



HAL
open science

Etude génétique et phénotypique de *Bisifusarium domesticum*

Océane Savary

► **To cite this version:**

Océane Savary. Etude génétique et phénotypique de *Bisifusarium domesticum*. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2021. Français. NNT : 2021BRES0109 . tel-03789622

HAL Id: tel-03789622

<https://theses.hal.science/tel-03789622v1>

Submitted on 27 Sep 2022

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

ECOLE DOCTORALE N° 600

Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation

Spécialité : *Microbiologie, Virologie, Parasitologie*

Par

Océane SAVARY

Etude génétique et phénotypique de *Bisifusarium domesticum*

Thèse présentée et soutenue à Plouzané, le 16 décembre 2021

Unité de recherche : Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (UR 3882), UBO

Rapporteurs avant soutenance :

Cécile NEUVEGLISE Directrice de Recherche, INRAE, UMR SPO
Pascal BONNARME Directeur de Recherche, INRAE, UMR 0782 SayFood

Composition du Jury :

Président : Florence FORGET Directrice de Recherche INRAE, UR 1264 MyCSA

Examineurs : Cécile NEUVEGLISE Directrice de Recherche, INRAE, UMR SPO
Pascal BONNARME Directeur de Recherche, INRAE, UMR 0782 SayFood
Florence FORGET Directrice de Recherche INRAE, UR 1264 MyCSA

Dir. de thèse : Emmanuel COTON Professeur, LUBEM, UBO
Encadrants : Monika COTON Maître de Conférences/HDR, LUBEM, UBO
Jean-Luc JANY Maître de Conférences, LUBEM, UBO

Remerciements

Mes premiers remerciements vont aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail et ainsi me faire profiter de leur expertise.

Je remercie également la région Bretagne, le ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation ainsi que le Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière, sans qui cette thèse n'aurait vraisemblablement pas pu se faire. Je remercie plus particulièrement les membres du groupe MIL pour leur bienveillance et les échanges enrichissants au cours de chaque réunion d'avancée de thèse et notamment Frédéric Gaucheron, Laurence Abraham et Jean-Louis Hatte pour leur disponibilité au-delà de ces réunions.

Je remercie sincèrement mon directeur de thèse, le professeur Emmanuel Coton, également directeur du LUBEM, et mes encadrants les docteurs Jean-Luc Jany et Monika Coton. Merci pour votre soutien sans faille au cours de ces trois années de thèse, pour votre disponibilité et vos conseils toujours avisés de par votre expertise, qui plus est, complémentaire. Ce fut pour moi une vraie chance d'être encadrée par vous trois et j'espère en avoir été digne. Emmanuel, merci de m'avoir accueillie au sein du laboratoire, mais surtout je te remercie infiniment pour ta confiance, ta bienveillance et tes encouragements tout au long de cette thèse. Monika, je tiens sincèrement à te remercier pour m'avoir transmis ta passion pour le domaine fascinant de la microbiologie alimentaire, merci pour ta bonne humeur, tous tes conseils et pour m'avoir encouragée à suivre cette voie. Je retiendrais également de très bons souvenirs du congrès en Allemagne, ce fut une expérience enrichissante. Jean-Luc, merci également pour toute l'aide que tu m'as apportée, ton optimisme et ta bienveillance exemplaire, mais aussi pour toutes tes anecdotes et ces heures passées à dompter certains logiciels informatiques capricieux.

Je tiens également à remercier les personnes avec qui j'ai pu collaborer et sans qui je n'aurais pas pu mener certaines études. Je pense en particulier à Jeanne Ropars, merci pour tout ce que tu m'as appris, toute l'aide que tu m'as apportée et merci à toi et à l'équipe GEE pour cet accueil chaleureux au sein de votre laboratoire lors de mon séjour. Merci également à Anne Thierry et Marie-Bernadette Maillard pour vos analyses, merci Anne pour ta disponibilité et pour tous ces échanges enrichissants. Je remercie également le professeur Jens C. Frisvad pour l'intérêt que vous avez porté à ma thèse et pour toutes les analyses qui se sont ensuivies.

Je remercie également toutes les personnes qui ont gentiment accepté de rapporter des fromages dans leurs valises, je pense tout particulièrement à l'aide considérable de Jérôme Mounier, que je remercie également pour sa bienveillance et les différents échanges que l'on a pu avoir. Je tiens aussi à remercier Charles le Bras et Myriam Ferblantier pour votre implication au cours de vos stages ainsi que pour l'intérêt que vous avez porté à ma thèse.

Je remercie toutes les personnes de l'ESIAB et du LUBEM que j'ai pu croiser durant ces trois années, merci à tous et à toutes pour votre accueil, bienveillance, gentillesse et optimisme, qui m'ont permis d'effectuer ma thèse dans d'agréables conditions. Je tiens à effectuer un remerciement particulier à Marie-Hélène pour ta joie de vivre et énergie à revendre qui font du bien. Merci également à Marielle, tu auras été d'une aide précieuse lors de toutes mes démarches administratives, mais je retiendrais surtout ton infime bienveillance et gentillesse, merci pour tout.

Je tiens également à remercier particulièrement Stella et Sylvie, mais aussi Amélie, Christophe, Audrey, Elisabeth et Christelle, merci pour votre aide précieuse, vos conseils d'experts et votre disponibilité à chaque instant, toujours avec le sourire.

Je remercie également Louis Coroller pour ta disponibilité à chacune de mes questions et toutes les heures passées à m'aider pour les modélisations. Je remercie également Patrice Nodet pour m'avoir partagé son expertise des Fusarium. Merci aussi à Franck pour avoir pensé à moi en voyant des Fusarium et pour toutes les discussions que l'on a pu avoir. Un merci également à Karim pour ta gentillesse et optimisme à toute heure.

Je remercie infiniment Laurence, pour ton optimisme tout au long de cette thèse et toutes les discussions enrichissantes que l'on a pu avoir. C'était un plaisir de voir tes gels qui te « mettaient des paillettes dans les yeux ». Merci pour toute ta bienveillance et en particulier au cours des derniers mois et merci pour les chocolats.

Enfin, je tiens à dire un grand merci à tous les doctorants, stagiaires, assistant-ingé, etc., team LUBEM ou de passage, qui ont contribué à rendre agréables des journées interminables. Je remercie tout particulièrement Guillaume, Marine et Maxence qui ont partagé mes premiers mois de thèse. Merci docteur Lupin, pour tous tes conseils et discussions amicales. Merci également à Marine pour avoir chantonné à chaque fois que tu me voyais, et pour ton aide précieuse, même à distance. Merci Maxence pour m'avoir partagé ton expertise du néphélo et toutes tes anecdotes autour d'un café. Un merci également à Julie, tu m'auras bien fait rire en ce début de thèse. Je remercie également Marie, Ewen, Marine, Aurélie et Steven pour votre sympathie de tous les jours, désolée pour ces sorties manquées. Un merci également à Nolwenn pour tous ces bons moments partagés dans nos deux bureaux. Bon courage pour la suite à vous et à ceux qui commencent, Adrien, Damien, Nicolas. Je tiens ensuite à remercier particulièrement Bastien, Mélanie et Vincent, merci pour votre amitié de tous les jours. Bastien merci pour tes playlists variées et toutes tes « blagues ». Mon petit Vincent, merci pour toutes tes attentions et pour ce que tu m'auras appris du loto jusqu'aux cours d'Histoire. Mélanie...ou Tic, Dupont, que dire... merci pour tout, merci d'avoir toujours été là au cours de ces trois années, qui je le sais ne sont que le début d'une belle amitié, et surtout, je t'écris « une page » comme promis.

Enfin, je tiens à remercier mes amis pour votre soutien. Une énorme pensée à Manon, quand on voit le chemin que l'on a parcouru... Un grand merci aussi à Fanny, Marion et Nolwenn, merci pour tous vos encouragements et pour nos week-ends qui m'ont toujours permis de recharger les batteries.

Merci également à ma famille, pour m'avoir soutenue et encouragée au cours de ces trois années même si vous ne compreniez pas toujours tout, merci d'avoir compris l'importance que ça représentait pour moi (et pardon pour tous les repas écourtés, je me rattraperai). Un remerciement particulier pour mes trois loulous, vos sourires et vos rires auront été sans aucun doute les meilleures et les plus motivantes des pauses qu'il soit.

Enfin, merci à toi, Damien, merci de m'avoir encouragée à suivre mes choix et de m'avoir soutenue, l'avenir n'en sera que meilleur...

Avant-propos

Le fromage est un aliment très apprécié des consommateurs de nombreux pays du monde et constitue une part importante aussi bien économique que culturelle en France. Il se caractérise par une importante diversité, tant sur le nombre de variétés de fromages existantes que par la diversité microbienne (bactéries, levures et champignons) présente dans le cœur et à la surface du fromage. De nombreuses études se sont intéressées à ces microbiotes. Ces micro-organismes, allant des bactéries lactiques qui permettent l'acidification du lait lors de la première étape jusqu'aux champignons filamenteux qui interviennent lors de l'affinage, ont un rôle crucial dans l'élaboration du produit final et de sa typicité. Au sein de la diversité fongique associée aux fromages, un petit nombre d'espèces sont fréquemment présentes (e.g. *Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti*, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Mucor fuscus*, *Mucor lanceolatus*, *Scopulariopsis flava*, *Bisifusarium domesticum*) et sont associées à des fromages spécifiques. Pourtant si l'association de *Penicillium roqueforti* et *Penicillium camemberti* avec le Roquefort et le Camembert, et leur rôle dans ces produits sont très bien documentés, pour d'autres espèces il existe un manque considérable de données scientifiques, concernant en particulier leur potentiel fonctionnel. C'est le cas de *S. flava*, *Scopulariopsis casei* ou encore *B. domesticum*, espèce qui a fait l'objet de cette thèse. En effet, cette dernière, qui est utilisée volontairement pour des productions de fromages ayant un poids économique notable tels que le Saint-Nectaire, le Reblochon ou encore la Raclette de Savoie, n'a été décrite qu'en 2005 par Bachmann et al. pour sa propriété anti-collante (Bachmann et al., 2003; 2005). Depuis, aucune étude ne s'est intéressée à cette espèce, on peut alors s'interroger quant à sa diversité génétique, sa physiologie, son potentiel technologique, sa production de composés aromatiques ou encore d'extrolites. Cette thèse a ainsi pour vocation de répondre à l'ensemble de ces interrogations et l'organisation de ce manuscrit se déroule en trois grandes parties détaillées ci-après. À noter que certaines de ces études résultent de collaborations nationales et internationales. Ainsi, les séquençages et analyses de génomes ont été réalisés en lien avec le Dr. Jeanne Ropars (chargée de recherche CNRS dans l'équipe de recherche « Génétique et Écologie Évolutives » du laboratoire d'Écologie Systématique Evolution (ESE) de l'Université Paris-Saclay) et ont fait l'objet d'une mobilité d'une semaine. Certaines analyses d'extrolites ont été réalisées par le Pr. Jens C. Frisvad (Technical University of Denmark), tandis que celles des composés volatiles ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Anne Thierry (Sciences et technologie du lait et de l'œuf, INRAE, Rennes).

Tout d'abord, la première partie de ce manuscrit consiste en une introduction générale sous forme de synthèse bibliographique qui s'intéresse notamment aux fromages et à la diversité fongique

associée puis se conclut par une synthèse des connaissances actuelles sur *B. domesticum* avant de présenter les questionnements scientifiques de la thèse.

La seconde partie « Résultats » présente les différentes études réalisées au cours de cette thèse, organisées sous forme de trois grands chapitres. Le chapitre I s'intéresse aux diversités *i)* interspécifique chez les *Nectriaceae* spp. associées aux fromages, qui a conduit à la description de nouvelles espèces fongiques, et *ii)* intraspécifique au sein de *B. domesticum*. Le chapitre II présente quant à lui une étude physiologique menée sur *B. domesticum* mais aussi sur des espèces proches dont celles nouvellement décrites. Le chapitre III retranscrit le potentiel fonctionnel de ces espèces en lien avec le contexte fromager.

