	0.37	0.99	5	11.3	0.80	10.6	0.87
<i>M. racemosus</i>	UBOCC-A-109155	1	1.20	0.95	1.48	0.98	0.5	0.50	0.93	0.53	0.98	2.5	2.32	0.89	2.36	0.92
<i>M. racemosus</i>	UBOCC-A-109215	1	1.28	0.95	1.15	0.99	0.5	0.31	0.98	0.73	0.72	5	5.20	0.93	4.74	0.88
<i>M. racemosus</i>	UBOCC-A-108091	1	1.79	0.96	1.14	0.99	0.5	0.46	0.98	0.49	0.94	5	8.52	0.85	5.92	0.79
<i>M. racemosus</i>	UBOCC-A-102007	1	1.52	0.96	1.27	0.99	0.5	0.40	0.96	0.46	0.93	5	7.69	0.98	5.98	0.80
<i>P. bialowiezense</i>	UBOCC-A-116015	1	0.61	0.93	1.41	0.94	0.3	nd	nd	0.32	0.99	1.25	nd	nd	nd	nd
<i>P. bialowiezense</i>	UBOCC-A-115023	0.25	nd	nd	nd	nd	0.3	0.53	0.63	0.20	0.99	1.25	nd	nd	nd	nd
<i>P. bialowiezense</i>	UBOCC-A-117365	0.25	nd	nd	nd	nd	0.1	nd	nd	nd	nd	1.25	nd	nd	nd	nd
<i>P. bialowiezense</i>	UBOCC-A-117332	1	0.64	0.93	1.28	0.94	0.3	nd	nd	0.29	0.95	1.25	nd	nd	nd	nd
<i>P. bialowiezense</i>	UBOCC-A-116016	0.25	nd	nd	nd	nd	0.1	nd	nd	nd	nd	1.25	nd	nd	nd	nd
<i>P. brevicompactum</i>	UBOCC-A-110065	1	nd	nd	nd	nd	0.3	nd	nd	nd	nd	2.5	nd	nd	nd	nd
<i>P. brevicompactum</i>	UBOCC-A-108095	0.5	nd	nd	nd	nd	0.3	nd	nd	nd	nd	2.5	nd	nd	nd	nd
<i>P. brevicompactum</i>	UBOCC-A-101383	1	nd	nd	nd	nd	0.5	nd	nd	nd	nd	2.5	nd	nd	nd	nd
<i>P. chrysogenum</i>	UBOCC-A-106023	0.5	0.46	0.91	0.54	0.95	0.3	0.43	0.90	0.44	0.94	2.5	9.79	0.86	19.6	0.59
<i>P. chrysogenum</i>	UBOCC-A-112108	1	0.51	0.9	nd	nd	0.3	0.44	0.73	0.46	0.95	2.5	nd	nd	13.8	0.69
<i>P. chrysogenum</i>	UBOCC-A-112077	0.5	0.47	0.96	0.59	0.83	0.1	nd	nd	nd	nd	2.5	20.3	0.21	18.9	0.70
<i>P. chrysogenum</i>	UBOCC-A-110067	1	0.51	0.9	nd	nd	0.3	0.34	0.85	0.74	0.85	2.5	nd	nd	5.36	0.80
<i>P. chrysogenum</i>	UBOCC-A-106024	1	0.54	0.94	0.60	0.79	0.3	0.28	0.77	0.51	0.75	2.5	7.13	0.70	10.3	0.65
<i>P. commune</i>	UBOCC-A-117076	1	0.55	0.88	nd	nd	0.3	0.15	0.98	0.39	0.97	2.5	nd	nd	nd	nd
<i>P. commune</i>	UBOCC-A-117056	1	0.52	0.89	nd	nd	0.3	0.14	0.99	0.69	0.87	2.5	nd	nd	nd	nd
<i>P. commune</i>	UBOCC-A-116003	1	0.54	0.90	nd	nd	0.3	0.16	0.98	0.41	0.95	2.5	nd	nd	nd	nd
<i>P. commune</i>	UBOCC-A-110177	1	0.50	0.83	nd	nd	0.3	0.12	0.96	nd	nd	2.5	6.35	0.67	nd	nd
<i>P. commune</i>	UBOCC-A-101402	1	0.54	0.87	nd	nd	0.3	0.13	0.99	0.71	0.75	2.5	nd	nd	nd	nd
<i>P. roqueforti</i>	F75-6	1	0.57	0.89	nd	nd	1	0.56	0.82	0.65	0.88	2.5	nd	nd	5.89	0.92
<i>P. roqueforti</i>	PTX.PR.22.2	1	0.58	0.86	nd	nd	1	0.32	0.99	0.67	0.97	2.5	nd	nd	10.6	0.85
<i>P. roqueforti</i>	PTX.PR.18.3	1	0.56	0.93	nd	nd	0.5	0.50	0.77	1.39	0.83	2.5	nd	nd	nd	nd
<i>P. roqueforti</i>	F41-4	1	0.51	0.89	nd	nd	0.5	0.44	0.93	0.55	0.82	2.5	15.6	0.32	4.60	0.87
<i>P. roqueforti</i>	FM164	1	0.55	0.93	nd	nd	0.5	0.39	0.75	0.63	0.90	2.5	nd	nd	6.27	0.90
<i>R. stolonifer</i>	UBOCC-A-108116	1	4.73	0.38	0.68	0.98	0.3	0.26	0.94	0.17	0.98	5	7.13	0.9	5.75	0.81
<i>R. stolonifer</i>	UBOCC-A-117300	0.5	0.53	0.96	0.52	0.98	0.3	0.31	0.87	0.20	0.99	10	8.48	0.84	nd	nd
<i>R. stolonifer</i>	UBOCC-A-110252	1	1.28	0.96	0.65	0.99	0.3	0.29	0.95	0.15	0.99	10	7.60	0.70	7.27	0.85
<i>R. stolonifer</i>	UBOCC-A-110251	1	1.15	0.97	0.75	0.99	0.3	0.36	0.81	0.15	0.93	5	6.14	0.83	6.26	0.81



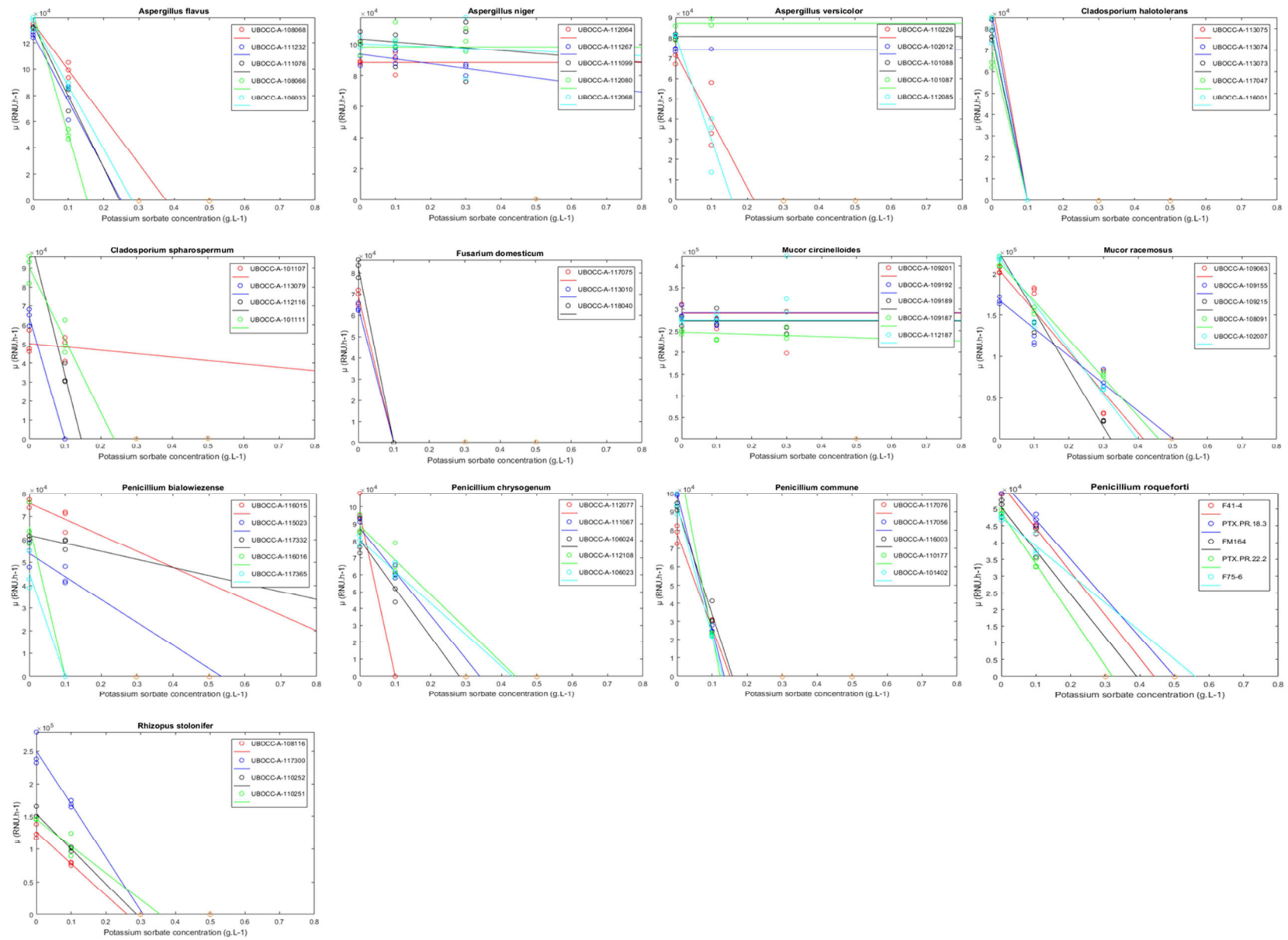
517
518 Figure 1 : Nephelometric growth curves of *Mucor racemosus* UBOCC-A-109063 exposed to different concentrations of sodium benzoate, measurements
519 were done in triplicates. Green dots curves, orange dots curves, red dot curves and black dots curves correspond to sodium benzoate concentrations of 0 –
520 0.25 – 0.5 and 1 g/L respectively

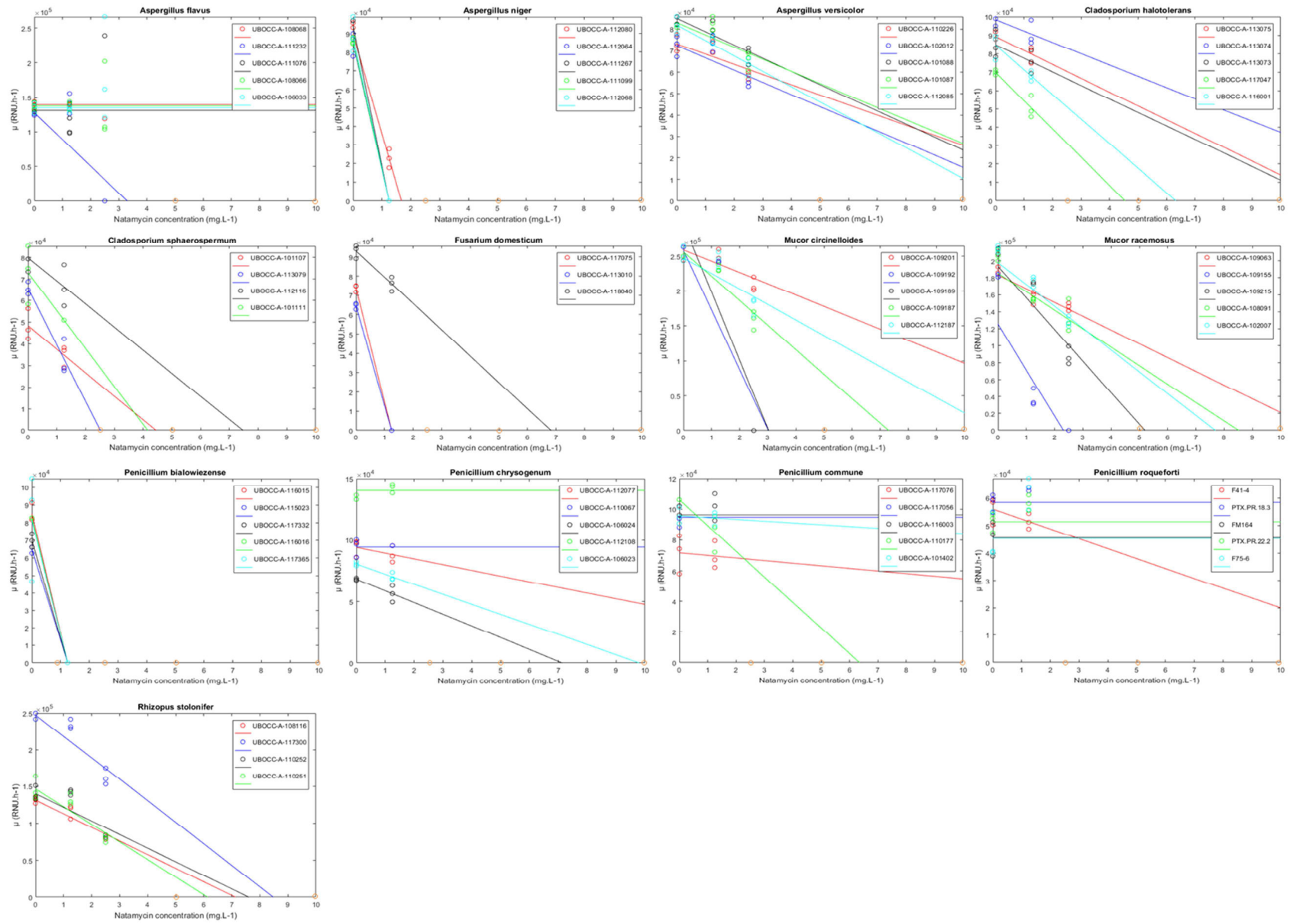
521 Figure 2A : Secondary models describing the effect of sodium benzoate, potassium sorbate and natamycine on maximal growth rates for the tested species.