Enfin, la troisième partie discute l'ensemble des résultats obtenus au cours de chaque étude et les perspectives envisagées.

Table des matières

Avant-propos	5
Table des matières	7
Abréviations	9
Introduction générale	11
I. Généralités sur les aliments fermentés	13
II. Les fromages	16
II.1. Définitions et origine du fromage	16
II.2. Diversité et classification des fromages	18
II.3. Fabrications fromagères	20
II.3.1. Composition biochimique du lait de vache	20
II.3.2. Procédé de fabrication fromagère : cas général	20
II.3.2.1. La standardisation du lait	21
II.3.2.2. La coagulation du lait et l'égouttage	21
II.3.2.3. Le salage et inoculation de surface	22
II.3.2.4. L'affinage	22
II.3.3. Les fromages à pâte pressée non cuite	23
II.3.4. Les fromages à pâte molle à croûte lavée	24
II.4. Diversité microbienne au sein des fromages	25
III. Les champignons	29
III.1. Définition des champignons	29
III.1.1. Place du règne fongique dans le domaine du vivant et caractérisations	29
III.1.2. Identification des champignons	33
III.2. Les champignons au sein des fromages	35
III.3. Diversité intraspécifique des champignons associés aux fromages	36
III.4. Comportement et rôle des champignons en production fromagère	39
III.4.1. Physiologie des champignons d'intérêt en fromagerie	39
III.4.2. Potentiel métabolique des champignons en production fromagère	41
III.4.2.1. La protéolyse	41
III.4.2.2. La lipolyse	43
III.4.2.3. La production de composés volatils	44
III.4.2.4. La production de métabolites secondaires	47
IV. Le genre <i>Bisifusarium</i> et l'espèce <i>Bisifusarium domesticum</i>	49
IV.1. Taxonomie des <i>Bisifusarium</i> spp.	49
IV.2. Caractéristiques des <i>Bisifusarium</i> spp.	53
IV.2.1. Caractéristiques morphologiques	53
IV.2.2. Caractéristiques physiologiques et métaboliques	55
IV.2.3. Caractéristiques de <i>B. domesticum</i>	56
V. Objectifs des travaux de thèse	58
Résultats	61
Chapitre I : Etude de la diversité inter- et intraspécifique	63
I. Introduction et stratégie expérimentale	63
II. Article publié dans le journal Mycosphere	66
III. Analyse des groupes de gènes orthologues des nouvelles espèces de <i>Nectriaceae</i> associées au fromage	103
III.1. Contexte et objectifs	103
III.2. Approche expérimentale	103

III.2.1. Sélection des isolats <i>Nectriaceae</i> de l'étude	103
III.2.2. Extraction d'ADN et séquençage des génomes	103
III.2.3. Assemblage et annotation des génomes	104
III.2.4. Reconstruction phylogénétique	104
III.2.5. Recherche de protéines communes entre espèces associées aux fromages	105
III.3. Résultats	105
IV. Diversité intraspécifique de <i>B. domesticum</i>	112
IV.1. Contexte et approche expérimentale	112
IV.2. Résultats	112
IV.3. Annexe. Procédure RAPD – ari1	113
V. Résultats majeurs du chapitre I	115
Chapitre II : Etude physiologique	117
I. Introduction et stratégie expérimentale	117
II. Article publié au journal International Journal of Food Microbiology	122
III. Résultats majeurs du chapitre II	144
Chapitre III : Etude fonctionnelle	146
I. Introduction et stratégie expérimentale	146
II. Article en préparation pour soumission au journal Food Microbiology	148
III. Annexe de la publication n°3	188
III.1. Aspects macroscopiques	188
III.2. Analyses complémentaires	190
III.2.1. Évaluation du potentiel de bioprotection de <i>B. domesticum</i>	190
III.2.2. Recherche de production de composés d'intérêts	191
IV. Etude <i>in silico</i> du potentiel mycotoxigénique	193
IV.1. Contexte et approche expérimentale	193
IV.2. Résultats	193
V. Résultats majeurs du chapitre III	196
Discussion générale et perspectives	199
Références bibliographiques	217
Valorisations scientifiques	237

Abréviations

- ***acl1*** Large subunit of the ATP citrate lyase
- ***act*** Alpha-actin
- **ADN** Acide désoxyribonucléique
- **AFM1** Aflatoxine M1
- **ANSES** Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
- **AOC** Appellation d'Origine Contrôlée
- **AOP** Appellation d'Origine Protégée
- **a_w** Activité de l'eau
- **CA** Cheese Agar
- **CBS** CBS-KNAW culture collection, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute
- **CIT** Citrinine
- ***cmdA*** Calmodulin
- **CNIEL** Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière
- **CPA** Acide cyclopiazonique
- **DG18** Dichloran glycerol chloramphenicol selective agar
- **EFSA** European Food Safety Authority
- **FDSC** *Fusarium dimerum* species complex
- **GC-MS** Gaz Chromatography Mass Spectrometry
- **GC-PSR** Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition criterion
- **GRAS** Generally Recognized As Safe
- ***his3*** Histone H3
- **HPLC** High Performance Liquid Chromatography
- **IRTF** Infrarouge à Transformée de Fourier
- **ITS** Internal Transcribed Spacer
- **LC-Q-TOF MS** Liquid Chromatography-Quadrupole-Time of Flight-Mass Spectrometry
- **LIP** Laboratoire Interprofessionnel de Production
- ***LSU*** 28S large subunit
- **M2Lev** Malt yeast extract agar
- **MALDI-TOF** Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight
- **MEA** Malt Extract Agar
- **ML** Maximum Likelihood

- **MNHN** Muséum National d'Histoire Naturelle
- **MPA** Acide mycophénolique
- **NaCl** Chlorure de sodium
- **NGS** Next-Generation Sequencing
- **NRPS** Non-Ribosomal Peptide Synthetase
- **OTA** Ochratoxine A
- **PCR** Polymerase Chain Reaction
- **PDA** Potato Dextrose Agar
- **PEA** Acide pénicillique
- **PKS** Polyketide synthase
- **RAPD** Random Amplified Polymorphic DNA
- **RMN** Résonance Magnétique Nucléaire
- **RNU** Relative Nephelometric Unit
- **ROQ-C** Roquefortine C
- ***rpb1*** RNA polymerase II largest subunit
- ***rpb2*** RNA polymerase II second largest subunit
- **SNP** Single Nucleotide Polymorphisms
- ***tef1*** Translation elongation factor 1-alpha
- **T_{max}** Température maximale
- **T_{min}** Température minimale
- **T_{opt}** Température optimale
- **TPS** Terpene Synthase
- ***tub2*** β -tubulin
- **UBOCC** Université de Bretagne Occidentale Culture Collection
- **μ_{max}** Vitesse de croissance maximale
- **μ_{opt}** Vitesse de croissance optimale
- **YES** Yeast Extract Sucrose

Introduction générale

I. Généralités sur les aliments fermentés

Les aliments fermentés, qu'ils soient d'origine végétale (e.g. vin, bière, olives, choucroute, kombucha, tofu) ou animale (e.g. fromages, produits de salaison), font partie des aliments régulièrement consommés par l'Homme, et ce depuis des milliers d'années (Tamang et al., 2020). Ces aliments se sont diversifiés au cours du temps à tel point qu'à ce jour, il n'existerait pas moins de 5 000 variétés d'aliments et boissons fermentés dans le monde, dont certaines qui seraient communes à différentes zones géographiques et d'autres moins répandues (Tamang et al., 2017). De plus, au sein de chaque type d'aliments fermentés existe une importante diversité de produits. Cette dernière peut s'expliquer notamment par des procédés de standardisations industrielles ou par une volonté de diversification de certaines gammes via une aromatisation du produit par exemple mais elle est surtout intimement liée à des zones géographiques. En effet, les aliments fermentés traditionnels peuvent être très emblématiques d'une région et représenter tout particulièrement un patrimoine culturel qui est à l'image des savoir-faire du terroir qui se transmettent depuis des générations. Cet aspect a, par ailleurs, conduit à la mise en place, pour certains de ces produits, de labels qui témoignent de l'authenticité et du savoir-faire des producteurs (Appellation d'Origine Contrôlée -AOC- puis Appellation d'Origine Protégée -AOP-) ou de la qualité (Label Rouge) de certains aliments fermentés (e.g. fromages, olives, vins). Ainsi, l'AOC, en France, applicable depuis 1990 sur l'ensemble des produits agroalimentaires (anciennement « Appellation d'Origine ») a été remplacée en 2009, à quelques exceptions près, par le terme AOP, à l'échelle européenne. Ce label permet d'assurer le respect d'un cahier des charges précis allant, par exemple dans le cas du fromage, de la collecte du lait jusqu'au produit final, définissant une zone géographique ainsi que des étapes de fabrication qui sont ensuite strictement contrôlées.

Une fermentation fait référence classiquement à un procédé biologique en anaérobiose, impliquant des micro-organismes qui transforment les composants d'une matrice d'origine animale ou végétale, en développant de nouvelles caractéristiques (organoleptiques et fonctionnelles) et en induisant une meilleure conservation. Les aliments fermentés peuvent être définis selon le type de fermentation et/ou leur substrat d'origine. Si l'on considère ce dernier aspect, neuf groupes principaux ont été définis. Ils correspondent aux produits issus de *i)* céréales fermentées, *ii)* légumes et pousses de bambou fermentés, *iii)* légumineuses fermentées, *iv)* racines et tubercules fermentés, *v)* produits laitiers fermentés, *vi)* produits carnés fermentés, *vii)* poissons fermentés séchés et fumés, *viii)* divers substrats fermentés et *ix)* boissons alcoolisées (Tamang et al., 2017). Si l'on considère le type de fermentation, peuvent être citées : les fermentations acétique (e.g. vinaigre), alcoolique (e.g. vin), lactique (e.g. yaourt), malo-lactique (e.g. vin) ou encore propionique (e.g. Emmental).

Historiquement, en plus de l'aspect organoleptique, les fermentations étaient effectuées pour permettre une meilleure conservation de la matière première comme dans le cas du lait transformé en fromage. En effet, les processus biochimiques qui se succèdent au cours de la fermentation induisent une meilleure stabilité du produit qui peut s'expliquer notamment par la diminution du pH, la présence potentielle d'éthanol (et acides organiques) et des interactions biotiques empêchant la colonisation par des espèces microbiennes non souhaitées et potentiellement pathogènes. Avec les connaissances actuelles, les conditions de fermentations ont été optimisées (e.g. température, teneur en sel, activité de l'eau) pour favoriser la croissance de certains micro-organismes ayant des activités métaboliques importantes (Wolfe and Dutton, 2015). Cela a ainsi contribué à l'innovation et la diversification de nombreux produits alimentaires (e.g. développement de gammes de légumes lactofermentés, de kéfirs de fruits, de "yaourts" végétaux, etc. jusqu'alors peu répandus) grâce à leurs propriétés organoleptiques (e.g. arômes, couleurs, saveurs, formes, textures). De plus, ceux-ci pourraient également avoir un intérêt supplémentaire pour le consommateur car ils auraient des qualités nutritionnelles supérieures avec un bénéfice santé (Tamang et al., 2020) les rapprochant alors du domaine de la nutraceutique. En effet, au cours de la fermentation, les micro-organismes sont responsables de transformations biochimiques bénéfiques, produisant des composés d'intérêts (e.g. vitamines, antioxydants, acides organiques) mais aussi améliorant la digestibilité (e.g. dégradation du lactose ou de facteurs antinutritionnels), augmentant la biodisponibilité de certains nutriments ou encore pouvant apporter des propriétés probiotiques au produit (Dimidi et al., 2019; Tamang et al., 2016).

De façon générale, la fermentation est soit spontanée (micro-organismes provenant de la matière première ou de l'environnement de production) soit contrôlée par l'ajout de ferments qui peuvent être directement inoculés ou en utilisant la méthode de *back-slopping* (i.e. utilisation d'une partie de la fermentation précédente pour inoculer le substrat non fermenté). A ce jour, les fermentations spontanées sont toujours pratiquées ; toutefois, à l'échelle industrielle, des ferments, facilement accessibles commercialement, sont plus fréquemment utilisés. Cette méthode offre l'avantage de contrôler plus aisément ces fermentations et de les standardiser d'une série de production à une autre ce qui facilite la fidélisation des consommateurs. Par ailleurs, cela peut également permettre de sélectionner certaines caractéristiques intéressantes d'un micro-organisme telles que la production de composés volatiles, celle d'inhibiteurs microbiens ou encore une réduction du temps de fermentation.

Depuis quelques années, ces aliments très complexes d'un point de vue biochimique et microbiologique font régulièrement l'objet d'études visant à mieux connaître la composition de leur

microbiote mais aussi à comprendre l'impact ou le rôle de chaque micro-organisme au cours de la fermentation, telles que pour la bière (Spitaels et al., 2015; Tyakht et al., 2021), le cidre (Tyakht et al., 2021), le kéfir (Bourrie et al., 2016), le kombucha (Coton et al., 2017 ; Savary et al., 2021b), le vin (Bokulich et al., 2016 ; Liu et al., 2019), le pain au levain (Landis et al., 2021), les olives (Penland et al., 2020) ou encore le fromage (Dugat-Bony et al., 2016; Marino et al., 2019; Wolfe et al., 2014; Yeluri Jonnala et al., 2018). De ce fait, des genres et/ou espèces sont couramment associés à certains aliments fermentés, tels que, à titre d'exemple, les bactéries *Oenococcus oeni* pour les fermentations malolactiques (vin et cidre) et *Propionibacterium* spp. pour certains fromages, les levures *Geotrichum candidum* pour les fromages à croûte fleuries et *Zygosaccharomyces rouxii* pour la sauce soja, les champignons filamenteux *Penicillium roqueforti* pour les fromages à pâtes persillées et *Rhizopus oligosporus* pour la fermentation de tempeh (Tamang et al., 2016). Cependant, bien que certains micro-organismes soient fréquemment associés à certains produits, il existe une importante diversité microbienne (qualitative et quantitative) au sein de chaque type d'aliment fermenté (plus ou moins connue et décrite) qui, par ailleurs, influe directement sur les caractéristiques organoleptiques du produit final. Celle-ci peut s'expliquer par une sélection de ferments, une provenance naturelle de l'environnement de production mais aussi de la composition nutritionnelle de la matière première (qui peut dépendre de l'origine géographique, des conditions d'élevage ou de culture etc.) et de la méthode de production employée (i.e. artisanale, industrielle) (Dimidi et al., 2019 ; Liu et al., 2019).

Parmi les produits fermentés, le fromage est sans doute l'un des aliments les plus étudiés par les microbiologistes, du fait de son poids économique et de sa complexité microbienne, mais aussi un des plus appréciés par les consommateurs du monde entier. Cela s'explique notamment par sa grande diversité qui est telle qu'on ne compterait pas moins de 1500 variétés selon certains articles (Fox et al., 2017). Un chiffre probablement sous-estimé considérant le nombre important de variétés en France estimé à près de 1200 (d'après les chiffres du Centre National Interprofessionnel Laitier, CNIEL). Cette diversité est accompagnée d'une variété en termes de saveurs, de valeurs nutritionnelles, de texture, de formes ou encore de couleurs et est, par ailleurs, étroitement liée aux communautés microbiennes (bactéries, levures, champignons) qui participent à sa fabrication.

II. Les fromages

II.1. Définitions et origine du fromage

Le fromage, largement ancré dans l'alimentation courante, serait apparu, selon la littérature, il y a plus de 8 000 ans dans la région du « Croissant fertile », berceau de la « Révolution agricole » au cours de laquelle, on assiste aux débuts de la domestication des animaux et des plantes (Fox and Guinee, 2020). Des études récentes archéologiques confirment cette consommation historique (1980–1450 avant JC (en Chine) et 1290–1213 avant JC (en Egypte) (Greco et al., 2018; Yang et al., 2014). À présent, les étapes de production fromagère sont très contrôlées, en particulier via l'ajout de ferments, cependant, historiquement, les fermentations se faisaient de manière spontanée. En effet, le lait peut contenir des bactéries capables de transformer le lactose en acide lactique ce qui a pour effet de diminuer son pH et ainsi entraîner sa coagulation permettant ainsi d'obtenir un produit beaucoup plus stable et donc plus transportable que la matière première. Cet avantage aurait alors été adopté par les Romains, notamment lors de leurs déplacements (Fox and Guinee, 2020). La période du Moyen-âge aurait ensuite marqué l'essor des fromages avec l'apparition de nombreux nouveaux types de fromages qui sont encore actuellement très appréciés des consommateurs tels que le Comté, le Gruyère et le Saint-Nectaire. Il est par ailleurs important de souligner le rôle qu'ont joué les monastères dans la fabrication et l'affinage de certains fromages.

Les premières fromageries, dédiées uniquement à cette production, auraient vu le jour en 1851 et 1870 aux Etats-Unis et Angleterre, respectivement (Fox and McSweeney, 2017). A cette époque, les fromages étaient produits de manière artisanale, méthode toujours pratiquée de nos jours mais dont la part de production a largement diminué suite au développement des industries fromagères permettant des productions plus importantes quantitativement. Le fromage est un aliment très répandu puisque selon des chiffres de 2019, la production annuelle européenne de fromages était estimée à près de 11 millions de tonnes, avec une part importante pour la France comptabilisant 1,9 millions de tonnes produites. Les français en seraient également les premiers consommateurs avec en moyenne 26,8 kg par an et par habitant (CNIEL, 2021). Si les fromages ont une importance nutritionnelle, ils sont aussi largement associés à l'identité gastronomique et donc culturelle des pays ou régions de production, d'où leur représentation au sein des produits AOP comme explicité précédemment. A ce jour, la France compte 46 AOP concernant des fromages qui sont devenus emblématiques de leurs régions respectives, tels que le Roquefort qui est d'ailleurs le premier fromage à avoir obtenu son Appellation d'Origine en 1925. On peut également citer le Saint-Nectaire (AOP depuis 1955), le Comté (AOP depuis 1958), le Reblochon (AOP depuis 1958), le Mont d'Or (AOP

depuis 1981), le Camembert de Normandie (AOP depuis 1983) ou encore le Pélardon (AOP depuis 2000) (informations accessibles sur le site des AOP, <https://www.fromages-aop.com/>). L'Europe, quant à elle, compterait parmi ses produits AOP, 212 fromages, et ce chiffre ne cesse d'évoluer (www.ec.europa.eu/agriculture/quality/door/list.html).

Il faut noter également que le terme « fromage » est défini en France dans le cadre législatif par le décret n° 2013-1010 du 12 novembre 2013 modifiant le décret n° 2007-628 du 27 avril 2007 qui indique que :

« La dénomination "fromage" est réservée au produit fermenté ou non, affiné ou non, obtenu à partir des matières d'origine exclusivement laitière suivantes : lait, lait partiellement ou totalement écrémé, crème, matière grasse, babeurre, utilisées seules ou en mélange et coagulées en tout ou en partie avant égouttage ou après élimination partielle de la partie aqueuse. »

« La dénomination "fromage" peut également être utilisée pour tout produit issu de fromages tels que définis à l'alinéa précédent et aux articles 2 et 3, par mélange ou assemblage entre eux ou avec des matières premières laitières mentionnées à l'alinéa précédent, pour autant que ce produit n'incorpore pas d'autres ingrédients que ceux qui sont autorisés dans ces fromages par l'article 10. »

« La teneur minimale en matière sèche du produit ainsi défini doit être de 23 grammes pour 100 grammes de fromage. »

Par ailleurs, on peut noter que ce décret autorise également l'ajout de certains ingrédients dont des *« Cultures de bactéries, de levures et de moisissures dont l'innocuité est démontrée par l'usage ou, pour les nouvelles cultures, évaluée par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail »*

Cette définition générale du fromage peut également être retrouvée dans le Codex Alimentarius (Norme générale pour le fromage, CXS 283-1978) qui précise par ailleurs, la possibilité d'ajout à la dénomination fromage la mention de « pâte extra-dure », « pâte dure », « pâtes ferme/semi-dure », « pâte molle » pour un fromage respectant une teneur en eau dans le fromage dégraissé correspondant à moins de 51 %, 49–56 %, 54–69 % et plus de 67 % respectivement, ou encore, selon l'affinage, la mention « affiné », « affiné aux moisissures », « non affiné/frais » et « en saumure ».

Au cours du temps, les connaissances en production fromagère n'ont cessé de s'enrichir, et ont permis une meilleure maîtrise de certains procédés et une meilleure connaissance des rôles ou implications biochimiques des micro-organismes (bactéries, levures, champignons) qui ont conduit à une optimisation de leur utilisation. Ainsi, certains fromages ont évolué, leur conférant les caractéristiques qu'on leur connaît à ce jour, tandis que d'autres variétés ont été créées récemment tels que les Jarlsberg, Maasdamer ou Dubliner, par exemple (Fox and McSweeney, 2017). Les caractéristiques organoleptiques d'un fromage vont dépendre de divers paramètres qui peuvent intervenir tout au long de son processus de fabrication. Tout d'abord, la principale différence est basée sur le type de lait utilisé et en particulier sa concentration en matière grasse, protéine, calcium et pH (Fox and Guinee, 2020), elles-mêmes dépendant directement de l'animal producteur et de ses conditions d'élevage. Ainsi, on distingue les fromages au lait de vache, qui sont les plus représentés, des fromages au lait de bufflonne (e.g. Mozzarella), de brebis (e.g. Roquefort, Feta, Manchego) et de chèvre (e.g. Pélardon, Rocamadour). Au vu de la grande variété existante, une classification bien plus détaillée a été mise en place (voir partie suivante, II.2.). Celle-ci est principalement basée sur l'agent de coagulation (à base de présure ou reposant sur les bactéries lactiques), la consistance du produit fini (fromages à pâtes molles ou à pâtes dures), le stade de maturation (fromage frais ou affiné), l'impact du microbiote inoculé ou naturellement présents (Fox et al., 2017).

II.2. Diversité et classification des fromages

Au cours du temps les fromages se sont de plus en plus diversifiés. Ainsi, plusieurs propositions de classification se sont succédées sans obtention d'une classification parfaite tant ces procédés peuvent être complexes. Celles-ci se basent sur la texture du fromage, elle-même liée à la teneur en eau, la méthode de coagulation et l'affinage. Comme rapporté par McSweeney et al., 2017, une classification basée sur la texture du fromage avait déjà été proposée en 1952 (Schulz, 1952) avec des taux qui varient légèrement de ceux cités précédemment provenant du Codex Alimentarius (voir partie II.1.). Il était également proposé des sous-groupes pour chaque catégorie, basés sur la mention de « pâte cuite » ou « pâte pressée » mais aussi en fonction de la teneur en calcium et l'acidification. Comme souligné par McSweeney et al. (2017), la coagulation du lait est une étape des plus importante pour la fabrication du fromage et celle-ci peut être induite par trois mécanismes différents. Ainsi, une classification reposant sur ce paramètre, c'est-à-dire selon l'utilisation de présure (coagulation enzymatique), de bactéries lactiques (coagulation dite acide) ou ajout d'une étape de chauffage, pourrait être d'intérêt. McSweeney et al. (2017) ont recensé divers schémas proposés au cours du temps, certains étant basés principalement sur la méthode de coagulation puis divergeant avec la prise

en compte ou non de certains paramètres tandis que d'autres se basent sur l'indice d'affinage. On peut par ailleurs citer la classification proposée par Ottogalli (2000) distinguant les fromages en huit classes elles-mêmes séparées en fonction de la matrice de départ : lait, lactosérum, crème, beurre ou colostrum et prenant en compte des paramètres techniques, chimiques, microbiologiques et organoleptiques (voir Table 31.7 dans McSweeney et al., 2017). Avec l'existence d'une telle diversité, les classifications, aussi complètes soient-elles, reposent sur certains paramètres et regroupent parfois ensemble des fromages très différents en termes de flaveur ou d'aspect (e.g. pas de distinction entre fromages au lait de vache et brebis, ou encore la Raclette qui présente des petits trous pourraient être placée avec les fromages ayant des « yeux » autant que dans les pâtes pressées) ce qui explique qu'aucune classification ne soit totalement parfaite et approuvée de tous. Cependant, parmi les classifications les plus couramment utilisées, on peut citer celle proposée par McSweeney et al., 2017, dans laquelle on retrouve les grandes familles, classées en premier lieu selon leur type d'affinage bactérien (pâte extra-dure, pâte dure, pâte semi dure, pâte présentant des yeux, fromages très salés, à pâte filante), fongique (en surface pour les fromages à croûte fleurie ou interne pour les fromages à pâte persillée), ou en surface.