522 Tested concentrations for which no growth was detected are shown as orange circles

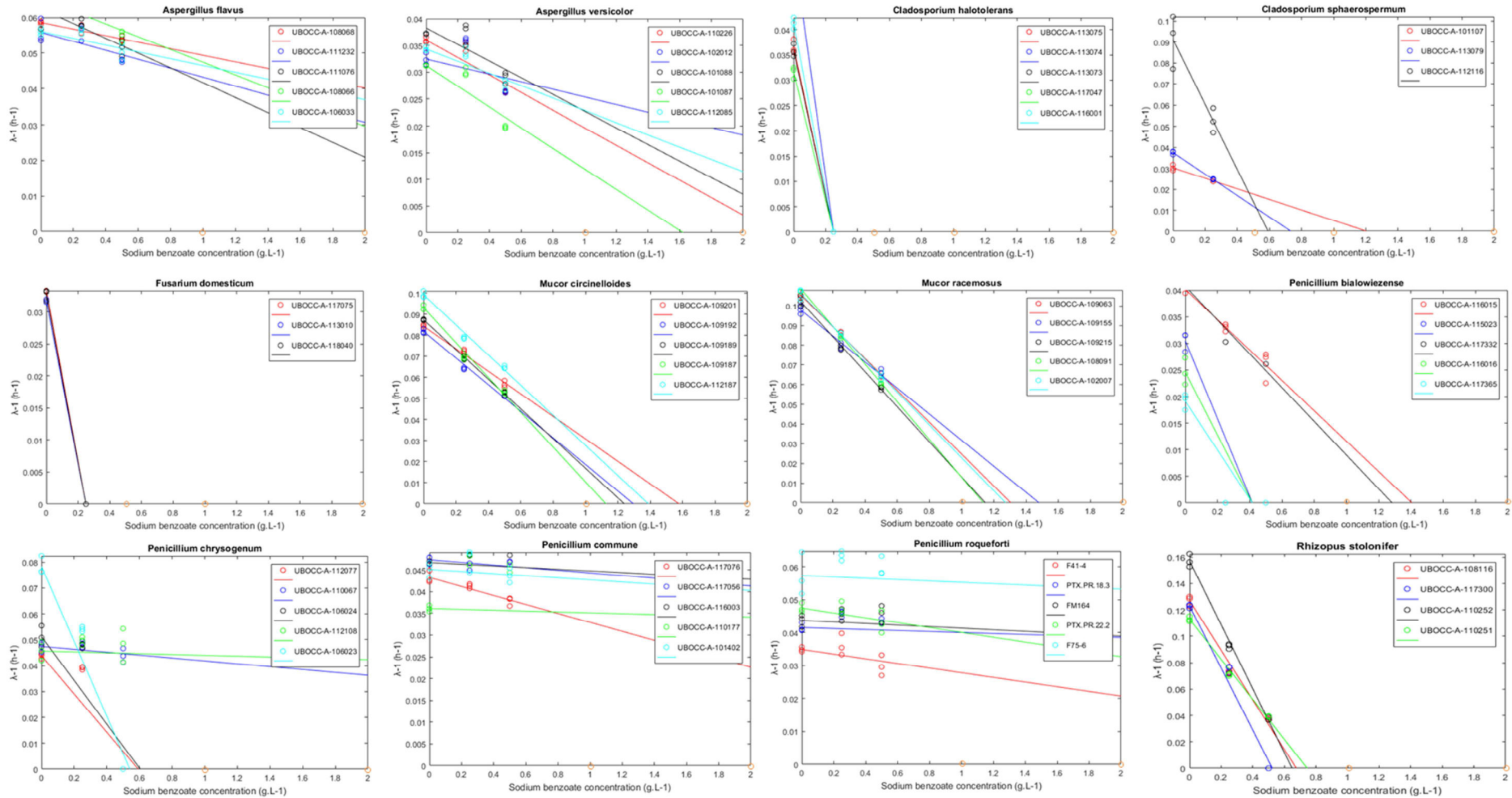


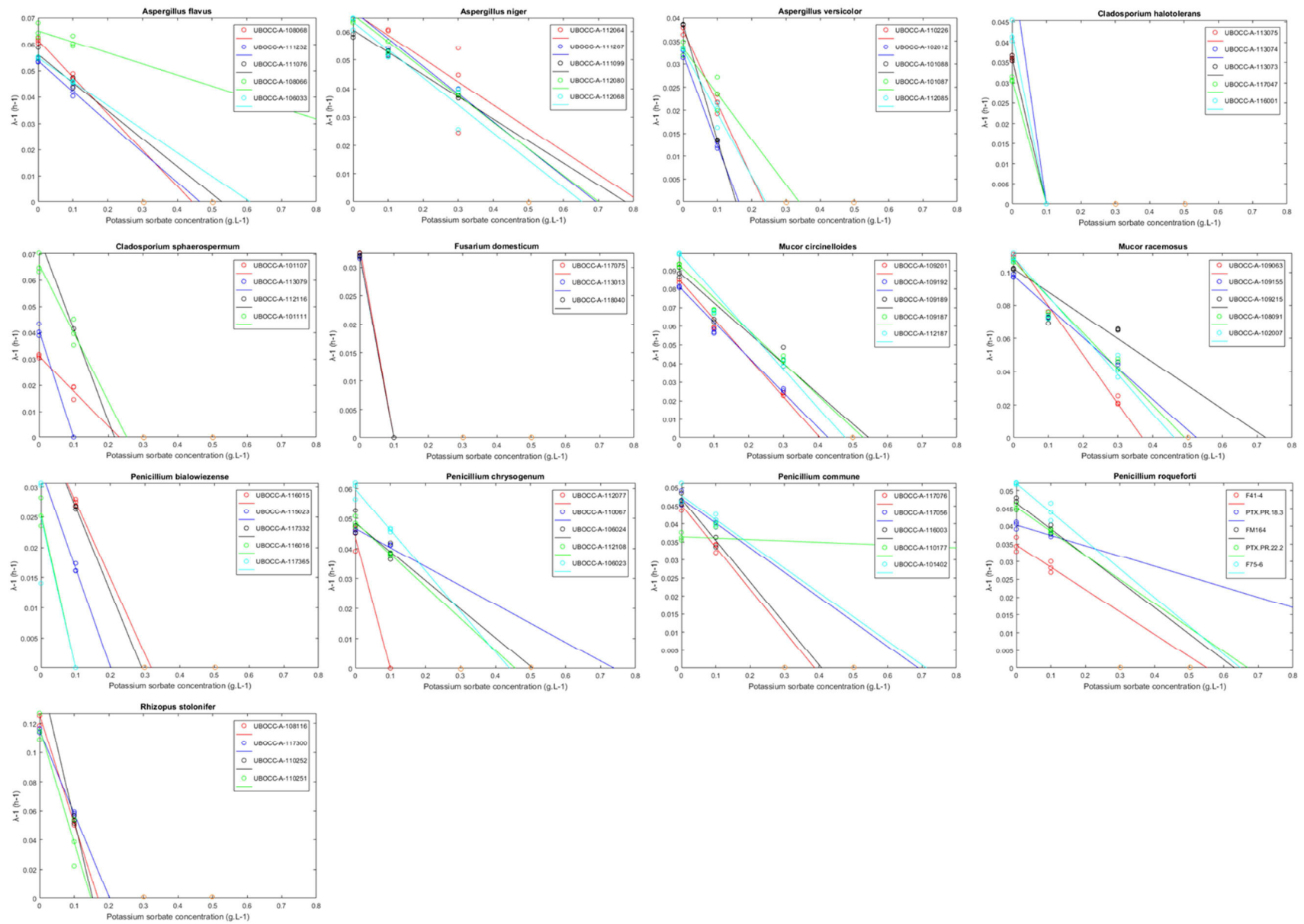
523

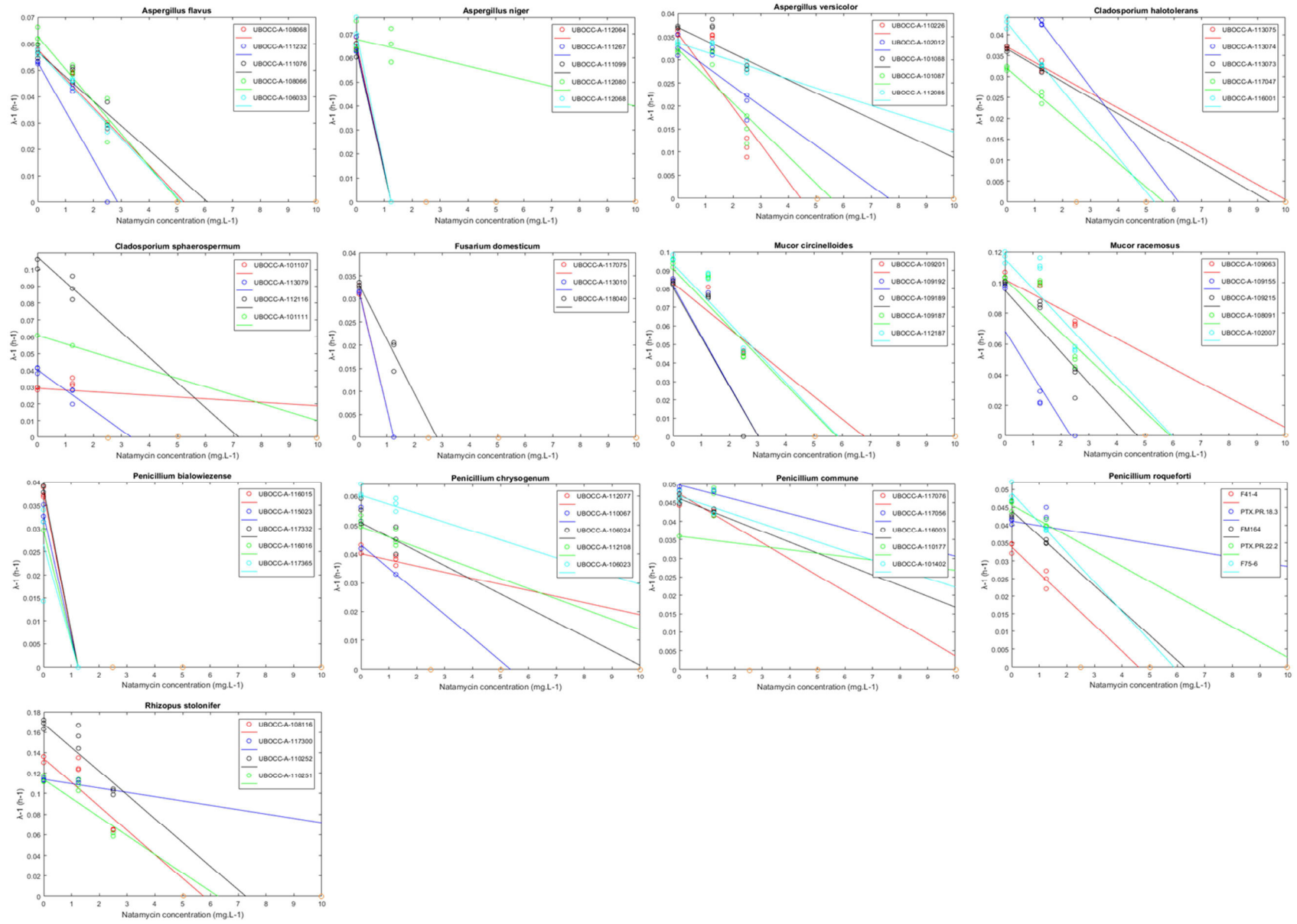




526 Figure 2B : Secondary models describing the effect of sodium benzoate, potassium sorbate and natamycine on latency for the tested species. Tested
 527 concentrations for which no growth was detected are shown as orange circles







Discussion générale et perspectives

A l'échelle mondiale, l'altération des matières premières et des produits alimentaires par les microorganismes représente un enjeu majeur, car elle est à l'origine d'importantes pertes et gaspillages alimentaires ayant un fort impact économique. Mais aussi car cette altération peut représenter un danger sanitaire à cause de la production potentielle de mycotoxines par certains champignons filamenteux d'altération. Dans ce contexte, la maîtrise du développement de ces contaminants représente un défi important pour les industriels et cette maîtrise passe par une bonne connaissance des champignons filamenteux d'altération. Une des étapes clé de la lutte contre les contaminants fongiques est leur identification, qui peut permettre d'accéder à de nombreuses informations telles que par exemple leur réponse à l'ajout de conservateurs et aux traitements thermiques, mais aussi la production éventuelle de mycotoxines, toutes ces informations permettant de mieux appréhender les mesures correctives et préventives à mettre en place afin d'éviter les altérations. Actuellement, les méthodes d'identification des champignons filamenteux font majoritairement appel à des techniques phénotypiques et génotypiques, qui peuvent s'avérer fastidieuses et requièrent une certaine expertise, ce qui souligne le besoin de techniques alternatives d'identification fiables, rapides et haut-débit. Pour cela, le premier axe des travaux effectués dans le cadre de cette thèse a été consacré au développement d'une base de données spectrales afin de permettre l'identification des champignons filamenteux d'altération par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le développement de bases de données spectrales doit répondre à plusieurs problématiques, afin d'obtenir des performances d'identification satisfaisantes. La première problématique concernait le choix des espèces à intégrer, qui ont été choisies en fonction de plusieurs critères afin de représenter au mieux les espèces les plus retrouvées en contexte agro-alimentaire et la diversité taxonomique existant au sein des champignons d'altération. Parmi ces critères, on retrouvait la fréquence d'apparition de l'espèce dans les aliments, la capacité de l'espèce à croître sur différents types d'aliments ou encore si la production de mycotoxines était connue ou non. Nous avons ainsi pu sélectionner les 136 espèces fongiques à intégrer dans la base de données. Outre le choix des espèces, un autre critère important est la sélection des souches utilisées pour chaque espèce. Il peut exister une importante diversité intra-spécifique au sein des flores d'altération, en terme de morphologie (Gillot et al., 2015), de croissance ou de métabolisme (Garcia et al. 2011). De plus, il a été démontré que le nombre de souches et de spectres par souche utilisé pour développer une base de données spectrales avait une influence directe sur les performances d'identification de cette dernière. Cette amélioration était valide jusqu'à un certain point, par exemple l'utilisation de 40 spectres par souches générait des performances similaires à celles obtenues avec 10 spectres par

souches (Normand et al., 2013). De manière générale, il est préférable d'utiliser un nombre minimal de 3 souches par espèce et de 10 spectres acquis pour chaque souche. Cependant, et nous avons pu l'observer lors de notre étude, il est parfois difficile d'atteindre un nombre de souches satisfaisant, particulièrement pour les espèces rares ou récemment décrites. Dans ce cas, une alternative proposée par certains auteurs (Normand et al. 2013) serait d'augmenter le nombre de réplicats biologiques d'une même souche plutôt que d'augmenter le nombre de spectres. Il faut également rappeler qu'il est nécessaire d'utiliser, dans la mesure du possible, des souches fongiques bien caractérisées, dont l'identification et l'assignation taxonomique sont vérifiées afin de ne pas introduire de biais ou de source d'erreur lors de l'utilisation de cette base de données. La spectrométrie de masse MALDI-TOF étant une méthode basée sur l'analyse de caractères phénotypiques, les variations éventuelles de ces derniers peuvent également avoir une influence sur les performances d'identification. C'est pourquoi il est nécessaire de prendre en compte les paramètres de culture pouvant influencer le développement et la morphologie des champignons filamenteux tels que le milieu de culture, le temps de culture ou encore la température d'incubation. L'utilisation de conditions de culture standardisées et limitées (un seul milieu, un seul temps de culture et une seule température) permet de restreindre la variabilité phénotypique des champignons. Mais plus une méthode est limitée et stricte, moins elle sera aisée à utiliser et implémenter dans un contexte de routine exigeant du haut-débit. Il est donc nécessaire de proposer des protocoles rapides et robustes, permettant l'utilisation de différents milieux et temps de culture, et pour cela, construire les bases de données spectrales en utilisant des conditions expérimentales variées. Dans ce but, nous avons développé la base de données en utilisant 4 milieux solides et 2 temps de culture différents, et nous n'avons pas observé d'impact significatif des conditions expérimentales sur les performances de la base de données. De nombreux auteurs ont souligné l'avantage d'utiliser un milieu de culture solide plutôt que liquide, qui permet d'effectuer l'analyse dès qu'il y a une croissance visible, alors que les protocoles liquides exigent une pré-culture en milieu solide ce qui allonge la durée d'analyse (Panda et al. 2015; Paul et al. 2018). Pour l'acquisition des spectres, certains auteurs ont proposé des méthodes directes (Marchetti-Deschmann et al. 2012; De Carolis et al. 2012), où le matériel biologique était analysé directement sans pré-traitement avant acquisition des spectres, mais ces méthodes ont été abandonnées au profit de protocoles d'extraction protéique, permettant d'obtenir des spectres de manière plus répétable et de prévenir une éventuelle contamination par la dissémination de spores lors du dépôt direct (Paul et al. 2017). Ces protocoles sont rapides et simples à exécuter ce qui facilite leur utilisation en routine. La prise en compte de

tous ces paramètres nous a permis de sélectionner 620 souches correspondant aux 136 espèces sélectionnées, pour lesquelles nous avons acquis près de 6500 spectres, qui ont été intégrés à la base de données spectrales. Lors de l'évaluation des performances de cette base de données avec des souches externes, près de 90% des spectres ont été correctement identifiés. Ces résultats viennent confirmer la fiabilité de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification à l'espèce d'un grand nombre de champignons filamenteux d'altération à l'espèce, comme alternative aux méthodes classiques telles que le séquençage de l'ADN, et ouvrent également de nouvelles perspectives, notamment concernant l'application de la technique à l'identification directe des contaminants fongiques à partir de matrice alimentaire. Il est cependant à noter que la base de données développée au cours de ce projet n'est pas exhaustive et devra être élargie afin de répondre aux attentes des industriels et de représenter au mieux la très grande diversité des espèces fongiques d'altération.

Lors de ce travail, la technique s'est avérée moins puissante pour l'identification d'espèces fongiques proches, notamment au sein de complexes d'espèces. Par exemple, il n'a pas été possible de différencier totalement *Aspergillus foetidus* et *Aspergillus lacticoffeatus*, qui font partie du complexe *Aspergillus niger*. De plus, certaines espèces phylogénétiquement proches telles que *Penicillium camemberti* et *Penicillium commune* n'ont pas pu être séparées sur la base de leurs spectres, par l'algorithme utilisé pour construire la base de données. Au contraire, les espèces du complexe *Cladosporium sphaerospermum* intégrées à la base de données ont pu être parfaitement différenciées et correctement identifiées. Ces résultats révèlent donc les limites potentielles de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour la différenciation d'espèces fongiques proches et soulèvent la question de son application à la résolution de complexes d'espèces et au typage intra-spécifique qui pourrait être d'un grand intérêt en contexte agro-alimentaire. Notamment pour permettre la différenciation entre des espèces d'altération toxigènes et des espèces technologiques non toxigènes très proches comme *Aspergillus flavus* et *Aspergillus oryzae*, ou encore la différenciation d'isolats au sein d'une même espèce afin de mieux comprendre les processus de domestication des espèces technologiques impliquées dans la production d'aliments fermentés mais également de sélectionner les isolats les plus performants impliqués dans ces processus. A ce jour, de nombreuses publications ont mis en évidence l'applicabilité de la spectrométrie de masse MALDI-TOF à la résolution de complexes d'espèces et au typage chez les bactéries (Fujinami et al., 2011, Ueda et al., 2015, Vargha et al., 2006) en contexte clinique. Certains auteurs ont également pu appliquer la technique en contexte industriel, par exemple pour la

différenciation des levures utilisées en brasserie (Lauterbach et al. 2017), avec des résultats équivalents à ceux obtenus grâce aux méthodes conventionnelles de typage basées sur l'analyse de l'ADN. En revanche, très peu d'études se sont intéressées à cette problématique chez les champignons filamenteux d'intérêt agro-alimentaire. C'est pourquoi la deuxième partie de ce travail de thèse s'est consacrée à évaluer le pouvoir discriminant de la spectrométrie de masse MALDI-TOF dans deux cas de figure, au sein d'un complexe d'espèces, puis au sein d'une même espèce. Lors de notre étude, des spectres ont été acquis pour 23 espèces du complexe *Aspergillus* section *Flavi*, parmi lesquelles se trouvent des espèces responsables d'altération, des espèces toxigènes mais également des espèces utilisées en tant que flore technologique, leur identification correcte et leur différenciation sont donc essentielles. La construction d'une base de données grâce à l'algorithme utilisé précédemment a permis d'obtenir une séparation parfaite des espèces analysées, même dans le cas d'espèces proches telles que *A. parasiticus* et *A. sojae*, qui ne peuvent être différenciées d'un point de vue morphologique et nécessitent une analyse polyphasique comprenant l'analyse de plusieurs gènes et des métabolites produits pour être identifiées (Frisvad et al. 2019). Ces résultats viennent mettre en lumière le pouvoir discriminant de la technique pour différencier des espèces proches sur la base de spectres avec des résultats similaires à ceux obtenus par une approche polyphasique. Ces résultats soulignent également l'importance de disposer de bases de données exhaustives car des études menées sur un nombre restreint d'espèces de ce complexe n'ont pas pu séparer les espèces les plus proches telles que *A. parasiticus* et *A. sojae* (Rodrigues et al. 2011). Bien que les résultats obtenus ici soient prometteurs, il sera nécessaire de les valider avec des souches externes, pour évaluer la capacité de la base de données construite à identifier des isolats inconnus. De plus, il faudra s'assurer que des résultats similaires peuvent être obtenus pour d'autres complexes d'espèces, comme par exemple *Aspergillus* section *Nigri*, pour laquelle des espèces proches (*A. lacticoffeatus* et *A. foetidus* notamment) n'ont pas pu être différenciées lors du développement de la base de données. En effet, seules 5 espèces sur les 26 de cette section (Varga et al. 2011) avaient été intégrées à la base de données, il sera intéressant de déterminer si comme pour *Aspergillus* section *Flavi*, l'ajout d'un grand nombre d'espèces de ce complexe permet d'arriver à une identification satisfaisante. Après s'être intéressée à la discrimination d'un complexe d'espèce, la deuxième partie de cette étude a été consacrée à l'application de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour différencier des populations génétiques au sein de l'espèce *Penicillium roqueforti*. En effet, plusieurs études ont démontré via différentes méthodes de typage (Belen-Florez et al., 2007, Fontaine et al., 2015) qu'il était

possible de séparer des isolats de *P. roqueforti* en fonction de leur origine (souches fromagères ou souches issues de l'environnement). De plus, une étude menée sur 164 souches via l'analyse de marqueurs microsatellites (Gillot et al. 2015) a permis de distinguer 28 haplotypes différents, qui ont été regroupés en trois populations génétiques distinctes. C'est sur la base de ce travail que 63 isolats appartenant aux 3 populations génétiques décrites ont été sélectionnées et pour lesquels des spectres ont été acquis afin d'évaluer si ces isolats pouvaient être classés de la même manière sur la base de l'analyse des spectres. S'agissant d'isolats d'une même espèce, les spectres obtenus présentaient un fort pourcentage de similarité et n'étaient donc pas discriminés de manière satisfaisante lors de leur analyse. Pour améliorer les performances, une re-calibration des spectres a été effectuée, afin de corriger les éventuels décalages de masses et ainsi permettre une meilleure comparaison des spectres entre eux. Suite à cette re-calibration, une base de données a été construite avec les spectres des différents isolats permettant d'attribuer 94% des spectres à la bonne population génétique. De plus, lors de la validation avec des souches externes, 95% des spectres ont également été correctement attribués. Cette étude démontre que l'analyse des spectres obtenus par MALDI-TOF a permis de regrouper les isolats de *P. roqueforti* en 3 populations distinctes, générant des résultats similaires à ceux obtenus grâce à l'analyse génétique de marqueurs microsatellites. De plus, les spectres obtenus lors de cette étude ont été acquis en utilisant les paramètres habituels d'acquisition, indiquant qu'il serait possible d'effectuer le même type d'étude pour des spectres acquis dans les mêmes conditions lors d'études précédentes. La démarche utilisée ici était basée sur l'utilisation d'une base de données préalablement constituée avec les spectres d'isolats bien caractérisés. Cependant, il est à noter qu'une autre approche possible basée sur une analyse bioinformatique a été décrite pour le typage des bactéries. Cette démarche consiste à identifier les protéines présentes au sein des spectres de masse en comparant les m/z obtenus avec les masses théoriques de protéines obtenues grâce aux données de génomes séquencés. L'avantage de cette approche est qu'elle ne requiert pas la constitution de bases de données, cependant, elle repose sur la disponibilité et la fiabilité des génomes présents au sein des bases de données publiques qui est encore à améliorer pour les champignons filamenteux (Vu et al. 2019).

Ces résultats soulèvent de nombreuses questions car le typage par MALDI-TOF ne repose pas sur les mêmes marqueurs que ceux utilisés lors du typage génétique. L'analyse génétique repose sur l'utilisation de marqueurs constants contenus dans l'ADN, qui ne sont pas modifiés par les conditions environnementales et qui peuvent être exprimés différemment en fonction des individus. Or, dans le cas de la spectrométrie de masse MALDI-TOF, les

spectres d'un même individu peuvent présenter des variations importantes, rendant plus difficile la détermination de marqueurs spécifiques d'une même population. De plus, les gammes de masse mesurées conditionnent également les marqueurs utilisés, par exemple, les marqueurs de virulence ou de résistance de haut poids moléculaire ($m/z > 20\text{kDa}$) ne sont pas détectés. C'est pourquoi il est nécessaire de standardiser les protocoles de culture et d'acquisition des spectres pour s'assurer que les marqueurs utilisés pour différencier les isolats seront exprimés de la manière la plus homogène possible. Il est également nécessaire d'inclure un nombre important d'isolats lors des analyses pour assurer la robustesse et la validité des marqueurs choisis (Spinali et al., 2015). Toutes ces conditions ont été remplies dans le cadre de notre étude, renforçant la fiabilité des résultats obtenus, mais pour aller plus loin, il serait intéressant de pouvoir déterminer à quelles molécules correspondent les pics ou intervalles de masses utilisés comme marqueurs pour différencier les trois populations mais également d'évaluer si au-delà des populations, l'analyse des spectres permet aussi de séparer les différents haplotypes identifiés génétiquement.

Et de manière plus générale, de déterminer également les marqueurs utilisés pour différencier les espèces fongiques lors de leur identification par spectrométrie de masse. En effet, la technique repose sur l'utilisation d'une « signature » ou « empreinte » spectrale globale qui est assez spécifique pour permettre l'identification, mais on ne sait pas exactement quels biomarqueurs protéiques constituent cette signature. Il est aujourd'hui admis que les marqueurs protéiques utilisés en MALDI-TOF pour l'identification de micro-organismes sont des protéines hautement conservées et abondantes avec des masses comprises entre 4 et 15 kDa, et sur la base d'études menées sur quelques taxons bactériens, il s'agirait majoritairement de protéines ribosomales. Afin de d'identifier précisément les molécules présentes au sein des spectres, une approche par spectrométrie de masse MALDI-TOF en tandem pourrait être utilisée (Fagerquist, 2017). Pour conclure, de nombreux auteurs ont souligné que les deux problématiques majeures de l'identification par spectrométrie de masse sont la nécessité de protocoles standardisés, tant pour la culture des moisissures que pour l'étape d'extraction précédant l'acquisition des spectres et surtout la disponibilité de bases de données les plus exhaustives possibles en terme d'espèces référencées. A travers le travail effectué lors de cette thèse, nous avons essayé de répondre à ces problématiques via le développement d'une base de données spectrales référençant plus de 130 espèces de champignons filamenteux d'intérêt alimentaire, en utilisant plusieurs milieux et temps de culture ainsi qu'un protocole d'extraction protéique standardisé et facile à exécuter. De plus, nos études ont permis de démontrer la fiabilité de la spectrométrie de masse MALDI-TOF

appliquée à l'identification des champignons filamenteux d'altération, mais également pour la discrimination de complexes d'espèces et le regroupement d'isolats au sein d'une même espèce, ouvrant de nouvelles perspectives pour l'utilisation de cette technique en contexte agro-alimentaire. De manière plus générale, la spectrométrie de masse MALDI-TOF est potentiellement capable d'identifier n'importe quel composé ionisable et pourrait donc à terme, être utilisée pour d'autres applications comme la détection d'antibiorésistance via l'identification de protéines spécifiques ou de produits de dégradation des antibiotiques (Florio et al. 2018), ou encore la détection de mycotoxines dans les produits alimentaires (Sivagnanam et al. 2017).

Dans le cadre de la maîtrise du développement de la flore d'altération fongique, plusieurs moyens de contrôle peuvent être utilisés par les industriels, parmi lesquels l'utilisation de conservateurs. Cependant, leur utilisation prolongée, notamment à des concentrations sub-inhibitrices pourrait conduire au développement de résistances à ces conservateurs par les champignons filamenteux d'altération. C'est pourquoi il est important d'évaluer la réponse des contaminants fongiques aux conservateurs, afin de détecter d'éventuelles résistances, et surtout afin de déterminer les concentrations adaptées à utiliser pour maîtriser leur développement. Pour évaluer l'impact des conservateurs, plusieurs méthodes de suivi de la croissance fongique existent, la plus utilisée étant la mesure de la croissance radiale en milieu solide. Mais cette technique peut s'avérer fastidieuse dans le cas où beaucoup de conditions différentes doivent être évaluées, et également longue car le suivi s'effectue généralement sur plusieurs jours voire des semaines. Dans ce contexte, la troisième partie du travail de thèse a été consacrée à l'évaluation de l'utilisation de la néphélométrie laser comme alternative aux méthodes actuelles pour suivre la croissance fongique de manière rapide et haut-débit. Cette étude a permis de suivre la croissance fongique de plusieurs espèces d'altération en présence de trois conservateurs, le benzoate de sodium, le sorbate de potassium et la natamycine, et également d'estimer les paramètres de croissance associés afin d'évaluer l'impact de ces conservateurs sur la vitesse de croissance maximale et la phase de latence. Ces résultats ont permis d'obtenir des concentrations minimales inhibitrices (CMI) apparentes et d'évaluer l'utilisation d'un modèle linéaire pour estimer les CMI à partir des paramètres de croissance obtenus.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude préliminaire ont permis de faire émerger plusieurs problématiques concernant l'utilisation de la néphélométrie laser comme technique de suivi de la croissance fongique et son application à la détermination de CMI. La néphélométrie laser s'est avérée efficace comme technique de suivi de la croissance fongique

avec l'obtention de cinétiques de croissance répétables et adaptées pour estimer les paramètres de croissance en l'absence de conservateur. Cependant, les résultats obtenus ont permis de souligner l'importance du temps de suivi pour la réalisation des cinétiques de croissance en présence de conservateurs. En effet, l'ajout de conservateurs à des concentrations sub-inhibitrices peut conduire à une augmentation importante du temps de latence, au-delà du temps de mesure, provoquant une sous-estimation de la concentration minimale inhibitrice. Le choix des concentrations testées est également un élément important car plusieurs points sont nécessaires pour obtenir un bon ajustement du modèle secondaire. En outre, la modélisation secondaire appliquée pour estimer les valeurs de CMI lors de cette étude a mis en évidence que le modèle linéaire choisi n'était pas parfaitement adapté pour représenter les données. Cela souligne l'importance du choix du modèle en mycologie prévisionnelle, il sera nécessaire de tester un autre modèle permettant un meilleur ajustement des données, comme par exemple celui développé par Judet et al. (2011) dans le cadre de la modélisation de l'effet du sulfate de cuivre sur la croissance radiale de *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea*. La réalisation de cette étude a également mis en lumière la nécessité de développer des protocoles standardisés pour étudier le comportement des champignons filamenteux en présence de conservateurs. En effet, afin de pouvoir comparer les résultats entre différentes études, il est préférable que les données aient été acquises dans des conditions similaires. Mais dans la littérature, les protocoles utilisés peuvent fortement varier d'une étude à l'autre en terme de milieu de culture (liquide ou solide, composition, pH), de concentration de l'inoculum, de temps de suivi de la croissance, de température d'incubation et également de technique utilisée pour mesurer la croissance fongique (estimation visuelle, calcul du pourcentage de germination, mesure de la croissance radiale). Or, tous ces paramètres sont connus pour avoir non seulement un impact sur la croissance des organismes fongiques mais également sur certains conservateurs, comme les acides organiques faibles dont l'efficacité dépend du pH.

Le choix d'étudier plusieurs souches pour chacune des espèces sélectionnées a permis de révéler chez certaines espèces une tolérance différente face aux conservateurs testés en fonction des souches et une différence de réponse aux conservateurs a également été observée en fonction des espèces. Pour essayer de comprendre et expliquer ces différences, il serait intéressant de déterminer les mécanismes d'action de ces conservateurs. La théorie des acides faibles développée en 1997 par Stratford et Anslow a longtemps été utilisée pour expliquer leur mode d'action, la diffusion de la forme non dissociée à l'intérieur du cytosol où le pH proche de la neutralité va provoquer la dissociation en anions et protons qui par leur

accumulation vont abaisser le pH et inhiber le métabolisme intracellulaire. Cette théorie a été validée pour certains acides organiques tels que l'acide acétique ou l'acide benzoïque mais au vu de la diversité des organismes fongiques et des acides organiques, il est probable que cette théorie ne puisse pas être validée pour tous les acides faibles. Par exemple, Stratford et al. (2009) ont démontré que les acides sorbique et acétique n'avaient pas le même effet sur les conidies de plusieurs espèces fongiques. L'acide acétique provoquait une chute du pH intracellulaire, ce qui correspond à la théorie des acides faibles, alors que l'acide sorbique ne provoquait pas de modification majeure du pH intracellulaire. Les auteurs ont ainsi suggéré que l'acide sorbique avait probablement une action sur les lipides membranaires ce qui a été confirmé par une autre étude (Sergeeva et al., 2009) au cours de laquelle des modifications dans la composition lipidique de la membrane chez *Penicillium roqueforti* en présence de sorbate de potassium ont été observées. Enfin, Stratford et al. (2013) ont établi que l'acide sorbique inhibait une pompe membranaire H⁺-ATPase dépendante chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, confirmant également un mode d'action de cet acide faible sur la membrane fongique.