Plus communément, le consommateur peut identifier les différents types de fromages selon les dénominations suivantes (CNIEL, 2021b) :

- **Les fromages frais et fromages blancs** (fromages non affinés)
- **Les fromages à pâtes molles à croûte fleurie** (e.g. *Brie de Melun AOP, Camembert de Normandie AOP, Neufchâtel AOP*)
- **Les fromages à pâtes molles à croûtes lavées** dont sept AOP françaises (i.e. *Epoisses, Langres, Livarot, Pont-l'Évêque, Maroilles, Mont-d'Or ou Vacherin du haut Doubs et Munster-géromé*)
- **Les fromages à pâtes persillées** dont sept AOP françaises (e.g. *Roquefort, Bleu d'Auvergne et Fourme d'Ambert*)
- **Les fromages pâtes pressées cuites** (e.g. *Comté et Abondance*)
- **Les fromages à pâtes pressées non cuites** dont neuf AOP françaises (e.g. *Reblochon, Saint-Nectaire et Morbier*)
- **Les fromages de chèvres** dont quatorze AOP françaises (e.g. *Chevrotin, Charolais et Pélardon*)
- **Les fromages fondus et spécialités fromagères fondues** définis dans le décret n° 2013-1010 (e.g. *cubes pour l'apéritif, fromages à tartiner*)

II.3. Fabrications fromagères

II.3.1. Composition biochimique du lait de vache

La composition biochimique du lait varie selon l'animal considéré (e.g. vache, bufflonne, chèvre, brebis) et ses conditions d'élevage. D'un point de vue général, un litre de lait de vache est composé à 86,6 % d'eau, 4,9 % de lactose, 4,6 % de matières grasses, 3,4 % de protéines et, en moindre quantité, de minéraux (tels que calcium et phosphate) et de vitamines (Kailasapathy, 2016). Tandis que la fraction protéique est majoritairement représentée par les caséines, la matière grasse laitière est quant à elle composée à 95% de triglycérides mais peut également être composée d'acides gras tels que les acides palmitique, oléique, tétradécanoïque, stéarique ou encore butyrique. Enfin, le pH du lait de vache est de l'ordre de 6,6. (Kailasapathy, 2016). Cette composition du lait conditionne ensuite, en partie, celle du fromage. D'une part, la matière grasse présente dans le fromage influe sur la texture de ce dernier en le rendant plus souple et surtout joue un rôle majeur au niveau des propriétés gustatives. En effet, elle permet de conserver certaines molécules aromatiques liposolubles ce qui va également favoriser certaines réactions et enfin, sous forme de triglycérides, elle est le précurseur de plusieurs composés volatiles importants issus de la lipolyse. Cette dernière, tout comme la protéolyse, fait partie des voies métaboliques importantes qui se déroulent au cours de la fabrication du fromage et fait par ailleurs intervenir certains micro-organismes parmi lesquels on retrouve les champignons (e.g. *P. roqueforti* dans les bleus et *P. camemberti* pour le Camembert) (voir partie III.4.2.).

II.3.2. Procédé de fabrication fromagère : cas général

Malgré la multitude de variétés de fromages existants, on peut considérer que leur production suit un schéma global dont les variations conduisent à chaque catégorie de fromages, allant des pâtes pressées aux pâtes persillées en passant par les pâtes molles (**Figure 1**). Ces étapes sont présentées de façon générale ci-après, toutefois, il est important de souligner que selon la variété de fromage, des différences, propres à chaque fromage, non présentées ci-après peuvent être rencontrées.

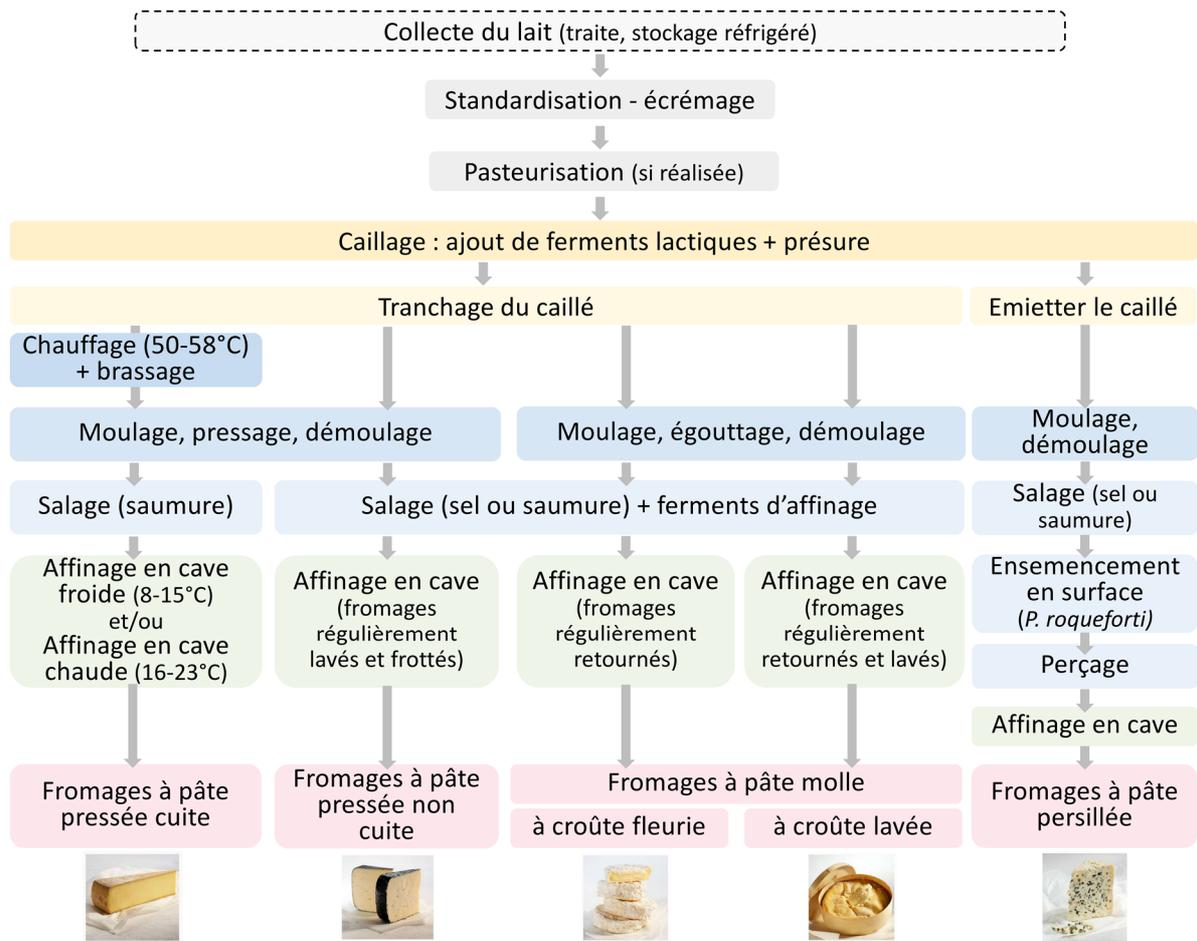


Figure 1 : Processus simplifié du schéma de production fromagère des différentes familles de fromage. Schéma basé sur les informations de Fox and Guinee (2020); Legg et al. (2017) et du site <https://www.filiere-laitiere.fr/fr/fromages>. Les photos des fromages sont issues de ce même site internet.

II.3.2.1. La standardisation du lait

Brièvement, la première étape de la transformation du lait en fromage, effectuée après la collecte du lait (e.g. vache, bufflonne, brebis ou chèvre), consiste à réaliser sa standardisation afin d'ajuster le ratio matière grasse/protéines (e.g. écrémage par centrifugation ou ultrafiltration) (Fox and Guinee, 2020; Legg et al., 2017). Une augmentation du taux de calcium peut également être effectuée afin de favoriser la coagulation du lait qui se déroule à l'étape suivante (Fox and Guinee, 2020).

II.3.2.2. La coagulation du lait et l'égouttage

La coagulation du lait, également appelée le caillage, est l'une des étapes les plus importantes dans la production fromagère car elle marque la transformation du lait de son état liquide en une matrice gélifiée semi-solide, appelée "caillé", grâce à une coagulation des protéines du lait, les

caséines. Bien que le lait possède naturellement des enzymes protéolytiques qui pourraient permettre la coagulation du lait sous certaines conditions, celle-ci est principalement induite par l'ajout d'une présure (utilisée dans 75% des productions), et éventuellement des ferments lactiques ajoutés pour acidifier le lait. Historiquement, la présure provenait de la caillette de veau qui contient de la chymosine et de la pepsine. Toutefois, de nos jours, des alternatives d'origines végétales ou mêmes fongiques (e.g. *Mucor meihei*) se sont développées (Fox and Guinee, 2020; Legg et al., 2017).

Au cours de la coagulation du lait, un réseau de micelles se forme et lorsque celui-ci est déstabilisé, une synérèse a lieu et la phase liquide, appelée "lactosérum", est expulsée du caillé. Ce dernier se concentre alors en matière grasse tandis que le lactosérum contient majoritairement du lactose et des protéines (Fox and Guinee, 2020). Cette étape d'égouttage peut se dérouler naturellement et progressivement mais est généralement accélérée par certains procédés tels que la centrifugation, le tranchage, le pressage ou encore une étape de chauffage (Legg et al., 2017).

II.3.2.3. Le salage et inoculation de surface

Le taux de sel est ajusté dans la plupart des fromages, celui-ci pouvant favoriser l'égouttage et influencer les caractéristiques du produit fini (e.g. flaveur, pH, taux d'humidité, développement microbien). Le salage peut être effectué en immergeant le fromage dans un bain de saumure salée (19–21 % NaCl, pH 5,2–5,3, 10–14°C) pendant un temps défini (salage par immersion) ou bien le sel peut être saupoudré ou frotté directement en surface (salage à sec) (Fox and Guinee, 2020; Legg et al., 2017). Au cours de cette étape, pour certains fromages, des champignons peuvent également être inoculés en surface, tels que *P. camemberti* pour la production de Camembert ou *P. roqueforti* pour les fromages à pâte persillée. Le taux de sel est ainsi un paramètre important à prendre en compte pour une croissance optimale des micro-organismes d'affinage et obtenir le produit souhaité. En effet, par exemple, pour la production de Camembert, un taux trop faible peut induire une croissance excessive de *G. candidum* (et une activité plus importante) ce qui ensuite limite celle de *P. camemberti* (Dugat-Bony et al., 2019; Spinnler, 2017).