La natamycine est un antibiotique de la famille des macrolides au même titre que la nystatine, et le mode d'action de cette dernière consiste en une interaction hydrophobique avec les stérols membranaires pour former des demi-pores, la combinaison de ces demi-pores conduisant à la perméabilisation de la paroi fongique. La nystatine et la natamycine ayant des structures proches, leurs modes d'action ont été considérés comme similaires pendant longtemps. Mais une étude de 2008 (Te Welscher et al. 2008) a démontré que la natamycine se liait effectivement à l'ergostérol mais qu'elle ne provoquait pas de perméabilisation de la membrane plasmique chez les levures. (Leeuwen et al. 2009) ont obtenu les mêmes résultats sur des conidies de *Penicillium discolor* et sont allés plus loin en démontrant que la natamycine inhibait également l'endocytose.

Les études citées ci-dessus ont permis d'obtenir des informations sur le mode d'action des conservateurs étudiés mais ces informations sont souvent parcellaires, et ne concernent qu'une fonction phénotypique ou physiologique. Aujourd'hui, le développement des techniques « omiques » permet de déterminer les fonctions métaboliques ciblées par les conservateurs. Parmi ces méthodes, l'analyse transcriptomique permet d'étudier l'ensemble des ARNm ou transcrits présents dans une population de cellules dans des conditions données, donnant ainsi accès au niveau d'expression de milliers de gènes. Cependant, l'analyse des données requiert une expertise importante ainsi que de disposer du génome annoté de l'organisme fongique étudié.

L'étude du transcriptome de conidies d'*Aspergillus niger* en présence de différentes concentrations de natamycine Leeuwen et al. (2013) a permis de mettre en évidence que plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse de l'ergostérol étaient sous-exprimés tandis que des gènes associés à une résistance au stress étaient activés lors de l'exposition à une forte concentration de natamycine. L'analyse transcriptomique permet de générer une grande quantité de données dont l'analyse pourrait conduire à l'obtention d'informations précieuses sur les voies métaboliques impactées par les conservateurs, permettant de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces derniers.

Références bibliographiques

- Aguilar-González, Ana Elena, Enrique Palou, et Aurelio López-Malo. 2015. « Antifungal activity of essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and/or mustard (*Brassica nigra*) in vapor phase against gray mold (*Botrytis cinerea*) in strawberries ». *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 32 (décembre): 181-85. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.09.003>.
- Alanio, A., J. - L. Beretti, B. Dauphin, E. Mellado, G. Quesne, C. Lacroix, A. Amara, P. Berche, X. Nassif, et M. - E. Bournoux. 2011. « Matrix- assisted laser desorption ionization time- of- flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species ». *Clinical Microbiology and Infection* 17 (5): 750-55. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03323.x>.
- Alcano, María de J., Raquel C. Jahn, Cátia D. Scherer, Évelin F. Wigmann, Vivian M. Moraes, Marcelo V. Garcia, Carlos A. Mallmann, et Marina V. Copetti. 2016. « Susceptibility of *Aspergillus* spp. to acetic and sorbic acids based on pH and effect of sub-inhibitory doses of sorbic acid on ochratoxin A production ». *Food Research International* 81 (mars): 25-30. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.020>.
- Al-Hatmi, Abdullah MS, Anne-Cécile Normand, Anne D van Diepeningen, Marijke Hendrickx, G Sybren de Hoog, et Renaud Piarroux. 2015. « Rapid identification of clinical members of *Fusarium fujikuroi* complex using MALDI-TOF MS ». *Future Microbiology* 10 (12): 1939-52. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.108>.
- Allen, C., Ph Prior, et A. C. Hayward, éd. 2005. *Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex*. St. Paul, Minn: American Phytopathological Society.
- Aly, Amal H., Abdessamad Debbab, et Peter Proksch. 2011. « Fifty Years of Drug Discovery from Fungi ». *Fungal Diversity* 50 (1): 3. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0116-y>.
- Anhalt, John P., et Catherine. Fenselau. 1975. « Identification of bacteria using mass spectrometry ». *Analytical Chemistry* 47 (2): 219-25. <https://doi.org/10.1021/ac60352a007>.
- Antonissen, Gunther, An Martel, Frank Pasmans, Richard Ducatelle, Elin Verbrugghe, Virginie Vandebroucke, Shaoji Li, Freddy Haesebrouck, Filip Van Immerseel, et Siska Croubels. 2014. « The Impact of *Fusarium* Mycotoxins on Human and Animal Host Susceptibility to Infectious Diseases ». *Toxins* 6 (2): 430-52. <https://doi.org/10.3390/toxins6020430>.
- Atalay, Altay, Ayse Nedret Koc, Ahmet Suel, Hafize Sav, Gonca Demir, Ferhan Elmali, Nuri Cakir, et Seyedmajtaba Seyedmousavi. 2016. « Conventional Morphology Versus PCR Sequencing, Rep-PCR, and MALDI-TOF-MS for Identification of Clinical *Aspergillus* Isolates Collected Over a 2-Year Period in a University Hospital at Kayseri, Turkey ». *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 30 (5): 745-50. <https://doi.org/10.1002/jcla.21932>.
- Baar, Ben L. M. van. 2000. « Characterisation of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray mass spectrometry ». *FEMS Microbiology Reviews* 24 (2): 193-219. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(99\)00036-4](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(99)00036-4).
- Bader, Oliver. 2013. « MALDI-TOF-MS-Based Species Identification and Typing Approaches in Medical Mycology ». *PROTEOMICS* 13 (5): 788-99. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200468>.
- Balasundaram, Sudhagar V., Ingeborg B. Engh, Inger Skrede, et Håvard Kausrud. 2015. « How many DNA markers are needed to reveal cryptic fungal species? » *Fungal Biology* 119 (10): 940-45. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.07.006>.
- Baldauf, S. L., et J. D. Palmer. 1993. « Animals and Fungi Are Each Other's Closest Relatives: Congruent Evidence from Multiple Proteins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (24): 11558-62.

- Baldauf, Sandra L. 2008. « An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes ». *Journal of Systematics and Evolution* 46 (3): 263-73. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1002.2008.08060>.
- Baquião, Arianne Costa, Maitê Martins Melo de Oliveira, Tatiana Alves Reis, Patricia Zorzete, Danielle Diniz Atayde, et Benedito Correa. 2013. « Polyphasic Approach to the Identification of *Aspergillus* Section *Flavi* Isolated from Brazil Nuts ». *Food Chemistry* 139 (1-4): 1127-32. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.007>.
- Basile, Franco, Michael B Beverly, Kent J Voorhees, et Ted L Hadfield. 1998. « Pathogenic bacteria: their detection and differentiation by rapid lipid profiling with pyrolysis mass spectrometry ». *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 17 (2): 95-109. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(97\)00103-9](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(97)00103-9).
- Batt, Carl A. 2016. « Microbial Food Spoilage ». In *Reference Module in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.03440-5>.
- Becker, Pierre T., Dirk Stubbe, Jessie Claessens, Sam Roesems, Yves Bastin, Chantal Planard, Carole Cassagne, Renaud Piarroux, et Marijke Hendrickx. 2015. « Quality control in culture collections: Confirming identity of filamentous fungi by MALDI-TOF MS ». *Mycoscience* 56 (3): 273-79. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2014.08.002>.
- Belén Flórez, Ana, Pablo Álvarez-Martín, Teresa María López-Díaz, et Baltasar Mayo. 2007. « Morphotypic and molecular identification of filamentous fungi from Spanish blue-veined Cabrales cheese, and typing of *Penicillium roqueforti* and *Geotrichum candidum* isolates ». *International Dairy Journal* 17 (4): 350-57. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.04.002>.
- Bennett, J. W. 1998. « Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology1Based on a lecture held at the symposium, 'Progress in US Biotechnology', at the 8th European Congress on Biotechnology (ECB8) in Budapest, Hungary, August 1997.1 ». *Journal of Biotechnology* 66 (2): 101-7. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(98\)00133-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(98)00133-3).
- Bensch, K., U. Braun, J. Z. Groenewald, et P. W. Crous. 2012. « The genus *Cladosporium* ». *Studies in Mycology*, The genus *Cladosporium*, 72 (juin): 1-401. <https://doi.org/10.3114/sim0003>.
- Bhat, Rajeev, Ravishankar V. Rai, et A. A. Karim. 2010. « Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns ». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9 (1): 57-81. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00094.x>.
- Blackburn, C. de W. 2006. « 6 - Managing microbial food spoilage: an overview ». In *Food Spoilage Microorganisms*, édité par Clive de W. Blackburn, 147-70. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845691417.2.147>.
- Boa, E. R. 2004. *Wild edible fungi: a global overview of their use and importance to people*. Non-wood forest products 17. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Brul, S., et P. Coote. 1999. « Preservative Agents in Foods. Mode of Action and Microbial Resistance Mechanisms ». *International Journal of Food Microbiology* 50 (1-2): 1-17.
- Bryden, Wayne L. 2012. « Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security ». *Animal Feed Science and Technology*, Special Issue: Nutrition and Pathology of Non-Ruminants, 173 (1): 134-58. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.014>.
- Bumbrah, Gurbinder Singh, et Rakesh Mohan Sharma. 2016. « Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs

- of abuse ». *Egyptian Journal of Forensic Sciences* 6 (3): 209-15. <https://doi.org/10.1016/j.ejfs.2015.06.001>.
- Cain, Teresa C., David M. Lubman, Walter J. Weber, et A. Vertes. 1994. « Differentiation of Bacteria Using Protein Profiles from Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry ». *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 8 (12): 1026-30. <https://doi.org/10.1002/rcm.1290081224>.
- Campbell, Colin K., et Elizabeth M. Johnson. 2013. *Identification of Pathogenic Fungi*. John Wiley & Sons.
- Cantrell, Sharon A., Lilliam Casillas-Martínez, et Marirosa Molina. 2006. « Characterization of Fungi from Hypersaline Environments of Solar Salterns Using Morphological and Molecular Techniques ». *Mycological Research* 110 (Pt 8): 962-70. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.06.005>.
- Carvajal-Campos, Amaranta, Ama Lethicia Manizan, Souria Tadríst, David Koffi Akaki, Rose Koffi-Nevry, Geromy G. Moore, Stephen O. Fapohunda, et al. 2017. « *Aspergillus Korhogoensis*, a Novel Aflatoxin Producing Species from the Côte d'Ivoire ». *Toxins* 9 (11). <https://doi.org/10.3390/toxins9110353>.
- Cassagne, Carole, Stéphane Ranque, Anne-Cécile Normand, Patrick Fourquet, Sandrine Thiebault, Chantal Planard, Marijke Hendrickx, et Renaud Piarroux. 2011. « Mould Routine Identification in the Clinical Laboratory by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry ». *PLoS ONE* 6 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028425>.
- Chaix, Estelle, Olivier Couvert, Carole Guillaume, Nathalie Gontard, et Valerie Guillard. 2015. « Predictive Microbiology Coupled with Gas (O₂/CO₂) Transfer in Food/Packaging Systems: How to Develop an Efficient Decision Support Tool for Food Packaging Dimensioning ». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14 (1): 1-21. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12117>.
- Chalupová, Jana, Martin Raus, Michaela Sedlářová, et Marek Šebela. 2014. « Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry ». *Biotechnology Advances*, Plant Biotechnology 2013: « Green for Good II », 32 (1): 230-41. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.002>.
- Chandra, Jyotsna, Duncan M. Kuhn, Pranab K. Mukherjee, Lois L. Hoyer, Thomas McCormick, et Mahmoud A. Ghannoum. 2001. « Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida Albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance ». *Journal of Bacteriology* 183 (18): 5385-94. <https://doi.org/10.1128/JB.183.18.5385-5394.2001>.
- Chang, Perng-Kuang, Kenneth C. Ehrlich, et Sui-Sheng T. Hua. 2006. « Cladal Relatedness among *Aspergillus Oryzae* Isolates and *Aspergillus Flavus* S and L Morphotype Isolates ». *International Journal of Food Microbiology* 108 (2): 172-77. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.008>.
- Chang, Susane, Mariele Porto Carneiro-Leão, Benny Ferreira de Oliveira, Cristina Souza-Motta, Nelson Lima, Cledir Santos, et Neiva Tinti de Oliveira. 2016. « Polyphasic Approach Including MALDI-TOF MS/MS Analysis for Identification and Characterisation of *Fusarium verticillioides* in Brazilian Corn Kernels ». *Toxins* 8 (3). <https://doi.org/10.3390/toxins8030054>.
- Chen, A. J., V. Hubka, J. C. Frisvad, C. M. Visagie, J. Houbraeken, M. Meijer, J. Varga, et al. 2017. « Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Aspergillus* (formerly *Eurotium*), and its occurrence in indoor environments and food ». *Studies in Mycology* 88 (Supplement C): 37-135. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.07.001>.

- Chen, Hun-Yun, et Yu-Chie Chen. 2005. « Characterization of Intact Penicillium Spores by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry ». *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19 (23): 3564-68. <https://doi.org/10.1002/rcm.2229>.
- Chowdappa, P., M. Jyothi Lakshmi, et S. Madhura. 2013. « Matrix Assisted Laser Desorption Ionization–time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry for Identification of Plant Pathogenic Alternaria Species ». *Phytoparasitica* 41 (2): 169-79. <https://doi.org/10.1007/s12600-012-0276-7>.
- « Commission Recommendation of 17 August 2006 on the Presence of Deoxynivalenol, Zearalenone, Ochratoxin A, T-2 and HT-2 and Fumonisin in Products Intended for Animal Feeding (Text with EEA Relevance) ». 2006. 32006H0576. <http://data.europa.eu/eli/reco/2006/576/oj/eng>.
- Crous, Pedro W. 2009. *Fungal Biodiversity*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.
- Croxatto, Antony, Guy Prod'hom, et Gilbert Greub. 2012. « Applications of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Diagnostic Microbiology ». *FEMS Microbiology Reviews* 36 (2): 380-407. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>.
- Cruz Cabral, Lucía da, Virginia Fernández Pinto, et Andrea Patriarca. 2013. « Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods ». *International Journal of Food Microbiology* 166 (1): 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.026>.
- Dagnas, Stéphane, et Jeanne-Marie Membré. 2013. « Predicting and Preventing Mold Spoilage of Food Products ». *Journal of Food Protection* 76 (3): 538-51. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-349>.
- Dantigny, Philippe, Audrey Guilmart, et Maurice Bensoussan. 2005. « Basis of Predictive Mycology ». *International Journal of Food Microbiology* 100 (1-3): 187-96. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.013>.
- De Carolis, E., B. Posteraro, C. Lass-Flörl, A. Vella, A. R. Florio, R. Torelli, C. Girmenia, et al. 2012. « Species identification of Aspergillus, Fusarium and Mucorales with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry ». *Clinical Microbiology and Infection* 18 (5): 475-84. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03599.x>.
- De Carolis, Elena, Antonietta Vella, Ada R. Florio, Patrizia Posteraro, David S. Perlin, Maurizio Sanguinetti, et Brunella Posteraro. 2012. « Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Caspofungin Susceptibility Testing of Candida and Aspergillus Species ». *Journal of Clinical Microbiology* 50 (7): 2479-83. <https://doi.org/10.1128/JCM.00224-12>.
- De Gussem, Kris, Peter Vandenabeele, Annemieke Verbeke, et Luc Moens. 2007. « Chemotaxonomical Identification of Spores of Macrofungi: Possibilities of Raman Spectroscopy ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387 (8): 2823-32. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1150-1>.
- De Reynal, Béatrice. 2009. *Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires: à l'exclusion des produits utilisés au niveau de l'agriculture et de l'élevage : pesticides, hormones , etc....*
- Deak, Eszter, Carmen L. Charlton, April M. Bobenchik, Shelley A. Miller, Simon Pollett, Ian H. McHardy, Max T. Wu, et Omai B. Garner. 2015. « Comparison of the Vitek MS and Bruker Microflex LT MALDI-TOF MS platforms for routine identification of commonly isolated bacteria and yeast in the clinical microbiology laboratory ». *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 81 (1): 27-33. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.018>.