II.3.2.4. L'affinage

Enfin, l'affinage est l'une des étapes les plus importantes dans la fabrication du fromage car elle lui confère certaines caractéristiques finales qui participent à la typicité du produit final. Tout d'abord, en fonction du temps d'affinage, qui peut aller de trois semaines à deux ans, l'aspect, la texture, les saveurs et les arômes du fromage varient. Plus un fromage est affiné, plus il est asséché et donc plus salé, avec un goût plus prononcé (Fox and Guinee, 2020). Le second facteur primordial

intervenant dans l'affinage n'est autre que l'implication des micro-organismes d'affinage qui peuvent être ajoutés volontairement (e.g. *P. roqueforti*) ou se développer de façon spontanée (e.g. *Mucor fuscus*). Par ailleurs, l'activité de l'eau (a_w), la température, le pH, le taux de NaCl ou encore les échanges gazeux sont des paramètres qui vont avoir un effet direct sur la croissance de ces derniers (Fox and Guinee, 2020; Monnet et al., 2015). En effet, au moment de l'affinage, un biofilm complexe va se développer, appelé communément croûte et composé de bactéries, levures voire champignons filamenteux. Il existe par ailleurs des gradients d'oxygène, de sel et de pH entre la surface du fromage et son cœur anaérobie. De ce fait, une distinction peut être notée entre le microbiote retrouvé au cœur du fromage et le microbiote de surface, les groupes microbiens représentés étant différents. A noter que trois types de croûtes peuvent être distinguées (**Figure 2**), chacune présentant des aspects et microbiotes différents, à savoir les croûtes fleuries pour lesquelles *P. camemberti* et *G. candidum* sont inoculées, les croûtes naturelles abritant une diversité fongique mixte et les croûtes lavées (Wolfe et al., 2014).



Figure 2 : Aspect macroscopique de coupes de fromage (A) à croûte fleurie, (B) à croûte naturelle, (C) à croûte lavée. Figure de l'étude de Wolfe et al., 2014.

Dans le contexte de cette thèse qui s'intéresse à *B. domesticum*, des études ayant indiqué sa présence sur des fromages à pâte pressée, cuites et non cuites, à croûte naturelle mais aussi sur des fromages à pâtes molles à croûtes lavées, seules ces deux dernières typologies de fromage seront décrites dans la suite de ce document.

II.3.3. Les fromages à pâte pressée non cuite

Pour la production des fromages à pâte pressée non cuite, les mêmes étapes que celles détaillées précédemment sont réalisées avec cependant un changement majeur au moment de l'égouttage. En effet, le fromage, au stade de caillé, est moulé et pressé avec une intensité plus ou moins importante puis il est démoulé, salé et affiné comme détaillé précédemment. De plus, au sein de cette typologie de fromages, certains peuvent être régulièrement retournés et brossés au cours de

l'affinage (e.g. Saint-Nectaire, Raclette). Ces manipulations répétées sur ce type de fromages peuvent parfois engendrer une morge collante. Pour contrer cet effet, certains industriels ont recours à l'inoculation de *B. domesticum* aux propriétés "anticollant". En effet, il a été démontré que cette espèce, retrouvée spontanément sur certains fromages, dont les fromages à pâte pressée non cuite, induit, lorsqu'elle est ajoutée dans l'eau de lavage, un assèchement de la surface du fromage et ainsi permet la prévention d'une formation d'un aspect collant (Bachmann et al., 2003). Cette même espèce est également préconisée pour la production de fromages tels que le Saint-Nectaire et Reblochon permettant un aspect blanc duveteux et participe donc aux critères organoleptiques attendus pour ce type de production (Fiches de spécifications Danisco).

II.3.4. Les fromages à pâte molle à croûte lavée

Tandis que les fromages à pâte molle à croûte fleurie (e.g. Camembert, Brie) présentent un aspect blanc duveteux (dû à *P. camemberti* et *G. candidum*), les fromages à pâte molle à croûte lavée (e.g. Mont d'Or, Maroilles) ont, quant à eux, un aspect lisse et brillant avec des teintes jaunes orangées. La particularité de ces derniers repose sur l'étape de lavage effectuée au moment de l'affinage. Les fromages sont placés dans une cave d'affinage avec une hygrométrie et une température contrôlée et adaptée selon les fromages, en respect du cahier des charges concernant les AOP (e.g. 90-95 %, 10-15°C). Enfin, les fromages sont régulièrement retournés, frottés, lavés et brossés avec une saumure salée. Ces étapes de lavage permettent une croissance homogène des micro-organismes sur toute la surface du fromage tout en favorisant une production de composés aromatiques supérieure à celle des autres types de fromages (Wolfe et al., 2014). Par ailleurs, il est courant que les solutions de lavage soient supplémentées avec des micro-organismes. À titre d'exemple, *Brevibacterium linens* peut être ajoutée pour une coloration orangée du fromage et pourrait participer au développement de certains arômes (Fox et al., 2017). Enfin, si l'inoculation de *B. domesticum* est connue pour les fromages à pâte pressée non cuite présentant des croûtes emmorgées, la présence de cette espèce a également été largement mise en évidence dans cette typologie de fromage (Dugat-Bony et al., 2016; Wolfe et al., 2014).

Ainsi, il est intéressant de noter que cette étape de lavage et brossage engendre un environnement qui peut être stressant pour de nombreux micro-organismes qui voient ainsi leur développement impacté par la répétition de ces opérations. Ceci explique qu'ils abritent moins de champignons filamenteux que les autres fromages à l'exception de *B. domesticum*, qui lui semble mieux résister à ce processus. Cette particularité de *B. domesticum*, selon B. Wolfe (webinar Wolfe,

2018, accessible au lien suivant : <https://www.youtube.com/watch?v=LgOsYpTve08>), pourrait s'expliquer par son développement en s'enfonçant dans le fromage lui permettant ainsi de résister à chaque lavage en continuant ensuite à se développer en surface et favoriserait, par ailleurs, la stabilité de la croûte. En ce sens, il peut être noté qu'une présence de *B. domesticum* a été identifiée à la fois en surface mais aussi au cœur de certains fromages (e.g. Livarot et Saint-Nectaire) (Dugat-Bony et al., 2016).

II.4. Diversité microbienne au sein des fromages

Comme indiqué précédemment, les micro-organismes sont centraux pour la production des fromages. Ces derniers abritent ainsi, entre cœur et surface, une importante diversité de communautés microbiennes composées de bactéries, de levures voire de champignons filamenteux. Cela a été étudié de longue date, par des approches culture-dépendantes et/ou -indépendantes, du fait de l'importance économique et culturelle des fromages. Si les bactéries associées à cette matrice ont été largement étudiées, la part fongique, et plus particulièrement les moisissures, a bénéficié de moins d'attention à quelques exceptions près (e.g. *P. roqueforti*, *P. camemberti*). Dans le cadre de cette introduction bibliographique, nous nous concentrerons uniquement sur la part fongique du microbiote fromager.

L'avènement des techniques de séquençage massif a permis d'apporter des connaissances fines des microbiotes associés aux fromages et de leurs rôles via les approches de métagénomique/métatranscriptomique mais aussi de métatranscriptomique (Dugat-Bony et al., 2015; Monnet et al., 2016; Yeluri Jonnala et al., 2018). Parmi ces études, on peut notamment citer une étude métagénomique de grande envergure menée sur 137 croûtes de fromages provenant de dix pays différents (61 fromages à croûte lavée, 24 à croûte fleurie et 52 à croûte naturelle) (Wolfe et al., 2014). Celle-ci a mis en évidence quatorze genres bactériens (e.g. *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Halomonas*) et dix genres fongiques majoritairement retrouvés dans les fromages étudiés (abondance > 1%), à savoir : *Acremonium*, *Aspergillus*, *Candida*, *Chrysosporium*, *Debaryomyces*, *Fusarium*, *Galactomyces*, *Penicillium*, *Scopulariopsis* et *Sporendonema* (**Figure 3** et **Tableau 1**) et dans une moindre mesure certains genres connus des fromages tels que *Kluyveromyces*, *Mucor* et *Yarrowia*. De plus, parmi ces espèces, 25% n'auraient pas été apportées par l'utilisation de ferments ce qui reflète des croissances spontanées communément retrouvées. Il est intéressant de noter, que le genre *Fusarium* a une fréquence d'occurrence de 19,1 % avec la mention d'ajout en tant que ferments (sans précision de l'espèce dans cet article), on peut alors raisonnablement penser qu'il s'agit de *B. domesticum*. Ceci semble en accord avec les propos de B. Wolfe (webinar Wolfe, 2018) citant celui-ci

dans les fromages Cardo (lait de chèvre, UK), “Twig washed wheel” (lait de chèvre, USA) et Manigodine (lait de vache, France). Une revue de la littérature, concordante avec cette dernière étude, a recensé la diversité microbienne identifiée par des études antérieures (entre 1997 et 2014, 32 études) utilisant les méthodes culture-dépendantes ou -indépendantes et, menées sur des fromages très différents pouvant être à croûte fleurie, à croûte lavée, des pâtes pressées non cuites, des pâtes pressées cuites ou encore persillées (Irlinger et al., 2015). Enfin une troisième étude d’intérêt dans le contexte de la thèse, s’est particulièrement intéressée à la diversité microbienne présente parmi 60 échantillons de fromages correspondant à douze variétés de fromages français dont neuf étaient à croûte lavée (i.e. Maroilles, Soumaintrain, Epoisses, Langres, Munster, Pont l’Evêque, Livarot, Mont d’Or, Abbaye de Cîteaux) et trois à croûte naturelle (i.e. Saint-Marcellin, Reblochon et Saint-Nectaire) (Dugat-Bony et al., 2016). Parmi les espèces fongiques identifiées dans ces fromages, ont été majoritairement retrouvés *G. candidum* et *Debaryomyces hansenii* puis, dans une moindre mesure, les genres *Candida*, *Mucor*, *Penicillium* ou encore les espèces *Yarrowia lipolytica* et *B. domesticum*. Cette dernière était particulièrement retrouvée dans le Saint-Nectaire (croûte et coeur) et Reblochon mais aussi dans des fromages à pâte molle à croûte lavée (e.g. Livarot, Epoisses, Mont d’Or) révélant encore une fois une capacité de croissance sur des matrices fromagères variées. D’autre part, s’il est connu que *B. domesticum* peut être inoculée volontairement, celle-ci peut également se développer spontanément sur la surface du fromage. De plus, lors d’une étude ayant mis en évidence sa présence sur certains fromages, il a été noté que cette espèce n’était pas présente dans le lait utilisé pour sa fabrication (Lavoie et al., 2012) ce qui renforce cette caractéristique d’association exclusive au fromage tandis que le réservoir naturel de cette espèce reste inconnu à ce jour.

De façon intéressante, ces études ont mis en évidence que certains genres ou espèces sont très majoritairement représentés tels les espèces *Penicillium* spp., *D. hansenii* et *G. candidum* qui semblent très fréquentes et abondantes au sein des fromages (**Tableau 2**). D’autre part, bien que certaines espèces sont communes à plusieurs variétés de fromages, les microbiomes varient aussi bien en termes qualitatifs que quantitatifs créant ainsi des profils distincts avec, également, des distinctions entre croûte et coeur (Dugat-Bony et al., 2016) mais aussi au cours de l’affinage (Penland et al., 2021). De plus, cette diversité est principalement liée au type de croûte (naturelle, fleurie ou lavée), à la texture interne et aux facteurs abiotiques correspondants (e.g. taux d’humidité, pH et concentration en NaCl) (Wolfe et al., 2014). Cette diversité est d’autant plus intéressante que l’on sait qu’elle conditionne les caractéristiques finales des fromages (e.g. texture interne, consistance de la croûte, production des composés volatiles) notamment car certaines espèces microbiennes sont connues pour leur implication dans certaines voies métaboliques qui seront détaillées dans la partie suivante. En ce sens, certaines espèces ont fait l’objet de diverses études et tout particulièrement les deux espèces

emblématiques du Camembert et du Roquefort respectivement, *P. camemberti* et *P. roqueforti* qui ont été très étudiées au niveau génétique, physiologique et fonctionnel en lien avec le fromage (e.g. activité protéolytique, lipolytique, production de composés volatiles). A l'inverse, d'autres espèces ont été, jusqu'à présent, très peu voire pas étudiées telles que *B. domesticum*, *M. lanceolatus*, *M. fuscus* et *Scopulariopsis spp.* alors que celles-ci sont associées à des fromages ayant un poids économique notable, respectivement associées au Saint-Nectaire (première AOP fromagère fermière Européenne au niveau des ventes), Reblochon, Tomme de Savoie, et Ossau-Iraty (**Tableau 2**).

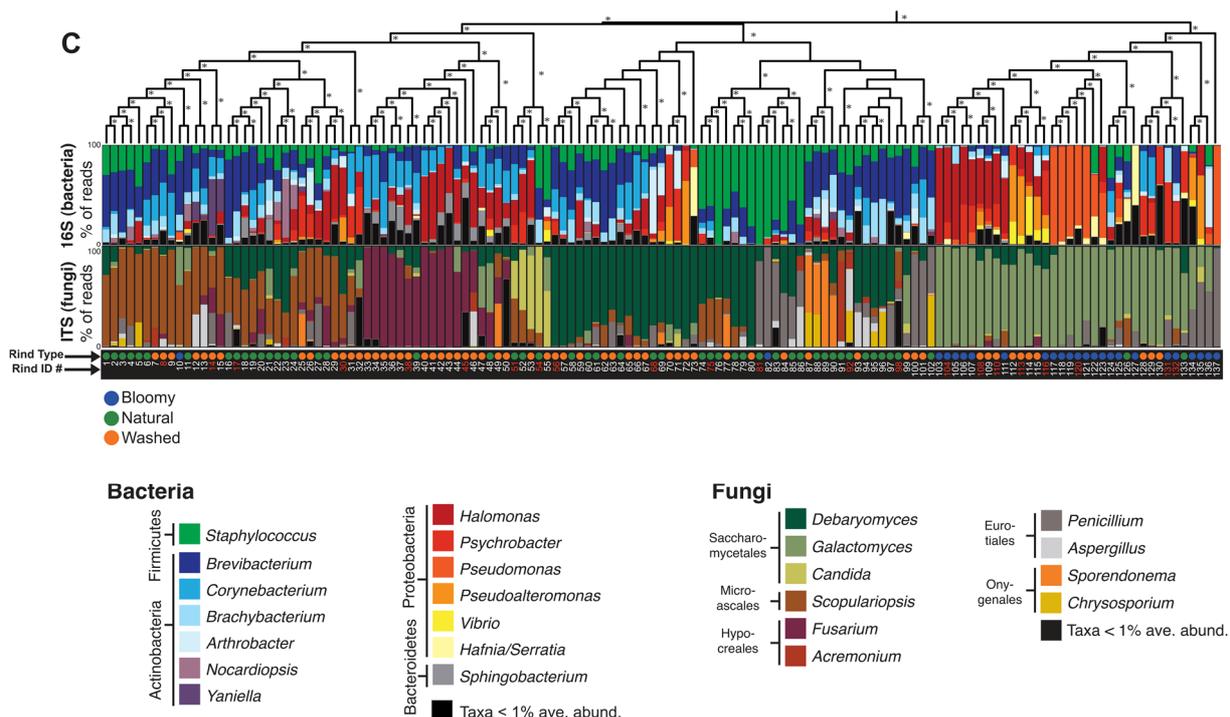


Figure 3 : Composition microbienne et mise en évidence d'abondances relatives des genres bactériens et fongiques présents au sein de 137 échantillons de fromages. Chaque colonne représente un échantillon de fromage à croûte fleurie (point bleu), à croûte naturelle (point vert), et à croûte lavée (point orange). Figure et études de Wolfe et al., 2014.

Tableau 1 : Genres fongiques majoritairement retrouvés dans l'analyse de 137 échantillons de fromages. Résultats issus de l'étude de Wolfe et al., 2014.

Genre	Abondance	Fréquence	Principal type de croûte
<i>Debaryomyces</i>	24,6	56,4	naturelle
<i>Galactomyces</i>	23,1	35,4	fleurie
<i>Scopulariopsis</i>	18,2	42,5	naturelle
<i>Fusarium</i>	10,7	19,1	lavée
<i>Penicillium</i>	9,3	30,4	fleurie
<i>Candida</i>	3,3	14,6	naturelle
<i>Aspergillus</i>	2,4	14,9	naturelle
<i>Sporendonema</i>	2,3	4,1	naturelle/lavée
<i>Chrysosporium</i>	1,9	6,9	naturelle
<i>Acremonium</i>	1,3	6,6	naturelle

Tableau 2 : Volume des ventes de fromages AOP en France en 2019 et les espèces fongiques associées à ces fromages. Les volumes des ventes sont issus du rapport 2020 mené par l'INAO et le CNAOL, les chiffres indiqués entre parenthèses correspondent à la part des fromages fermiers.

*espèces fongiques selon les études suivantes : Dugat-Bony et al., 2016; Irlinger et al., 2015; Irlinger and Monnet, 2021; Morin-Sardin et al., 2016; Penland et al., 2021; Ropars et al., 2012

**Fromages IGP

	Tonnes vendues en 2019	Espèces fongiques associées*
Fromages AOP au lait de vache	178 148	
Fromage à pâtes persillées	13 127	
Bleu d'Auvergne	5240 (75)	<i>P. roqueforti</i>
Fourme d'Ambert	5900 (108)	<i>P. roqueforti</i>
Fromage à pâtes pressées cuites	70 624	
Abondance	3244 (805)	
Comté	62 220	
Fromage à pâtes pressées non cuites	56 548	
Raclette de Savoie**	3 257 (19)	<i>B. domesticum</i>
Reblochon	15 934 (2 061)	<i>B. domesticum, Candida sp., D. hansenii, G. candidum, M. lanceolatus, P. commune, Y. lipolytica</i>
Saint-Nectaire	14 367 (7 971)	<i>B. domesticum, D. hansenii, G. candidum, M. lanceolatus, M. racemosus, P. commune, Y. lipolytica,</i>
Salers	1 244	<i>Candida sp., Debaryomyces sp., Rhodoturala sp., Sporendonema casei</i>
Tomme de Savoie**	6 393 (3 280)	<i>M. lanceolatus</i>
Fromage à pâtes molles	37 849	
Brie de Meaux	6 499	<i>P. camemberti</i>
Camembert de Normandie	5 994	<i>P. camemberti</i>
Epoisses	1 404	<i>B. domesticum, D. hansenii, G. candidum, Kluyveromyces lactis, Y. lipolytica</i>
Langres	691	<i>D. hansenii, G. candidum, Y. lipolytica, Kluyveromyces lactis</i>
Livarot	865	<i>B. domesticum, D. hansenii, G. candidum, Kluyveromyces sp., P. commune</i>
Mont d'Or	5 707	<i>D. hansenii, G. candidum, P. commune, B. domesticum, Y. lipolytica</i>
Fromage AOP au lait de brebis	21 465	
Ossau-Iraty	4 984 (591)	<i>Scopulariopsis spp.</i>
Roquefort	16 212	<i>P. roqueforti</i>
Fromage AOP au lait de chèvre	7 152	
Pélardon	260 (164)	<i>D. hansenii, G. candidum, P. commune, S. brevicaulis</i>
Rigotte de Condrieu	74 (25)	<i>P. camemberti</i>

Dans ce contexte, on considère que les moisissures peuvent avoir un rôle soit “technologique”, contribuant aux caractéristiques organoleptiques recherchées des fromages, soit d'altération, affectant lesdites qualités organoleptiques (e.g. coloration, changement de texture) ou présentant un risque sanitaire pour le consommateur (e.g. production de mycotoxines), et pouvant donc avoir un impact économique négatif. Les champignons d'intérêt peuvent être soit ajoutés volontairement durant la fabrication (e.g. cultures d'affinage, *P. camemberti* pour la production de Camembert et Brie)

soit se développer de façon spontanée ; pouvant provenir du lait, de la présure, du sel, ou même via les manipulations du fromager (e.g. salage, affinage, brossage à la main) ou encore par l'environnement fromager (e.g. air environnant, eaux de lavages, saumures, instruments) (Cotter and Beresford, 2017). L'implantation de certaines espèces est influencée positivement ou négativement par le processus utilisé et les paramètres associés ainsi que par les propriétés physico-chimiques du fromage (e.g. température et hygrométrie de la cave, composition de la saumure, pH, activité de l'eau) (Mounier et al., 2017). Il est à noter qu'une espèce fongique n'est pas toujours strictement associée à une de ces deux catégories, comme par exemple, *P. roqueforti* qui, s'il est utilisé en tant que champignon technologique pour la production de fromages à pâtes persillées, il est aussi un contaminant indésirable du Gruyère râpé, même s'il faut noter que dans ce dernier cas, souches technologiques et souches contaminantes appartiendraient à des groupes génétiques différents (Dumas et al., 2020).

Ainsi, les moisissures d'intérêt (e.g. *P. camemberti*, *P. roqueforti*), qu'elles aient été inoculés ou issus d'une croissance spontanée, constituent une part importante du microbiome de certains fromages et participent activement à leur production (voir partie III.4.2.).

III. Les champignons

III.1. Définition des champignons

III.1.1. Place du règne fongique dans le domaine du vivant et caractérisations

Les organismes du vivant se répartissent en trois domaines que sont les archées (*Archaea*), les bactéries (*Bacteria*) et les eucaryotes (*Eukarya*). Parmi ces derniers et plus particulièrement au sein du groupe des opisthokontes (*Opisthokonta*), est retrouvé le règne des champignons (*Fungi*) au même titre que les animaux (Burki et al., 2020) (**Figure 4**).

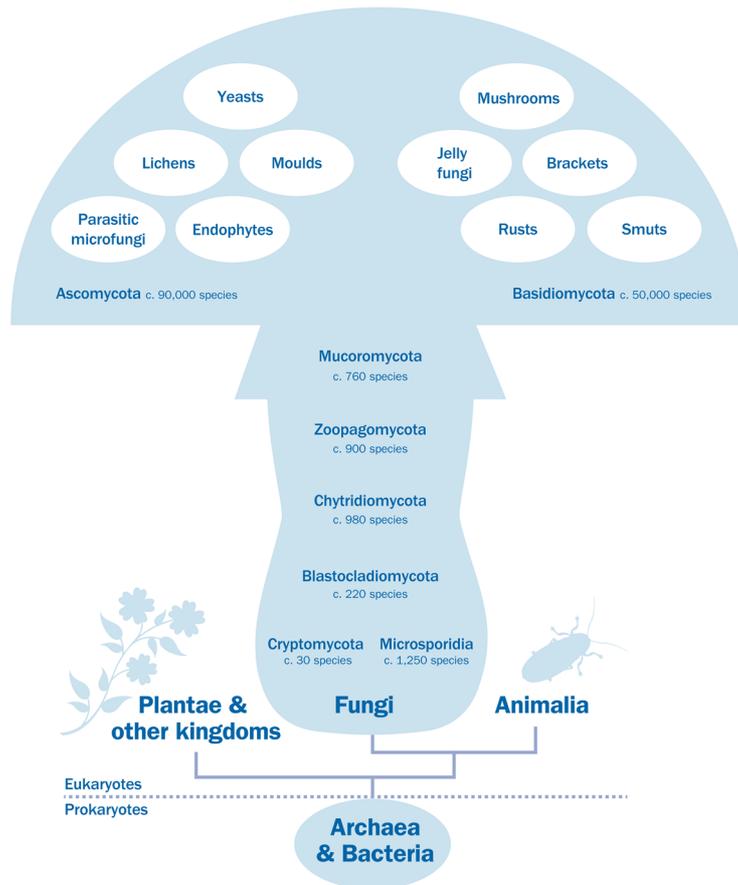


Figure 4 : Le règne des Fungi au sein du monde du vivant. Figure tirée de Willis, 2018