- Del Chierico, Federica, Andrea Masotti, Manuela Onori, Ersilia Fiscarelli, Livia Mancinelli, Gabriella Ricciotti, Federico Alghisi, et al. 2012. « MALDI-TOF MS proteomic phenotyping of filamentous and other fungi from clinical origin ». *Journal of Proteomics* 75 (11): 3314-30. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.048>.
- Delves-Broughton, J. 2008. « 16 - Use of the natural food preservatives, nisin and natamycin, to reduce detrimental thermal impact on product quality ». In *In-Pack Processed Foods*, édité par Philip Richardson, 319-37. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845694692.4.319>.
- Denning, David W., et William W. Hope. 2010. « Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities ». *Trends in Microbiology* 18 (5): 195-204. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.02.004>.
- Dijksterhuis, Jan, Jos Houbraeken, et Robert A. Samson. 2013. « 2 Fungal Spoilage of Crops and Food ». In *Agricultural Applications*, édité par Frank Kempken, 35-56. The Mycota. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-36821-9_2.
- Dulla, E. L., C. Kathera, H. K. Gurijala, T. R. Mallakuntla, P. Srinivasan, V. Prasad, R. D. Mopati, et P. K. Jasti. 2016. « Highlights of DNA Barcoding in identification of salient microorganisms like fungi ». *Journal de Mycologie Médicale* 26 (4): 291-97. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.05.006>.
- Emonet, S., H. N. Shah, A. Cherkaoui, et J. Schrenzel. 2010. « Application and Use of Various Mass Spectrometry Methods in Clinical Microbiology ». *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 16 (11): 1604-13. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03368.x>.
- Erhard, Marcel, Uta-Christina Hipler, Anke Burmester, Axel A. Brakhage, et Johannes Wöstemeyer. 2008. « Identification of Dermatophyte Species Causing Onychomycosis and Tinea Pedis by MALDI-TOF Mass Spectrometry ». *Experimental Dermatology* 17 (4): 356-61. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2007.00649.x>.
- Fagerquist, Clifton K. 2017. « Unlocking the proteomic information encoded in MALDI-TOF-MS data used for microbial identification and characterization ». *Expert Review of Proteomics* 14 (1): 97-107. <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1260451>.
- Fazio, Alejandra T., Mónica Mamián López, Marcia L. A. Temperini, et Dalva Lúcia A. de Faria. 2018. « Surface enhanced Raman spectroscopy and cultural heritage biodeterioration: Fungi identification in earthen architecture from Paraíba Valley (São Paulo, Brazil) ». *Vibrational Spectroscopy* 97 (juillet): 129-34. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2018.06.002>.
- Fenselau, C., et P. A. Demirev. 2001. « Characterization of Intact Microorganisms by MALDI Mass Spectrometry ». *Mass Spectrometry Reviews* 20 (4): 157-71. <https://doi.org/10.1002/mas.10004>.
- Filtenborg, O., J. C. Frisvad, et U. Thrane. 1996. « Moulds in food spoilage ». *International Journal of Food Microbiology, Specific Spoilage Organisms*, 33 (1): 85-102. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01153-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01153-1).
- Fischer, Guido, Silvia Braun, Ralf Thissen, et Wolfgang Dott. 2006. « FT-IR Spectroscopy as a Tool for Rapid Identification and Intra-Species Characterization of Airborne Filamentous Fungi ». *Journal of Microbiological Methods* 64 (1): 63-77. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.04.005>.

- Florio, Walter, Arianna Tavanti, Emilia Ghelardi, et Antonella Lupetti. 2018. « MALDI-TOF MS Applications to the Detection of Antifungal Resistance: State of the Art and Future Perspectives ». *Frontiers in Microbiology* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02577>.
- Fontaine, Kévin, Nolwenn Hymery, Marlène Z. Lacroix, Sylvie Puel, Olivier Puel, Karim Rigalma, Vincent Gaydou, Emmanuel Coton, et Jérôme Mounier. 2015. « Influence of intraspecific variability and abiotic factors on mycotoxin production in *Penicillium roqueforti* ». *International Journal of Food Microbiology* 215 (décembre): 187-93. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.021>.
- Fournier, Rémi, Frédéric Wallet, Bruno Grandbastien, Luc Dubreuil, René Courcol, Christel Neut, et Rodrigue Dessein. 2012. « Chemical extraction versus direct smear for MALDI-TOF mass spectrometry identification of anaerobic bacteria ». *Anaerobe* 18 (3): 294-97. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.03.008>.
- Freimoser, Florian Matthias, Maja Hilber-Bodmer, René Brunisholz, et David Drissner. 2016. « Direct Identification of *Monilinia* Brown Rot Fungi on Infected Fruits by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) Mass Spectrometry ». *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 3 (1): 7. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0058-4>.
- Frisvad, J. C., V. Hubka, C. N. Ezekiel, S. -B. Hong, A. Nováková, A. J. Chen, M. Arzanlou, et al. 2019. « Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins ». *Studies in Mycology* 93 (juin): 1-63. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.06.001>.
- Fujinami, Yoshihito, Hitomi S. Kikkawa, Yohei Kurosaki, Koichi Sakurada, Mineo Yoshino, et Jiro Yasuda. 2011. « Rapid Discrimination of *Legionella* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry ». *Microbiological Research* 166 (2): 77-86. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.02.005>.
- Garcia, Daiana, Antonio J. Ramos, Vicente Sanchis, et Sonia Marín. 2011. « Intraspecific Variability of Growth and Patulin Production of 79 *Penicillium Expansum* Isolates at Two Temperatures ». *International Journal of Food Microbiology* 151 (2): 195-200. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.021>.
- Garnier, Lucille, Florence Valence, et Jérôme Mounier. 2017. « Diversity and Control of Spoilage Fungi in Dairy Products: An Update ». *Microorganisms* 5 (3): 42. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030042>.
- Garnier, Lucille, Florence Valence, Audrey Pawtowski, Lizaveta Auhustsinava-Galerie, Nicolas Frotté, Riccardo Baroncelli, Franck Deniel, Emmanuel Coton, et Jérôme Mounier. 2017. « Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products ». *International Journal of Food Microbiology* 241 (Supplement C): 191-97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.026>.
- Gautier, M., A. -C. Normand, et S. Ranque. 2016. « Previously unknown species of *Aspergillus* ». *Clinical Microbiology and Infection* 22 (8): 662-69. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.05.013>.
- Gautier, M., S. Ranque, A. -C. Normand, P. Becker, A. Packeu, C. Cassagne, C. L'Ollivier, M. Hendrickx, et R. Piarroux. 2014. « Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: revolutionizing clinical laboratory diagnosis of mould infections ». *Clinical Microbiology and Infection* 20 (12): 1366-71. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12750>.
- Geiser, D. M., M. A. Klich, J. C. Frisvad, S. W. Peterson, J. Varga, et R. A. Samson. 2007. « The current status of species recognition and identification in *Aspergillus* ». *Studies*

- in Mycology*, Aspergillus systematics in the genomic era, 59: 1-10. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.01>.
- Geiser, David M., María del Mar Jiménez-Gasco, Seogchan Kang, Izabela Makalowska, Narayanan Veeraraghavan, Todd J. Ward, Ning Zhang, Gretchen A. Kuldau, et Kerry O'donnell. 2004. « FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA Sequence Database for Identifying Fusarium ». *European Journal of Plant Pathology* 110 (5-6): 473-79. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000032386.75915.a0>.
- Ghosal, Sutapa, Janet M. Macher, et Kadra Ahmed. 2012. « Raman Microspectroscopy-Based Identification of Individual Fungal Spores as Potential Indicators of Indoor Contamination and Moisture-Related Building Damage ». *Environmental Science & Technology* 46 (11): 6088-95. <https://doi.org/10.1021/es203782j>.
- Gibbons, John G., Leonidas Salichos, Jason C. Slot, David C. Rinker, Kriston L. McGary, Jonas G. King, Maren A. Klich, David L. Tabb, W. Hayes McDonald, et Antonis Rokas. 2012. « The Evolutionary Imprint of Domestication on Genome Variation and Function of the Filamentous Fungus *Aspergillus Oryzae* ». *Current Biology: CB* 22 (15): 1403-9. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.033>.
- Gillot, Guillaume, Jean-Luc Jany, Monika Coton, Gaétan Le Floch, Stella Debaets, Jeanne Ropars, Manuela López-Villavicencio, et al. 2015. « Insights into *Penicillium roqueforti* Morphological and Genetic Diversity ». *PLOS ONE* 10 (6): e0129849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129849>.
- Girard, Victoria, Sandrine Mailler, Martin Welker, Maud Arzac, Béatrice Cellière, Pierre-Jean Cotte-Pattat, Sonia Chatellier, et al. 2016. « Identification of mycobacterium spp. and nocardia spp. from solid and liquid cultures by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) ». *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 86 (3): 277-83. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.07.027>.
- Guynot, M. E., A. J. Ramos, V. Sanchis, et S. Marín. 2005. « Study of benzoate, propionate, and sorbate salts as mould spoilage inhibitors on intermediate moisture bakery products of low pH (4.5–5.5) ». *International Journal of Food Microbiology* 101 (2): 161-68. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.003>.
- Hafiane, A., et M. Ravaoarino. 2008. « Différentes méthodes de typage des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées des patients atteints de mucoviscidose ». *Médecine et Maladies Infectieuses* 38 (5): 238-47. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2008.02.005>.
- Hahn, F. 2002. « AE—Automation and Emerging Technologies: Fungal Spore Detection on Tomatoes using Spectral Fourier Signatures ». *Biosystems Engineering* 81 (3): 249-59. <https://doi.org/10.1006/bioe.2001.0036>.
- Hawksworth, David L. 2006. « Pandora's Mycological Box: Molecular Sequences vs. Morphology in Understanding Fungal Relationships and Biodiversity ». *Revista Iberoamericana De Micologia* 23 (3): 127-33.
- Hawksworth, David L. 2015. « Naming fungi involved in spoilage of food, drink, and water ». *Current Opinion in Food Science, Food Engineering and Processing • Food Mycology*, 5 (octobre): 23-28. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.07.004>.
- Hawksworth, David L., et Robert Lücking. 2017. « Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species ». *Microbiology Spectrum* 5 (4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016>.
- Hermet, Antoine, Delphine Méheust, Jérôme Mounier, Georges Barbier, et Jean-Luc Jany. 2012. « Molecular systematics in the genus *Mucor* with special regards to species

- encountered in cheese ». *Fungal Biology* 116 (6): 692-705. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.04.002>.
- Hettick, Justin M., Brett J. Green, Amanda D. Buskirk, Michael L. Kashon, James E. Slaven, Erika Janotka, Francoise M. Blachere, Detlef Schmechel, et Donald H. Beezhold. 2008a. « Discrimination of Penicillium Isolates by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Fingerprinting ». *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM* 22 (16): 2555-60. <https://doi.org/10.1002/rcm.3649>.
- . 2008b. « Discrimination of Aspergillus Isolates at the Species and Strain Level by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Fingerprinting ». *Analytical Biochemistry* 380 (2): 276-81. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.05.051>.
- Hewitt, Sarah K., David S. Foster, Paul S. Dyer, et Simon V. Avery. 2016. « Phenotypic heterogeneity in fungi: Importance and methodology ». *Fungal Biology Reviews* 30 (4): 176-84. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.09.002>.
- Hocking, A. D. 2014. « SPOILAGE PROBLEMS | Problems Caused by Fungi ». In *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, édité par Carl A. Batt et Mary Lou Tortorello, 471-81. Oxford: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00315-3>.
- Holland, R. D., J. G. Wilkes, F. Rafii, J. B. Sutherland, C. C. Persons, K. J. Voorhees, et J. O. Lay. 1996. « Rapid Identification of Intact Whole Bacteria Based on Spectral Patterns Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization with Time-of-Flight Mass Spectrometry ». *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM* 10 (10): 1227-32. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19960731\)10:10<1227::AID-RCM659>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19960731)10:10<1227::AID-RCM659>3.0.CO;2-6).
- Houbraken, J., M. Due, J. Varga, M. Meijer, J. C. Frisvad, et R. A. Samson. 2007. « Polyphasic taxonomy of Aspergillus section Usti ». *Studies in Mycology, Aspergillus systematics in the genomic era*, 59: 107-28. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.12>.
- Houbraken, Jos, Jens C. Frisvad, et Robert A. Samson. 2011. « Fleming's Penicillin Producing Strain Is Not Penicillium Chrysogenum but P. Rubens ». *IMA Fungus* 2 (1): 87-95. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.01.12>.
- Houbraken, Jos, et Robert A Samson. 2017. « Current taxonomy and identification of foodborne fungi ». *Current Opinion in Food Science, Food Engineering and Processing* 2017 • Food Mycology, 17 (Supplement C): 84-88. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.10.010>.
- Hussein, H. S., et J. M. Brasel. 2001. « Toxicity, Metabolism, and Impact of Mycotoxins on Humans and Animals ». *Toxicology* 167 (2): 101-34.
- Hyodo, F., I. Tayasu, T. Inoue, J.-I. Azuma, T. Kudo, et T. Abe. 2003. « Differential Role of Symbiotic Fungi in Lignin Degradation and Food Provision for Fungus-Growing Termites (Macrotermitinae: Isoptera) ». *Functional Ecology* 17 (2): 186-93. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2003.00718.x>.
- Jacobs, K., et A. Botha. 2008. « Mucor renisporus sp. nov., a new coprophilous species from Southern Africa ». *Fungal Diversity* 29: 27-35.
- Joubert, Aymeric, Benoît Calmes, Romain Berruyer, Marc Pihet, Jean-Philippe Bouchara, Philippe Simoneau, et Thomas Guillemette. 2010. « Laser Nephelometry Applied in an Automated Microplate System to Study Filamentous Fungus Growth ». *BioTechniques* 48 (5): 399-404. <https://doi.org/10.2144/000113399>.

- Judet-Correia, D., C. Charpentier, M. Bensoussan, et P. Dantigny. 2011. « Modelling the Inhibitory Effect of Copper Sulfate on the Growth of *Penicillium Expansum* and *Botrytis Cinerea* ». *Letters in Applied Microbiology* 53 (5): 558-64. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03149.x>.
- Kabak, Bulent. 2009. « The Fate of Mycotoxins during Thermal Food Processing ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89 (4): 549-54. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3491>.
- Kallow, W., I. Santos, M. Erhard, R. Serra, A. Venancio, et N. Lima. 2006. « *Aspergillus ibericus* : A new species of section *Nigri* characterised by MALDI-TOF MS ». In , 189-93. Cairns, Australia: MEDIMOND.
- Kern, Carola C., Rudi F. Vogel, et Jürgen Behr. 2014. « Differentiation of *Lactobacillus brevis* strains using Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry with respect to their beer spoilage potential ». *Food Microbiology* 40 (juin): 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.11.015>.
- Khan, Imran, Charles Nkufi Tango, Sumaira Miskeen, Byong H. Lee, et Deog-Hwan Oh. 2017. « Hurdle technology: A novel approach for enhanced food quality and safety – A review ». *Food Control* 73 (mars): 1426-44. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.010>.
- Kosegarten, Carlos E., Nelly Ramírez-Corona, Emma Mani-López, Enrique Palou, et Aurelio López-Malo. 2017. « Description of *Aspergillus flavus* growth under the influence of different factors (water activity, incubation temperature, protein and fat concentration, pH, and cinnamon essential oil concentration) by kinetic, probability of growth, and time-to-detection models ». *International Journal of Food Microbiology*, Special Issue: 9th International Conference on Predictive Modelling in Food (Rio de Janeiro, Brazil), 240 (Supplement C): 115-23. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.024>.
- Koster, Chris G de, et Stanley Brul. 2016. « MALDI-TOF MS identification and tracking of food spoilers and food-borne pathogens ». *Current Opinion in Food Science, Innovation in food science • Foodomics technologies*, 10 (août): 76-84. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.11.004>.
- Krebs, H A, D Wiggins, M Stubbs, A Sols, et F Bedoya. 1983. « Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. » *Biochemical Journal* 214 (3): 657-63.
- Krska, R., M. de Nijs, O. Mc Nerney, M. Pichler, J. Gilbert, S. Edwards, M. Suman, et al. 2016. « Safe food and feed through an integrated toolbox for mycotoxin management: the MyToolBox approach ». *World Mycotoxin Journal* 9 (4): 487-95. <https://doi.org/10.3920/WMJ2016.2136>.
- Kuhns, Martin, Andreas E. Zautner, Wolfgang Rabsch, Ortrud Zimmermann, Michael Weig, Oliver Bader, et Uwe Groß. 2012. « Rapid Discrimination of *Salmonella Enterica* Serovar Typhi from Other Serovars by MALDI-TOF Mass Spectrometry ». *PloS One* 7 (6): e40004. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040004>.
- Lalitha, P., R. Vijaykumar, N. V. Prajna, et A. W. Fothergill. 2008. « In Vitro Natamycin Susceptibility of Ocular Isolates of *Fusarium* and *Aspergillus* Species: Comparison of Commercially Formulated Natamycin Eye Drops to Pharmaceutical-Grade Powder ». *Journal of Clinical Microbiology* 46 (10): 3477-78. <https://doi.org/10.1128/JCM.00610-08>.
- Latgé, Jean-Paul. 2007. « The Cell Wall: A Carbohydrate Armour for the Fungal Cell ». *Molecular Microbiology* 66 (2): 279-90. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05872.x>.

- Lau, Anna F., Steven K. Drake, Leslie B. Calhoun, Christina M. Henderson, et Adrian M. Zelazny. 2013. « Development of a Clinically Comprehensive Database and a Simple Procedure for Identification of Molds from Solid Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry ». *Journal of Clinical Microbiology* 51 (3): 828-34. <https://doi.org/10.1128/JCM.02852-12>.
- Lauterbach, Alexander, Julia C. Usbeck, Jürgen Behr, et Rudi F. Vogel. 2017. « MALDI-TOF MS Typing Enables the Classification of Brewing Yeasts of the Genus *Saccharomyces* to Major Beer Styles ». *PLOS ONE* 12 (8): e0181694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181694>.
- Le Lay, Céline, Jérôme Mounier, Valérie Vasseur, Amélie Weill, Gwenaëlle Le Blay, Georges Barbier, et Emmanuel Coton. 2016. « In vitro and in situ screening of lactic acid bacteria and propionibacteria antifungal activities against bakery product spoilage molds ». *Food Control* 60 (Supplement C): 247-55. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.034>.
- Lecellier, A. 2013. « Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle ». Université de Reims.
- Lecellier, A., V. Gaydou, J. Mounier, A. Hermet, L. Castrec, G. Barbier, W. Ablain, M. Manfait, D. Toubas, et G. D. Sockalingum. 2015. « Implementation of an FTIR spectral library of 486 filamentous fungi strains for rapid identification of molds ». *Food Microbiology*, Spoilers, wonder spores and diehard microorganisms: New insights to integrate these super foes in food spoilage risk management, 45 (Part A): 126-34. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.01.002>.
- Lecellier, A., J. Mounier, V. Gaydou, L. Castrec, G. Barbier, W. Ablain, M. Manfait, D. Toubas, et G. D. Sockalingum. 2014. « Differentiation and identification of filamentous fungi by high-throughput FTIR spectroscopic analysis of mycelia ». *International Journal of Food Microbiology* 168 (Supplement C): 32-41. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.011>.
- Lecomte, Mickaël, Romain Berruyer, Latifa Hamama, Cora Boedo, Piétrick Hudhomme, Stéphanie Bersihand, Joseph Arul, et al. 2012. « Inhibitory effects of the carrot metabolites 6-methoxymellein and faltarindiol on development of the fungal leaf blight pathogen *Alternaria dauci* ». *Physiological and Molecular Plant Pathology* 80 (octobre): 58-67. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2012.10.002>.
- Leeuwen, M. R. Van, T. M. Van Doorn, E. A. Golovina, J. Stark, et J. Dijksterhuis. 2010. « Water- and Air-Distributed *Conidia* Differ in Sterol Content and Cytoplasmic Microviscosity ». *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (1): 366-69. <https://doi.org/10.1128/AEM.01632-09>.
- Leeuwen, M. R. Van, E. A. Golovina, et J. Dijksterhuis. 2009. « The Polyene Antimycotics Nystatin and Filipin Disrupt the Plasma Membrane, Whereas Natamycin Inhibits Endocytosis in Germinating *Conidia* of *Penicillium Discolor* ». *Journal of Applied Microbiology* 106 (6): 1908-18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04165.x>.
- Leeuwen, M. R. van, P. Krijgsheld, T. T. Wyatt, E. A. Golovina, H. Menke, A. Dekker, J. Stark, et al. 2013. « The effect of natamycin on the transcriptome of *conidia* of *Aspergillus niger* ». *Studies in Mycology*, Development of, 74 (mars): 71-85. <https://doi.org/10.3114/sim0013>.
- Leistner, Lothar, et Leon G. M. Gorris. 1995. « Food preservation by hurdle technology ». *Trends in Food Science & Technology* 6 (2): 41-46. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)88941-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)88941-4).
- León Peláez, A. M., C. A. Serna Cataño, E. A. Quintero Yepes, R. R. Gamba Villarroel, G. L. De Antoni, et L. Giannuzzi. 2012. « Inhibitory activity of lactic and acetic acid on

- Aspergillus flavus growth for food preservation ». *Food Control* 24 (1): 177-83. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.024>.
- Levinskaite, Loreta. 2012. « Susceptibility of Food-Contaminating Penicillium Genus Fungi to Some Preservatives and Disinfectants ». *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM* 19 (1): 85-89.
- Lew, Roger R. 2011. « How Does a Hypha Grow? The Biophysics of Pressurized Growth in Fungi ». *Nature Reviews Microbiology* 9 (7): 509-18. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2591>.
- Li, Jichun, Volha Shapaval, Achim Kohler, Robert Talintyre, Jürgen Schmitt, Richard Stone, Andrew J. Gallant, et Dagou A. Zeze. 2016. « A Modular Liquid Sample Handling Robot for High-Throughput Fourier Transform Infrared Spectroscopy ». In *Advances in Reconfigurable Mechanisms and Robots II*, édité par Xilun Ding, Xianwen Kong, et Jian S. Dai, 769-78. Mechanisms and Machine Science. Springer International Publishing.
- Li, Ying, He Wang, Yu-Pei Zhao, Ying-Chun Xu, et Po-Ren Hsueh. 2017. « Evaluation of the Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry System for Identification of Aspergillus Species Directly from Growth on Solid Agar Media ». *Frontiers in Microbiology* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01209>.
- López-Malo, Aurelio, Stella Maris Alzamora, et Enrique Palou. 2005. « Aspergillus flavus growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds ». *International Journal of Food Microbiology* 99 (2): 119-28. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.010>.
- Lücking, Robert, Sabine Huhndorf, Donald H. Pfister, Eimy Rivas Plata, et H. Thorsten Lumbsch. 2009. « Fungi Evolved Right on Track ». *Mycologia* 101 (6): 810-22.
- Ludemann, Vanesa, Graciela Pose, Alfonsina Moavro, Maria G. Maliaviabarrena, Rosario Fandiño, Giselle Ripoll, Juan C. Basílico, et Alejandro G. Pardo. 2009. « Toxicological Assessment of Penicillium Nalgiovense Strains for Use as Starter Cultures in the Manufacture of Dry Fermented Sausages ». *Journal of Food Protection* 72 (8): 1666-70.
- Maquelin, K., C. Kirschner, L.-P. Choo-Smith, N. A. Ngo-Thi, T. van Vreeswijk, M. Stämmler, H. P. Endtz, H. A. Bruining, D. Naumann, et G. J. Puppels. 2003. « Prospective Study of the Performance of Vibrational Spectroscopies for Rapid Identification of Bacterial and Fungal Pathogens Recovered from Blood Cultures ». *Journal of Clinical Microbiology* 41 (1): 324-29. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.324-329.2003>.
- Marchetti-Deschmann, M., W. Winkler, H. Dong, H. Lohninger, C. P. Kubicek, et G. Allmaier. 2012. « Using Spores for Fusarium spp. Classification by MALDI-Based Intact Cell/Spore Mass Spectrometry ». *Food Technology and Biotechnology* 50 (3): 334-42.
- Marín, Sonia, Dolores Cuevas, Antonio J. Ramos, et Vicente Sanchis. 2008. « Fitting of colony diameter and ergosterol as indicators of food borne mould growth to known growth models in solid medium ». *International Journal of Food Microbiology* 121 (2): 139-49. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.030>.
- Marinach-Patrice, C., A. Lethuillier, A. Marly, J.-Y. Brossas, J. Géné, F. Symoens, A. Datry, J. Guarro, D. Mazier, et C. Hennequin. 2009. « Use of Mass Spectrometry to Identify Clinical Fusarium Isolates ». *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 15 (7): 634-42. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02758.x>.

- Masih, Aradhana, Pradeep K. Singh, Shallu Kathuria, Kshitij Agarwal, Jacques F. Meis, et Anuradha Chowdhary. 2016. « Identification by Molecular Methods and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry and Antifungal Susceptibility Profiles of Clinically Significant Rare *Aspergillus* Species in a Referral Chest Hospital in Delhi, India ». *Journal of Clinical Microbiology* 54 (9): 2354-64. <https://doi.org/10.1128/JCM.00962-16>.
- Mathimaran, Natarajan, Laurent Falquet, Kurt Ineichen, Cyril Picard, Dirk Redecker, Thomas Boller, et Andres Wiemken. 2008. « Microsatellites for disentangling underground networks: Strain-specific identification of *Glomus intraradices*, an arbuscular mycorrhizal fungus ». *Fungal Genetics and Biology* 45 (6): 812-17. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.02.009>.
- McLaughlin, David J., David S. Hibbett, François Lutzoni, Joseph W. Spatafora, et Rytas Vilgalys. 2009. « The Search for the Fungal Tree of Life ». *Trends in Microbiology* 17 (11): 488-97. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.08.001>.
- McMullen, Allison R., Meghan A. Wallace, David H. Pincus, Kathy Wilkey, et Carey-Ann D. Burnham. 2016. « Evaluation of the Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry System for Identification of Clinically Relevant Filamentous Fungi ». *Journal of Clinical Microbiology* 54 (8): 2068-73. <https://doi.org/10.1128/JCM.00825-16>.
- Medina, Angel, Ronald J. W. Lambert, et Naresh Magan. 2012. « Rapid Throughput Analysis of Filamentous Fungal Growth Using Turbidimetric Measurements with the Bioscreen C: A Tool for Screening Antifungal Compounds ». *Fungal Biology* 116 (1): 161-69. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.11.001>.
- Meletiadiis, Joseph, Debbie T. A. te Dorsthorst, et Paul E. Verweij. 2003. « Use of Turbidimetric Growth Curves for Early Determination of Antifungal Drug Resistance of Filamentous Fungi ». *Journal of Clinical Microbiology* 41 (10): 4718-25. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.10.4718-4725.2003>.
- Meletiadiis, Joseph, Jacques F. G. M. Meis, Johan W. Mouton, et Paul E. Verweij. 2001. « Analysis of Growth Characteristics of Filamentous Fungi in Different Nutrient Media ». *Journal of Clinical Microbiology* 39 (2): 478-84. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.2.478-484.2001>.
- Nacef, Menouar, Mickaël Chevalier, Sylvie Chollet, Djamel Drider, et Christophe Flahaut. 2017. « MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: The Maroilles ». *International Journal of Food Microbiology*, Special Issue: CBL 20th edition: New challenges for research and industry, 247 (Supplement C): 2-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.005>.
- Nagy, E., T. Maier, E. Urban, G. Terhes, et M. Kostrzewa. 2009. « Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry ». *Clinical Microbiology and Infection* 15 (8): 796-802. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02788.x>.
- Nair, Ramkumar B., Patrik R. Lennartsson, et Mohammad J. Taherzadeh. 2016. « Mycelial Pellet Formation by Edible Ascomycete Filamentous Fungi, *Neurospora Intermedia* ». *AMB Express* 6 (1): 31. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0203-2>.
- Nakamura, Sayaka, Hiroaki Sato, Reiko Tanaka, et Takashi Yaguchi. 2016. « Verification of Ribosomal Proteins of *Aspergillus fumigatus* for Use as Biomarkers in MALDI-TOF MS Identification ». *Mass Spectrometry* 5 (1). <https://doi.org/10.5702/massspectrometry.A0049>.
- Nielsen, Jens, Claus L. Johansen, Michael Jacobsen, Preben Krabben, et John Villadsen. 1995. « Pellet Formation and Fragmentation in Submerged Cultures of *Penicillium*

- Chrysogenum and Its Relation to Penicillin Production ». *Biotechnology Progress* 11 (1): 93-98. <https://doi.org/10.1021/bp00031a013>.
- Nielsen, L. K., A. F. Justesen, J. D. Jensen, et L. N. Jørgensen. 2013. « *Microdochium nivale* and *Microdochium majus* in seed samples of Danish small grain cereals ». *Crop Protection* 43 (janvier): 192-200. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.09.002>.
- Normand, Anne-Cécile, Carole Cassagne, Stéphane Ranque, Coralie L'ollivier, Patrick Fourquet, Sam Roesems, Marijke Hendrickx, et Renaud Piarroux. 2013. « Assessment of Various Parameters to Improve MALDI-TOF MS Reference Spectra Libraries Constructed for the Routine Identification of Filamentous Fungi ». *BMC Microbiology* 13 (avril): 76. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-76>.
- Norvell, Lorelei L. 2011. « Fungal nomenclature. 1. Melbourne approves a new Code ». *Mycotaxon* 116 (juin): 481-90. <https://doi.org/10.5248/116.481>.
- O'Donnell, Kerry, Deanna A. Sutton, Michael G. Rinaldi, Cécile Gueidan, Pedro W. Crous, et David M. Geiser. 2009. « Novel Multilocus Sequence Typing Scheme Reveals High Genetic Diversity of Human Pathogenic Members of the *Fusarium incarnatum*-*F. equiseti* and *F. chlamydosporum* Species Complexes within the United States ». *Journal of Clinical Microbiology* 47 (12): 3851-61. <https://doi.org/10.1128/JCM.01616-09>.
- Ollé Resa, Carolina P., Rosa J. Jagus, et Lía N. Gerschenson. 2014. « Natamycin efficiency for controlling yeast growth in models systems and on cheese surfaces ». *Food Control* 35 (1): 101-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.049>.
- Packeu, Ann, Marijke Hendrickx, Hugues Beguin, Delphine Martiny, Olivier Vandenberg, et Monique Detandt. 2013. « Identification of the Trichophyton Mentagrophytes Complex Species Using MALDI-TOF Mass Spectrometry ». *Medical Mycology* 51 (6): 580-85. <https://doi.org/10.3109/13693786.2013.770605>.
- Panda, Ashutosh, Anup K. Ghosh, Bijay R. Mirdha, Immaculata Xess, Saikat Paul, Jyotish C. Samantaray, Alagiri Srinivasan, Shehla Khalil, Neha Rastogi, et Yubhisha Dabas. 2015. « MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of clinical fungal isolates based on ribosomal protein biomarkers ». *Journal of Microbiological Methods* 109 (février): 93-105. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.12.014>.
- Parfitt, Julian, Mark Barthel, et Sarah Macnaughton. 2010. « Food Waste within Food Supply Chains: Quantification and Potential for Change to 2050 ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365 (1554): 3065-81. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0126>.
- Park, Ju Heon, Jong Hee Shin, Min Ji Choi, Jin Un Choi, Yeon-Joon Park, Sook Jin Jang, Eun Jeong Won, et al. 2017. « Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of 345 clinical isolates of *Aspergillus* species from 11 Korean hospitals: comparison with molecular identification ». *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 87 (1): 28-31. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.10.012>.
- Paterson, R. R. M., et P. D. Bridge. 1994. « Biochemical Techniques for Filamentous Fungi. » *Biochemical Techniques for Filamentous Fungi.*, n° No. 1. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19942307431>.
- Paterson, Robert R. M., et Nelson Lima. 2010. « Toxicology of Mycotoxins ». *EXS* 100: 31-63.
- Paul, Saikat, Pankaj Singh, Shivaprakash M. Rudramurthy, Arunaloke Chakrabarti, et Anup K. Ghosh. 2017. « Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: Protocol Standardization and Database Expansion for Rapid