Le règne des *Fungi* abrite à ce jour une importante diversité d'espèces qui peuvent coloniser divers habitats allant du champ de blé jusqu'à l'assiette, associées à des matrices alimentaires variées en passant par le monde marin incluant glaciers, profondeurs, sédiments et environnements extrêmes (Naranjo-Ortiz and Gabaldón, 2019). La connaissance de l'étendue de cette diversité existante ne cesse de s'enrichir au cours des années. En effet, comme relaté par Hawksworth and Lücking (2017), on estimerait, depuis 2010, sur la base des données de Index Fungorum, la description d'approximativement 1 800 nouvelles espèces chaque année, portant à ce jour le nombre d'espèces fongiques décrites à plus de 146 000 (Catalogue of Life (<http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/>)). Un chiffre qui, par ailleurs, serait en deçà de la diversité réelle d'après une estimation bien plus importante allant de 2,2 jusqu'à 3,8 millions d'espèces fongiques (Hawksworth and Lücking, 2017). Cette importante diversité nécessite une classification claire et universelle, reposant sur des données génétiques, que l'on appelle classification taxonomique. Ainsi, le règne des *Fungi* est organisé en : Phylum - Classes - Ordres - Familles - Genres - Espèces. Par ailleurs, avec le perfectionnement des outils de biologie moléculaire et la description continuelle de nouvelles espèces, la classification du règne *Fungi*, a constamment été modifiée, au même titre que la taxonomie de certaines espèces ou genres

fongiques (Cavalier-Smith, 2001), et diverses études tentent de définir ce règne (Richards et al., 2017; Ruggiero et al., 2015). La classification couramment utilisée jusqu'aux années 2000 divisait le règne des *Fungi* en quatre divisions, également appelées phylums, que sont les *Ascomycota* (Ascomycetes), *Basidiomycota* (Basidiomycetes), *Chytridiomycota* (Chytridiomycetes) et *Zygomycota* (Zygomycetes) (Spatafora et al., 2017) (**Figure 5**) tandis que de plus récentes études font référence à 7 à 12 divisions (James et al., 2020; Naranjo-Ortiz and Gabaldón, 2019). Plus largement, le règne fongique peut également être découpé en sous-règne avec notamment les *Dikarya* qui comportent le plus de diversité (i.e. 97 % des espèces fongiques décrites) représenté par les phylums *Ascomycota* (> 92 000 espèces) et *Basidiomycota* (> 50 000 espèces) (James et al., 2020; Spatafora et al., 2017). Ces derniers constituent, par ailleurs, avec les *Mucoromycota*, les champignons les plus étudiés et retrouvés en agro-alimentaire. S'il n'y a aucune vraie synapomorphie chez les *Fungi*, Cavalier-Smith (2001) a mis en avant pour définir ce phylum un scénario de transition évolutive des protistes vers les *Fungi*. Celui-ci implique *i*) la perte du caractère de phagotrophie (acquisition des nutriments sous une forme particulière ou massive, c'est à dire non dissoute) corrélé au développement de l'osmotrophie (acquisition de nutriments sous une forme dissoute) et, *ii*) l'émergence d'un mode particulier de synthèse de la paroi cellulaire couplé à une croissance polarisée apicale. Au sein du règne fongique, trois modes de vie peuvent être identifiés. Tout d'abord les saprophytes, c'est-à-dire des champignons qui se nourrissent à partir de matières organiques dites en décomposition, les parasites qui vont utiliser les tissus de plantes par exemple ou encore ceux qui fonctionnent en symbiose mutualiste avec des bénéfiques pour chacun des organismes concernés avec les exemples bien connus endo- et ectomycorhizes et des lichens. Ces différences peuvent, en partie, expliquer le fait que certaines espèces participent bénéfiquement à certains processus, tandis que d'autres peuvent aussi être considérées comme phyto-pathogènes ou induisent certaines pathologies chez l'Homme, avec dans tous les cas, la possibilité qu'une espèce soit associée à plus d'une niche (e.g. *Fusarium oxysporum* est à la fois un saprotrophe, un parasite végétal et un parasite animal). D'autre part, la dispersion des champignons dans l'environnement peut se faire par reproduction sexuée (stade téléomorphe) et cela de façon différente selon le phylum. Ainsi, les *Ascomycota*, qui représentent les champignons d'intérêt de cette thèse, produisent des spores dites "sexuées", nommées ascospores, dans des structures reproductrices que l'on nomme "ascii ou asques" (Pitt and Hocking, 2009; Spatafora et al., 2017). L'asque est une grande cellule sous forme de sac renfermant plusieurs cellules reproductrices (généralement quatre à huit spores) produites par méiose. De plus, certains champignons peuvent être homothalliques ou hétérothalliques, c'est-à-dire qu'ils possèdent les deux gamètes ou au contraire nécessitent la présence d'un autre individu compatible. D'autre part, la plupart des champignons effectuent également une reproduction dite asexuée (stade anamorphe), qui se déroule

par fragmentation du thalle ou par bourgeonnement produisant des conidies, ou au sein de sacs (sporocystophores) pour les sporangiospores des Mucorales).

Enfin, il peut être rappelé qu'au-delà de la classification reposant sur des bases génétiques ou génomiques, au sein de la diversité fongique, les phyla, les familles, les genres et surtout les espèces possèdent leur propres caractéristiques morphologiques (i.e. microscopiques et macroscopiques) et physiologiques (e.g. capacité de croissances à certaines températures, concentrations en sel, valeurs du pH). Ces dernières étaient par ailleurs très largement utilisées pour identifier les différents isolats fongiques avant le développement des outils de biologie moléculaire.

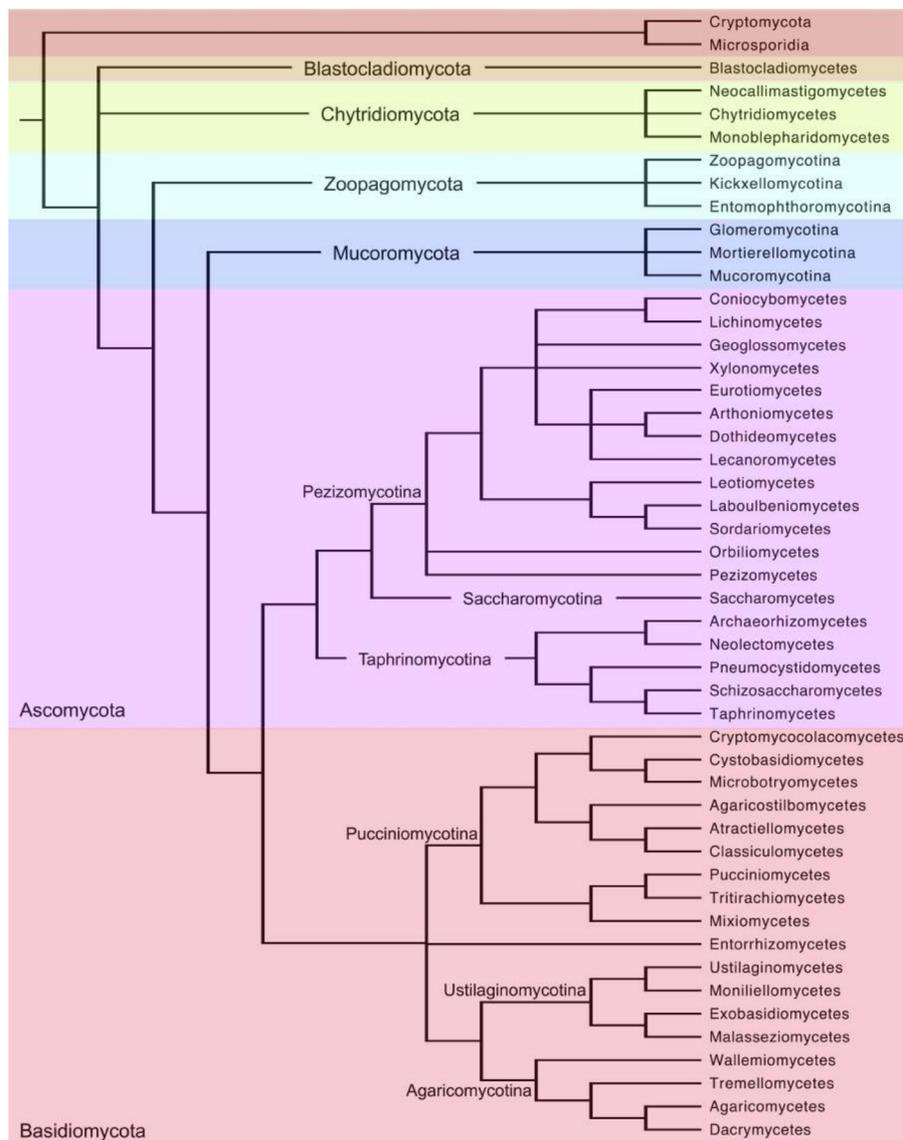


Figure 5 : Cladogramme du règne fongique. Figure tirée de Spatafora et al., 2017

III.1.2. Identification des champignons

Historiquement la classification, l'identification et la description des espèces fongiques s'appuyaient sur des cultures effectuées en utilisant divers milieux, suivies d'observations de leurs caractéristiques micro- et macroscopiques ainsi que physiologiques. Cependant, ces méthodes longues et fastidieuses pouvaient conduire à des identifications présomptives. Grâce au développement des outils moléculaires comme l'amplification par "*Polymerase Chain Reaction*" (PCR) de gènes d'intérêt taxonomique suivie d'un séquençage, on peut ainsi affiner les identifications. Tout comme pour les bactéries, dont l'ADN ribosomique 16S est le gène taxonomique de référence, il existe pour l'identification des champignons, un marqueur dit universel, à savoir l'Internal Transcribed Spacer (*ITS*) (Schoch et al., 2012). Cependant, selon les genres considérés, ce dernier ne permet pas toujours une identification certaine jusqu'au rang de l'espèce et nécessite alors parfois l'amplification et le séquençage d'autres gènes d'intérêt taxonomique. A titre d'exemple, pour l'identification de certaines espèces classiquement retrouvées aux sein des fromages, telles que des *Penicillium* spp., le gène de la beta-tubuline (*tub2*) est privilégié comme cible (Rico-Munoz et al., 2019; Samson et al., 2004), tandis que le facteur d'élongation alpha (*tef1*) est sélectionné pour les espèces *Scopulariopsis* spp. et *Fusarium* spp. (O'Donnell et al., 2010; Rico-Munoz et al., 2019). Pour ces dernières, le gène de la "RNA polymerase second largest subunit" (*rpb2*) serait également recommandé, comme relaté par Rico-Munoz et al. (2019). Enfin, pour une description de nouvelles espèces ou une reclassification phylogénétique d'espèces déjà décrites, le séquençage de plusieurs gènes est préconisé permettant des analyses dites multi-gènes phylogénétiques. Récemment, de nombreuses études ont par ailleurs été menées dans ce sens (Frisvad et al., 2019; Geiser et al., 2021; Lombard et al., 2015) ce qui a conduit à de nombreuses reclassifications d'espèces (notamment au sein du genre *Fusarium*). Auparavant, certaines espèces fongiques possédaient deux noms de par leur forme sexuée et asexuée, c'est pourquoi dans un but de clarification au niveau de la classification fongique un concept "One Fungus, One Name" a été instauré pour ne conserver qu'un seul nom par espèce (Wingfield et al., 2012).