- Identification of Clinically Important Molds ». *Future Microbiology* 12: 1457-66. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0105>.
- Paul, Saikat, Pankaj Singh, Savitri Sharma, Gandham Satyanarayana Prasad, Shivaprakash Mandya Rudramurthy, Arunaloke Chakrabarti, et Anup K. Ghosh. 2018. « MALDI-TOF MS Based Identification of Melanized Fungi Is Faster and Reliable After the Expansion of In-House Database ». *PROTEOMICS – Clinical Applications* 0 (ja): 1800070. <https://doi.org/10.1002/prca.201800070>.
- Peskett, Geoffrey Lewis. 1927. « Studies on the Growth of Yeast ». *Biochemical Journal* 21 (3): 460-66.
- Pinches, S. E., et P. Apps. 2007. « Production in food of 1,3-pentadiene and styrene by *Trichoderma* species ». *International Journal of Food Microbiology* 116 (1): 182-85. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.001>.
- Piper, Peter W. 2011. « Resistance of Yeasts to Weak Organic Acid Food Preservatives ». *Advances in Applied Microbiology* 77: 97-113. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387044-5.00004-2>.
- Pitt, John, et Ailsa Hocking. 2009. *Fungi and food spoilage*. 3rd éd. New York, USA: Springer Science & Business media.
- Pitt, John I. 1979. *The Genus Penicillium and Its Teleomorphic States Eupenicillium and Talaromyces*. Acad. Press.
- Plamen A. Demirev, *, Yen-Peng Ho, and Victor Ryzhov, et Catherine Fenselau. 1999. « Microorganism Identification by Mass Spectrometry and Protein Database Searches ». Research-article. 27 mai 1999. <https://doi.org/10.1021/ac990165u>.
- Plumridge, Andrew, Stephan J. A. Hesse, Adrian J. Watson, Kenneth C. Lowe, Malcolm Stratford, et David B. Archer. 2004. « The Weak Acid Preservative Sorbic Acid Inhibits Conidial Germination and Mycelial Growth of *Aspergillus Niger* through Intracellular Acidification ». *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (6): 3506-11. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3506-3511.2004>.
- Plumridge, Andrew, Petter Melin, Malcolm Stratford, Michaela Novodvorska, Lee Shunburne, Paul S. Dyer, Johannes A. Roubos, et al. 2010. « The decarboxylation of the weak-acid preservative, sorbic acid, is encoded by linked genes in *Aspergillus* spp. » *Fungal Genetics and Biology* 47 (8): 683-92. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.04.011>.
- Praphailong, W, et G. H Fleet. 1997. « The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts ». *Food Microbiology* 14 (5): 459-68. <https://doi.org/10.1006/fmic.1997.0106>.
- Prieto, María, et Mats Wedin. 2013. « Dating the Diversification of the Major Lineages of Ascomycota (Fungi) ». *PLOS ONE* 8 (6): e65576. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065576>.
- Pulcrano, G., E. Roschetto, V. D. Iula, D. Panellis, F. Rossano, et M. R. Catania. 2012. « MALDI-TOF Mass Spectrometry and Microsatellite Markers to Evaluate *Candida Parapsilosis* Transmission in Neonatal Intensive Care Units ». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 31 (11): 2919-28. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1642-6>.
- Quéro, Laura, Victoria Girard, Audrey Pawtowski, Sylvie Tréguer, Amélie Weill, Sandrine Arend, Béatrice Cellière, et al. 2018. « Development and application of MALDI-TOF MS for identification of food spoilage fungi ». *Food Microbiology*, mai. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.05.001>.

- Rahi, Praveen, Om Prakash, et Yogesh S. Shouche. 2016. « Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass-Spectrometry (MALDI-TOF MS) Based Microbial Identifications: Challenges and Scopes for Microbial Ecologists ». *Frontiers in Microbiology* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01359>.
- Ranque, Stéphane, Anne-Cécile Normand, Carole Cassagne, Jean-Benjamin Murat, Nathalie Bourgeois, Frédéric Dalle, Martine Gari-Toussaint, Patrick Fourquet, Marijke Hendrickx, et Renaud Piarroux. 2014. « MALDI-TOF Mass Spectrometry Identification of Filamentous Fungi in the Clinical Laboratory ». *Mycoses* 57 (3): 135-40. <https://doi.org/10.1111/myc.12115>.
- Rédou, Vanessa, Marion Navarri, Laurence Meslet-Cladière, Georges Barbier, et Gaëtan Burgaud. 2015. « Marine Fungi from Deep Subseafloor Sediments: Species Richness and Adaptation. » *Appl. Environ. Microbiol.*, mars, AEM.04064-14. <https://doi.org/10.1128/AEM.04064-14>.
- Rico-Munoz, Emilia, Robert A. Samson, et Jos Houbraken. 2018. « Mould spoilage of foods and beverages: Using the right methodology ». *Food Microbiology*, mars. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.016>.
- Rodrigues, Inês, et Karin Naehrer. 2012. « A Three-Year Survey on the Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Feedstuffs and Feed ». *Toxins* 4 (9): 663-75. <https://doi.org/10.3390/toxins4090663>.
- Rodrigues, P., C. Santos, A. Venâncio, et N. Lima. 2011. « Species Identification of Aspergillus Section Flavi Isolates from Portuguese Almonds Using Phenotypic, Including MALDI-TOF ICMS, and Molecular Approaches ». *Journal of Applied Microbiology* 111 (4): 877-92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05116.x>.
- Rokas, A., G. Payne, N. D. Fedorova, S. E. Baker, M. Machida, J. Yu, D. Ryan Georgianna, et al. 2007. « What Can Comparative Genomics Tell Us about Species Concepts in the Genus Aspergillus? » *Studies in Mycology* 59: 11-17. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.02>.
- Ropars, Jeanne, Corinne Cruaud, Sandrine Lacoste, et Joëlle Dupont. 2012. « A taxonomic and ecological overview of cheese fungi ». *International Journal of Food Microbiology* 155 (3): 199-210. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.005>.
- Ropars, Jeanne, Manuela López-Villavicencio, Joëlle Dupont, Alodie Snirc, Guillaume Gillot, Monika Coton, Jean-Luc Jany, Emmanuel Coton, et Tatiana Giraud. 2014. « Induction of Sexual Reproduction and Genetic Diversity in the Cheese Fungus *Penicillium Roqueforti* ». *Evolutionary Applications* 7 (4): 433-41. <https://doi.org/10.1111/eva.12140>.
- Samson, R. A., K. A. Seifert, A. F. A. Kuijpers, J. Houbraken, et J. C. Frisvad. 2004. « Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial β -tubulin sequences ». *Studies in Mycology* 49: 175-200.
- Samson, Robert A. 2010. *Food and Indoor Fungi*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.
- Sanguinetti, Maurizio, et Brunella Posteraro. 2014. « MALDI-TOF Mass Spectrometry: Any Use for Aspergilli? » *Mycopathologia* 178 (5-6): 417-26. <https://doi.org/10.1007/s11046-014-9757-1>.
- Santos, C., R. R. M. Paterson, A. Venâncio, et N. Lima. 2010. « Filamentous Fungal Characterizations by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry ». *Journal of Applied Microbiology* 108 (2): 375-85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04448.x>.
- Santos, Juliana Lane Paixão dos, Angélica Olivier Bernardi, Letícia L. Pozza Morassi, Beatriz S. Silva, Marina Venturini Copetti, et Anderson S. Sant'Ana. 2016. « Incidence, populations and diversity of fungi from raw materials, final products and

- air of processing environment of multigrain whole meal bread ». *Food Research International* 87 (Supplement C): 103-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.07.002>.
- Sauer, Sascha, Anja Freiwald, Thomas Maier, Michael Kube, Richard Reinhardt, Markus Kostrzewa, et Klaus Geider. 2008. « Classification and Identification of Bacteria by Mass Spectrometry and Computational Analysis ». *PLOS ONE* 3 (7): e2843. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002843>.
- Schoch, Conrad L., Barbara Robbertse, Vincent Robert, Duong Vu, Gianluigi Cardinali, Laszlo Irinyi, Wieland Meyer, et al. 2014. « Finding needles in haystacks: linking scientific names, reference specimens and molecular data for Fungi ». *Database: The Journal of Biological Databases and Curation* 2014 (juin). <https://doi.org/10.1093/database/bau061>.
- Schoch, Conrad L., Keith A. Seifert, Sabine Huhndorf, Vincent Robert, John L. Spouge, C. André Levesque, Wen Chen, et al. 2012. « Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Region as a Universal DNA Barcode Marker for Fungi ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (16): 6241-46. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>.
- Schulthess, Bettina, Raphael Ledermann, Forouhar Mouttet, Andrea Zbinden, Guido V. Bloemberg, Erik C. Böttger, et Michael Hombach. 2014. « Use of the Bruker MALDI Biotyper for Identification of Molds in the Clinical Mycology Laboratory ». *Journal of Clinical Microbiology* 52 (8): 2797-2803. <https://doi.org/10.1128/JCM.00049-14>.
- Sergeeva, Ya E., L. A. Galanina, G. A. Kochkina, et E. P. Feofilova. 2009. « The Effect of the Preservative Sorbic Acid on the Lipid Composition of the Ascomycete Fungus *Penicillium Roqueforti* Thom ». *Microbiology* 78 (5): 630-35. <https://doi.org/10.1134/S0026261709050166>.
- Shapaval, V., J. Schmitt, T. Møretrø, H. P. Suso, I. Skaar, A. W. Åsli, D. Lillehaug, et A. Kohler. 2013. « Characterization of Food Spoilage Fungi by FTIR Spectroscopy ». *Journal of Applied Microbiology* 114 (3): 788-96. <https://doi.org/10.1111/jam.12092>.
- Singh, Maya Prakash. 2009. « Application of Biolog FF MicroPlate for substrate utilization and metabolite profiling of closely related fungi ». *Journal of Microbiological Methods* 77 (1): 102-8. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.01.014>.
- Sivagnanam, Kumaran, Emy Komatsu, Christoph Rampitsch, Hélène Perreault, et Tom Gräfenhan. 2017. « Rapid Screening of *Alternaria* Mycotoxins Using MALDI-TOF Mass Spectrometry ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97 (1): 357-61. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7703>.
- Sleiman, Sue, Catriona L. Halliday, Belinda Chapman, Mitchell Brown, Joanne Nitschke, Anna F. Lau, et Sharon C.-A. Chen. 2016. « Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of *Aspergillus*, *Scedosporium*, and *Fusarium* Spp. in the Australian Clinical Setting ». *Journal of Clinical Microbiology* 54 (8): 2182-86. <https://doi.org/10.1128/JCM.00906-16>.
- Spatafora, Joey. 2011. « 1000 Fungal Genomes to Be Sequenced ». Text. décembre 2011. <https://www.ingentaconnect.com/content/ima/imafung/2011/00000002/00000002/art0002>.
- Spatafora, Joseph W., M. Catherine Aime, Igor V. Grigoriev, Francis Martin, Jason E. Stajich, et Meredith Blackwell. 2017. « The Fungal Tree of Life: From Molecular Systematics to Genome-Scale Phylogenies ». *Microbiology Spectrum* 5 (5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0053-2016>.

- Spinali, Sébastien, Alex van Belkum, Richard V. Goering, Victoria Girard, Martin Welker, Marc Van Nuenen, David H. Pincus, Maud Arsac, et Géraldine Durand. 2015. « Microbial Typing by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: Do We Need Guidance for Data Interpretation? » *Journal of Clinical Microbiology* 53 (3): 760-65. <https://doi.org/10.1128/JCM.01635-14>.
- Stanojevic, D., L. Comic, O. Stefanovic, et S. Solujic-Sukdolak. 2009. « Antimicrobial effects of sodium benzoate, sodium nitrite and potassium sorbate and their synergistic action in vitro ». *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 15 (4): 307-11.
- Stratford, M., et P. A. Anslow. 1996. « Comparison of the Inhibitory Action on *Saccharomyces Cerevisiae* of Weak-Acid Preservatives, Uncouplers, and Medium-Chain Fatty Acids ». *FEMS Microbiology Letters* 142 (1): 53-58.
- Stratford, Malcolm, Gerhard Nebe-von-Caron, Hazel Steels, Michaela Novodvorska, Joerg Ueckert, et David B. Archer. 2013. « Weak-acid preservatives: pH and proton movements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* ». *International Journal of Food Microbiology* 161 (3): 164-71. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.013>.
- Stratford, Malcolm, Andrew Plumridge, Gerhardt Nebe-von-Caron, et David B. Archer. 2009. « Inhibition of spoilage mould conidia by acetic acid and sorbic acid involves different modes of action, requiring modification of the classical weak-acid theory ». *International Journal of Food Microbiology* 136 (1): 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.025>.
- Streekstra, Hugo, Alex E. E. Verkennis, Robbert Jacobs, Angelina Dekker, Jacques Stark, et Jan Dijksterhuis. 2016. « Fungal Strains and the Development of Tolerance against Natamycin ». *International Journal of Food Microbiology* 238 (décembre): 15-22. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.006>.
- Susca, Antonia, Antonio Moretti, Gaetano Stea, Alessandra Villani, Miriam Haidukowski, Antonio Logrieco, et Gary Munkvold. 2014. « Comparison of species composition and fumonisin production in *Aspergillus* section *Nigri* populations in maize kernels from USA and Italy ». *International Journal of Food Microbiology* 188 (octobre): 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.031>.
- Tam, Emily W. T., Jonathan H. K. Chen, Eunice C. L. Lau, Antonio H. Y. Ngan, Kitty S. C. Fung, Kim-Chung Lee, Ching-Wan Lam, Kwok-Yung Yuen, Susanna K. P. Lau, et Patrick C. Y. Woo. 2014. « Misidentification of *Aspergillus Nomius* and *Aspergillus Tamarii* as *Aspergillus Flavus*: Characterization by Internal Transcribed Spacer, β -Tubulin, and Calmodulin Gene Sequencing, Metabolic Fingerprinting, and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry ». *Journal of Clinical Microbiology* 52 (4): 1153-60. <https://doi.org/10.1128/JCM.03258-13>.
- Tolan, Jeffrey S. 2002. « Iogen's Process for Producing Ethanol from Cellulosic Biomass ». *Clean Technologies and Environmental Policy* 3 (4): 339-45. <https://doi.org/10.1007/s10098-001-0131-x>.
- Torruella, Guifré, Alex de Mendoza, Xavier Grau-Bové, Meritxell Antó, Mark A. Chaplin, Javier del Campo, Laura Eme, et al. 2015. « Phylogenomics Reveals Convergent Evolution of Lifestyles in Close Relatives of Animals and Fungi ». *Current Biology: CB* 25 (18): 2404-10. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.053>.
- Turner, Nicholas W., Sreenath Subrahmanyam, et Sergey A. Piletsky. 2009. « Analytical Methods for Determination of Mycotoxins: A Review ». *Analytica Chimica Acta* 632 (2): 168-80. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.11.010>.
- Ueda, O., S. Tanaka, Z. Nagasawa, H. Hanaki, T. Shobuike, et H. Miyamoto. 2015. « Development of a novel matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrum (MALDI-TOF-MS)-based typing method to identify meticillin-

- resistant *Staphylococcus aureus* clones ». *Journal of Hospital Infection* 90 (2): 147-55. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.11.025>.
- Usbeck, Julia C., Caroline Wilde, Dave Bertrand, Jürgen Behr, et Rudi F. Vogel. 2014. « Wine Yeast Typing by MALDI-TOF MS ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (8): 3737-52. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5586-x>.
- Valencia-Chamorro, Silvia A., María B. Pérez-Gago, Miguel A. Del Río, et Lluís Palou. 2010. « Effect of Antifungal Hydroxypropyl Methylcellulose-Lipid Edible Composite Coatings on *Penicillium* Decay Development and Postharvest Quality of Cold-Stored “Ortanique” Mandarins ». *Journal of Food Science* 75 (8): S418-26. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01801.x>.
- Varga, J., J. C. Frisvad, S. Kocsubé, B. Brankovics, B. Tóth, G. Szigeti, et R. A. Samson. 2011. « New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri* ». *Studies in Mycology, Taxonomic studies on the genus Aspergillus*, 69 (juin): 1-17. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.69.01>.
- Vargha, Márta, Zoltán Takáts, Allan Konopka, et Cindy H. Nakatsu. 2006. « Optimization of MALDI-TOF MS for Strain Level Differentiation of *Arthro bacter* Isolates ». *Journal of Microbiological Methods* 66 (3): 399-409. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.01.006>.
- Varma, Ajit, et Amit C. Kharkwal, éd. 2009. *Symbiotic Fungi: Principles and Practice*. Soil Biology. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. [//www.springer.com/us/book/9783540958932](http://www.springer.com/us/book/9783540958932).
- Vaughan, M., D. Backhouse, et E.M. Del Ponte. 2016. « Climate change impacts on the ecology of *Fusarium graminearum* species complex and susceptibility of wheat to *Fusarium* head blight: a review ». *World Mycotoxin Journal* 9 (5): 685-700. <https://doi.org/10.3920/WMJ2016.2053>.
- Vidrih, Rajko, et Janez Hribar. 2016. « Mead: The Oldest Alcoholic Beverage ». In *Traditional Foods: General and Consumer Aspects*, édité par Kristberg Kristbergsson et Jorge Oliveira, 325-38. Integrating Food Science and Engineering Knowledge Into the Food Chain. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7648-2_26.
- Visagie, C. M., J. Houbraeken, J. C. Frisvad, S. -B. Hong, C. H. W. Klaassen, G. Perrone, K. A. Seifert, J. Varga, T. Yaguchi, et R. A. Samson. 2014. « Identification and nomenclature of the genus *Penicillium* ». *Studies in Mycology* 78 (Supplement C): 343-71. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>.
- Vitale, R., E. Roine, D. H. Bamford, et A. Corcelli. 2013. « Lipid fingerprints of intact viruses by MALDI-TOF/mass spectrometry ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1831 (4): 872-79. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.01.011>.
- Vu, D., M. Groenewald, M. de Vries, T. Gehrman, B. Stielow, U. Eberhardt, A. Al-Hatmi, et al. 2019. « Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation ». *Studies in Mycology* 92 (mars): 135-54. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.05.001>.
- Wambacq, Eva, Ilse Vanhoutte, Kris Audenaert, Leen De Gelder, et Geert Haesaert. 2016. « Occurrence, Prevention and Remediation of Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Silage: A Review ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96 (7): 2284-2302. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7565>.
- Wang, Hwa L., E. W. Swain, et C. W. Hessel Tine. 1975. « MASS PRODUCTION OF *Rhizopus Oligosporus* SPORES AND THEIR APPLICATION IN TEMPEH

- FERMENTATION ». *Journal of Food Science* 40 (1): 168-70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1975.tb03762.x>.
- Waśkiewicz, A. 2014. « MYCOTOXINS | Natural Occurrence of Mycotoxins in Food ». In *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, édité par Carl A. Batt et Mary Lou Tortorello, 880-86. Oxford: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00231-7>.
- Welham, K. J., M. A. Domin, K. Johnson, L. Jones, et D. S. Ashton. 2000. « Characterization of Fungal Spores by Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry ». *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 14 (5): 307-10. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(20000315\)14:5<307::AID-RCM823>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(20000315)14:5<307::AID-RCM823>3.0.CO;2-3).
- Welscher, Yvonne M. te, Hendrik H. ten Napel, Miriam Masià Balagué, Cleiton M. Souza, Howard Riezman, Ben de Kruijff, et Eefjan Breukink. 2008. « Natamycin Blocks Fungal Growth by Binding Specifically to Ergosterol without Permeabilizing the Membrane ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (10): 6393-6401. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707821200>.
- Welscher, Yvonne Maria te, Martin Richard van Leeuwen, Ben de Kruijff, Jan Dijksterhuis, et Eefjan Breukink. 2012. « Polyene Antibiotic That Inhibits Membrane Transport Proteins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (28): 11156-59. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203375109>.
- Willis, K. J. 2018. « State of the World's Fungi 2018 ». Royal Botanic Gardens.
- Witkowska, Evelin, Tomasz Jagielski, et Agnieszka Kamińska. 2018. « Genus- and species-level identification of dermatophyte fungi by surface-enhanced Raman spectroscopy ». *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 192 (mars): 285-90. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.11.008>.
- Wuijckhuijse, A. L. van, M. A. Stowers, W. A. Kleefsman, B. L. M. van Baar, Ch. E. Kientz, et J. C. M. Marijnissen. 2005. « Matrix-assisted laser desorption/ionisation aerosol time-of-flight mass spectrometry for the analysis of bioaerosols: development of a fast detector for airborne biological pathogens ». *Journal of Aerosol Science, Measurement and Characterization of Bioaerosols*, 36 (5): 677-87. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2004.11.003>.
- Xu, Yan, Guangren Pang, Chuanwen Gao, Dongqing Zhao, Lutan Zhou, Shengtao Sun, et Bingliang Wang. 2009. « In Vitro Comparison of the Efficacies of Natamycin and Silver Nitrate against Ocular Fungi ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (4): 1636-38. <https://doi.org/10.1128/AAC.00697-08>.
- Yilmaz, N., C. M. Visagie, J. Houbraken, J. C. Frisvad, et R. A. Samson. 2014. « Polyphasic Taxonomy of the Genus *Talaromyces* ». *Studies in Mycology* 78 (juin): 175-341. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.08.001>.
- Yogendrarajah, Pratheeba, An Vermeulen, Liesbeth Jacxsens, Evangelia Mavromichali, Sarah De Saeger, Bruno De Meulenaer, et Frank Devlieghere. 2016. « Mycotoxin production and predictive modelling kinetics on the growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolates in whole black peppercorns (*Piper nigrum* L) ». *International Journal of Food Microbiology* 228 (juillet): 44-57. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.015>.
- Zwietering, M. H., J. C. de Wit, H. G. A. M. Cuppers, et K. van 't Riet. 1994. « Modeling of Bacterial Growth with Shifts in Temperature ». *Applied and Environmental Microbiology* 60 (1): 204-13.

Valorisations scientifiques

Publications

Quéro L., Girard V., Pawtowski A., Tréguer S., Weill A., Arend S., Cellière B., Polsinelli S., Monnin V., Van Belkum A., Vasseur V., Nodet P., Mounier J., 2018. Development and application of MALDI-TOF MS for identification of food spoilage fungi. *Food Microbiology*, doi: 10.1016/j.fm.2018.05.001

Communications orales

Quéro L., Girard V., Pawtowski A., Arend S., Desforges I., Vasseur V., Nodet P., Mounier J., 2017. Development and application of MALDI-TOF MS for identification of food spoilage fungi. *Microbial Spoilers in Food*, Quimper, France

Quéro L., Girard V., Pawtowski A., Tréguer S., Weill A., Arend S., Vasseur V., Nodet P., Mounier J., 2018. Développement et application de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification des moisissures d'intérêt alimentaire. 7^{ème} journées Mycotoxines, Bordeaux, France

Microbial Spoilers in Food 2017, Quimper, France

Development and application of MALDI-TOF MS for identification of food spoilage fungi

QUERO Laura (1), GIRARD Victoria (2), PAWTOWSKI Audrey (1), AREND Sandrine (2), DESFORGES Isabelle (3), VASSEUR Valérie (1), NODET Patrice (1), MOUNIER Jérôme (1)

(1) Université de Brest, EA 3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, IBSAM, ESIAB Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France; bioMérieux, R&D Microbiologie, route de Port Michaud, 38390 La Balme les Grottes, France

(2) bioMérieux, R&D Microbiologie, route de Port Michaud, 38390 La Balme les Grottes, France

(3) bioMérieux, Marketing scientifique, Chemin de l'Orme, 69280 Marcy l'étoile, France



Presenting author : [Laura Quero](#)

KEYWORDS

MALDI-TOF MS ; spoilage fungi ; identification

INTRODUCTION

Filamentous fungi are frequently involved in food spoilage and represent a major cause of food and economic losses. Rapid and accurate identification of fungi is a key step to better manage food safety and quality. MALDI-TOF MS has emerged as a powerful tool to identify microorganisms and can be applied to spoilage fungi identification.

MATERIAL & METHODS

The VITEK MS 3.1 industry database already contains 200 fungal species (yeasts and molds). The aim of this project is to implement in this database additional species of filamentous fungi responsible for spoilage of various foods including agricultural, dairy and bakery products. These 150 additional species, covering 30 genera, were selected based on scientific literature and customer feedback. Following a rapid extraction step, spectra were acquired on a minimum of 5 fungal strains per species, after incubation for 2 and 8 days on 4 media commonly used for food mycological analysis. The performance of this database was then evaluated by cross-validation.

RESULTS

So far, 3000 spectra from 50 species were successfully acquired and integrated in the database. Overall, 95% correct identifications to the species level were obtained by cross-validation, independently of the cultivation medium and incubation time. Integration of the other fungal species is ongoing and an external database evaluation will also be performed.

SIGNIFICANCE

MALDI-TOF MS is an attractive solution with high added-value for industrials to identify spoilage fungi.

Développement et application de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification des moisissures d'intérêt alimentaire

Laura Quéro^{1,2}, Victoria Girard², Audrey Pawtowski¹, Sylvie Tréguer¹, Amélie Weill^{1,3}, Sandrine Arend², Valérie Vasseur¹, Patrice Nodet¹, Jérôme Mounier¹

1- Université de Brest, EA 3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, IBSAM, ESIAB Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

2- bioMérieux, R&D Microbiologie, route de Port Michaud, 38390 La Balme les Grottes, France

3- Université de Bretagne Occidentale Culture Collection, Université de Brest, ESIAB, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

laura.quero@biomerieux.com

Résumé

Les moisissures peuvent être impliquées dans l'altération des matières premières et des aliments transformés et sont responsables de gaspillage alimentaire, de pertes économiques importantes mais peuvent aussi présenter un danger pour la santé humaine et animale avec la production potentielle de mycotoxines. C'est pourquoi leur identification fiable et rapide est une étape clé pour garantir la qualité et la sécurité des denrées alimentaires. Dans ce contexte, la spectrométrie de masse MALDI-TOF constitue un outil efficace pour l'identification des micro-organismes et plus particulièrement les moisissures d'intérêt alimentaire. La base de données VITEK MS 3.1 (bioMérieux, Marcy l'Etoile), dédiée à l'identification des microorganismes par spectrométrie de masse MALDI-TOF, comprend actuellement 200 espèces fongiques d'intérêt médical. Le but de ce travail était d'augmenter cette base de données en intégrant des espèces fongiques d'intérêt alimentaire comme celles retrouvées par exemple dans les produits de boulangerie, les produits laitiers ou les céréales. Ainsi, 150 espèces supplémentaires, correspondant à 30 genres différents, ont été sélectionnées sur la base de leur présence dans les aliments contaminés et de leur capacité à produire des mycotoxines. Après un protocole d'extraction rapide, les spectres ont été acquis pour au moins 5 souches par espèce, après croissance pendant 2 et 8 jours sur 4 milieux différents fréquemment utilisés en mycologie alimentaire. Les performances de la base de données contenant ces espèces supplémentaires ont été estimées par cross-validation puis validées en testant un jeu de données externes. A ce stade de l'étude, 6000 spectres issus de 130 espèces fongiques ont été acquis et intégrés à la base de données. Plus de 90% d'identifications correctes à l'espèce ont été obtenus lors de l'estimation des performances de celle-ci par cross-validation. La base de données a également été évaluée avec succès pour l'identification de souches externes (90% d'identification correcte pour les espèces revendiquées). L'analyse des résultats a également permis d'éliminer un effet milieu ou temps de culture sur les performances d'identification. La spectrométrie de masse MALDI-TOF est donc une solution rapide et fiable pour l'identification des champignons filamenteux retrouvés dans les denrées alimentaires et l'environnement industriel.

Mots-clés : Spectrométrie de masse MALDI-TOF, moisissures, altérations alimentaires, identification.

Titre : Développement de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification des champignons filamenteux d'intérêt alimentaire et étude de leur résistance aux molécules biocides

Mots clés : Moisissures d'altération, identification, spectrométrie de masse MALDI-TOF, complexes d'espèces, néphélométrie laser, croissance

Résumé : Les moisissures d'altération sont à l'origine de pertes alimentaires et économiques importantes et certaines espèces peuvent présenter un danger pour la santé humaine et animale avec la production de mycotoxines. Dans ce contexte, la maîtrise de la qualité et de la sécurité des aliments passe par une bonne connaissance des espèces impliquées. Cette connaissance repose sur une identification fiable et rapide et l'obtention d'informations sur les facteurs abiotiques impactant leur développement, tels que les conservateurs, largement utilisés dans l'industrie. Dans ce cadre, les objectifs de thèse étaient de développer l'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification des moisissures et d'évaluer son application à la résolution de complexe d'espèces et au typage, et enfin d'évaluer la néphélométrie laser pour mesurer en haut-débit leur croissance en présence de conservateurs.

Dans un premier temps, une base de données robuste a été construite avec près de 6500 spectres correspondant à 136 espèces fongiques. Dans un deuxième temps, la technique MALDI-TOF a été appliquée avec succès à la différenciation de 23 espèces du complexe *Aspergillus* section *Flavi* et a permis différencier des isolats de *Penicillium roqueforti* appartenant à 3 populations génétiquement différenciées. Enfin, la néphélométrie laser a permis un suivi haut-débit de la croissance de 14 espèces fongiques d'altération en présence de 3 conservateurs et ainsi d'obtenir des informations sur les concentrations minimales inhibitrices de ces derniers. Ces travaux ont démontré l'applicabilité de techniques alternatives permettant d'identifier et de caractériser les moisissures d'altération.

Title : Development of MALDI-TOF MS to identify filamentous fungi and study of their resistance towards biocidal molecules

Keywords : Food spoilage fungi, identification, typing, MALDI-TOF, laser nephelometry, growth

Abstract : Spoilage fungi represent a major cause of food and economic losses and certain species, which may produce mycotoxins, may also pose a threat to human and animal health. Thus, food safety and quality management relies notably on a good knowledge of the involved species. This knowledge is notably based on their fast and reliable identification and on the study of abiotic factors affecting their growth such as food preservatives, which are commonly used in the food industry. In this context, the objectives of this PhD. thesis were to develop MALDI-TOF mass spectrometry for mold identification and to evaluate its potential for species complex differentiation and strain typing, and finally, to evaluate the use of laser nephelometry to monitor fungal growth in the presence of food preservatives.

First, a robust database was developed with 6500 spectra corresponding to 136 spoilage fungi. Then, MALDI-TOF MS was successfully applied to differentiate 23 species of *Aspergillus* section *Flavi* and *Penicillium roqueforti* isolates belonging to 3 genetically distinct populations. Finally, in 14 fungal species, laser nephelometry allowed a high-throughput monitoring of their growth after exposition to 3 different food preservatives and the determination of their associated minimal inhibitory concentrations. Overall, the obtained results demonstrate the usefulness of alternative techniques for identification and characterization of food spoilage fungi.