Il peut être noté depuis quelques années que des méthodes se développent dans des buts d'identifications plus rapides telles la spectrométrie de masse "Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight" (MALDI-TOF) (Penland et al., 2021; Quéro et al., 2019). Grâce aux perfectionnements des méthodes d'identifications, de plus en plus d'études s'intéressent à des descriptions fines et à l'évolution de la diversité microbienne présente aux sein des aliments fermentés incluant les fromages (Cotter and Beresford, 2017).

Au vu de la complexité des écosystèmes fromagers, la présence d'isolats correspondant potentiellement à de nouvelles unités taxonomiques ne peut être exclue. Cette description apparaît

importante, puisque les données autécologiques, physiologiques et métaboliques sont communément rapportées à l'entité fondamentale en biologie, qu'est l'espèce. Cela est d'autant plus vrai en microbiologie appliquée où il est important de catégoriser les micro-organismes afin, par exemple, de mieux les contrôler.

Brièvement, l'apparition d'une espèce, sous forme de divergence à partir d'une espèce originelle, est le résultat de plusieurs facteurs évolutifs comme la sélection naturelle, l'accumulation de mutations, les migrations ou la dérive génétique (de Queiroz, 2005; Kohn, 2005). La sélection naturelle, ou sous l'influence de l'homme, va être à l'origine notamment de changements évolutifs de facteurs adaptatifs qui vont accroître dans une "condition" donnée (niche, habitat etc.), la survie et la "fitness" (capacité à se développer et à se reproduire) qui vont modeler les diversités génétiques et phénotypiques dans une population (Milgroom, 2017). C'est ainsi, que des espèces fongiques rencontrées dans les fromages et dites technologiques comme *P. camemberti* (Ropars et al., 2020) ou *P. roqueforti* (Dumas et al., 2020) ont divergé à partir d'espèces ancestrales, dans ce cas, sous l'influence d'une sélection accélérée par l'homme dans le cadre d'une domestication.

La difficulté à définir une espèce vient du fait que cette entité biologique est difficile à délimiter. Taylor et al. (2000) et Chethana et al. (2021) explicitent très bien le fait qu'il existe d'une part, différents concepts d'espèce : concept morphologique (Ruse, 1969), concept biologique ou encore concept évolutif qui sont, comme le terme "concept" (vue de l'esprit) l'évoque, théoriques et d'autre part, des concepts opérationnels, que nous appellerons ici pratiques qui eux, permettent aux biologistes de définir cette entité biologique auxquelles pourront se rapporter notamment des éléments d'autécologie, de physiologie et de métabolisme.

Parmi les concepts biologiques, le concept évolutif est finalement le plus simple à appréhender dans lequel selon Simpson (1951), une espèce est une population divergeant d'une population ancestrale qui a évolué indépendamment des autres populations.

Les concepts pratiques (i.e. opérationnels) sont également multiples mais les plus utilisés sont aujourd'hui basés sur l'utilisation de l'outil phylogénétique. Ces derniers peuvent reposer :

i) sur l'analyse de plusieurs gènes concaténés. Les différentes espèces sont délimitées sur la base de l'analyse des groupes réciproquement monophylétiques supportés statistiquement (e.g. valeur de bootstrap > 70 %, probabilité postérieure bayésienne > 90%). Cette approche est la plus simple à mettre en œuvre, notamment parce qu'elle ne nécessite pas un nombre important d'isolats par population testée, mais aboutit vraisemblablement à une surestimation de la vraie diversité des espèces (Hilário et al., 2021).

ii) sur l'analyse des concordances/discordances observées lors de la comparaison des généalogies issues des analyses phylogénétiques menées sur plusieurs gènes indépendamment. La limite entre concordance et discordance au niveau de ces arbres permet de délimiter les groupes génétiquement isolés les uns des autres. Cette analyse, définie par Taylor et al. (2000) appelée GC-PSR ("*Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition*") est la technique qui a été la plus utilisée en mycologie récemment et notamment pour les champignons rencontrés dans les fromages (e.g. Gillot et al., 2015; Hermet et al., 2012).

iii) des approches plus probabilistes basées sur la théorie de la coalescence (Chethana et al., 2021). Cette approche permet d'évaluer les probabilités de l'existence d'un nombre différent d'espèces (une seule à n espèces) à l'instant présent, en reconstruisant "l'historique" de l'apparition des différents allèles des gènes analysés au temps présent depuis l'allèle ancestral. Ces approches sont particulièrement bien adaptées à la description des espèces cryptiques et sont de plus en plus utilisées notamment dans les approches de phylogénomique. Elles ont, par exemple, été utilisées pour délimiter les espèces de *P. camemberti*, *P. biforme* et *P. fuscoglaucum* (Ropars et al., 2020).

III.2. Les champignons au sein des fromages

Comme indiqué précédemment, si certains champignons filamenteux peuvent contaminer les fromages (e.g. *M. circinelloides*, *M. racemosus*, *P. bialowiezense*, *P. biforme* -précédemment *P. commune*-, *P. nalgiovense*, *P. verrucosum*) (Garnier et al., 2017; Pitt and Hocking, 2009) et les altérer, d'autres peuvent avoir un rôle majeur au cours de leur production, en particulier lors de l'affinage. En effet, ces différentes espèces peuvent, d'une part, favoriser ou inhiber le développement d'autres micro-organismes indésirables (Mounier, 2015) et, d'autre part, avoir un effet sur l'aspect visuel et les caractéristiques organoleptiques du fromage (e.g. coloration et texture interne et externe, production d'arômes appréciés ou non du consommateur). Dans ce contexte, des fournisseurs de ferments proposent divers ferments d'affinage pour la production des différentes variétés de fromages. On retrouve par ailleurs, dans le "Bulletin of the International Dairy Federation 495/2018", un inventaire de cultures microbiennes dont l'innocuité a été démontrée pour une utilisation dans les aliments fermentés incluant les produits laitiers (Bourdichon et al., 2018). A titre d'exemples, il y figure certaines espèces telles que : *B. domesticum*, *G. candidum*, *Mucor fuscus*, *M. lanceolatus*, *P. biforme*, *P. camemberti*, *P. fuscoglaucum*, *P. roqueforti*, *Scopulariopsis flava*, *Sporendonema casei*, espèces qui sont très fréquemment associées à certains fromages (Ropars et al., 2012) (**Tableau 2**). Ainsi, *P. camemberti* et *G. candidum* sont associés au Camembert et au Brie dans lesquels ils vont par ailleurs être responsables de l'aspect caractéristique de croûte blanche fleurie (Ropars et al., 2020) tandis que

P. roqueforti est associé aux fromages à pâte persillée tels que le Roquefort ou Gorgonzola dans lesquels il va notamment se développer en formant les veines bleues caractéristiques de ces fromages (Gillot et al., 2017b). L'espèce *M. lanceolatus*, qui a fait l'objet de moins d'études est, quant à elle, associée à la Tomme de Savoie (Hermet et al., 2012; Morin-Sardin et al., 2016) tandis que des espèces *Scopulariopsis* spp. sont associées aux Tommes de Pyrénées et Ossau-Iraty (Ropars et al., 2012). L'espèce *Sporendonema casei* est pour sa part associée au Cantal et Salers, et enfin *B. domesticum* est associée à la Raclette, Reblochon, Saint-Nectaire et Tilsit (Bachmann et al., 2005; Dugat-Bony et al., 2016; Ropars et al., 2012). Il est intéressant de noter que certaines de ces espèces peuvent être associées à ces fromages mais également être présentes dans d'autres environnements (e.g. *P. roqueforti* associées également au ensilages) tandis que d'autres ne sont a priori associées qu'exclusivement au fromage, ce qui est le cas, jusqu'à présent, de *P. camemberti*, *S. flava* et *S. casei* ou encore *B. domesticum* (Ropars et al., 2012). Ce dernier point interroge donc intrinsèquement sur cette spécificité d'habitat et renvoie à la notion d'adaptation.

Concernant *B. domesticum*, il est important de souligner que, malgré une commercialisation et une large utilisation industrielle sous forme de ferment soit pour la production de Saint-Nectaire soit dans un but préventif pour une action "anticollanti", au-delà de cet aspect de bioprotection, son impact sur le fromage restait à ce jour non décrit.

III.3. Diversité intraspécifique des champignons associés aux fromages

Comme pour les autres micro-organismes, une notion d'importance est celle relative à la diversité intraspécifique. En effet, celle-ci est directement associée à la notion de variabilité intraspécifique signifiant que des individus (i.e. souches) appartenant à la même espèce peuvent présenter des potentialités métaboliques différentes qualitativement et/ou quantitativement, et donc impacter différemment le produit final, ce qui peut être d'intérêt en production fromagère (e.g. modulation aromatique pour segmentation du marché). Ainsi, une espèce fongique peut être représentée par une grande diversité de génotypes correspondant à des souches qui peuvent être parfois réparties en populations. La détermination de l'existence de populations et, le cas échéant, l'étude de ces populations est d'intérêt car elle peut renseigner sur le caractère clonal ou non d'une espèce. De plus, si ces populations sont associées à des niches différentes, cela peut refléter des phénomènes de divergences adaptatives. Ces dernières peuvent être issues d'une adaptation évolutive « naturelle » au cours de laquelle des gènes d'intérêt, par exemple pour un environnement, sont conservés au cours du temps ou à l'inverse il peut y avoir un relâchement des gènes qui deviennent moins importants pour cet environnement. On parle alors, respectivement, de sélection

positive et négative. Dans le cadre des mécanismes d'adaptation, il peut également être noté des cas de transferts de gènes horizontaux permettant l'apport de gènes d'intérêt pour cet environnement. Enfin, ces divergences adaptatives peuvent être couplées à une pression d'origine humaine, visant à sélectionner certains caractères d'intérêt, par exemple pour leur application en production fromagère, et conduisent alors à des phénomènes de domestication. A ce jour, pour les moisissures d'intérêt des fromages, les structures de population les mieux décrites concernent *P. roqueforti* et *P. camemberti*.

Ainsi, pour *P. roqueforti*, des études préliminaires menées sur la base de marqueurs microsatellites (Gillot et al., 2015; Ropars et al., 2014) puis affinées plus récemment par une étude sur la base de génomes complets (études des SNPs et d'orthologues simple copie) (Dumas et al., 2020) ont permis l'identification de quatre populations génétiques (**Figure 6**). Parmi celles-ci, deux seraient utilisées en industrie fromagère, nommées "Roquefort" (fromages Roquefort AOP, Bleus des Causses) et "non-Roquefort" (autres fromages bleus tels que Gorgonzola et Fourme d'Ambert) tandis que deux autres seraient considérées comme des contaminants alimentaires et ensilages (Dumas et al., 2020). Cette séparation en quatre populations génétiques associées à des niches différentes est également accompagnée de différences phénotypiques (Dumas et al., 2020). Par l'étude des génomes, des signatures de domestication ont pu également être observées dans les populations fromagères, et en particulier dans la population "non-Roquefort" qui présente une très faible diversité génétique (sélection humaine pour utilisation en tant que ferment commercial) et chez qui a été mis en évidence des transferts de gènes horizontaux dont celles de deux grandes régions nommées *Wallaby* (575 kb) et *CheesyTer* (80 kb). Ces régions seraient entre autres porteuses de gènes associés au métabolisme du lactose et à la compétition microbienne, un avantage considérable pour une croissance sur fromage (Cheeseman et al., 2014; Ropars et al., 2015).

Pour *P. camemberti*, constituée de deux variétés nommée *P. camemberti* var. *camemberti* et *P. camemberti* var. *caseifulvum*, la situation est très différente puisque cette espèce est spécifiquement associée aux fromages (Ropars et al., 2020). Elle résulte de deux événements de domestication à partir des espèces *P. fuscoglaucum* et *P. biforme*, qui ont conduit à la formation d'espèces et variétés différentes et non de populations au sein d'une même espèce (Ropars et al., 2020) (**Figure 7**). De façon intéressante, les régions *Wallaby* et *CheesyTer* mises en évidence au sein de la population "Roquefort" chez *P. roqueforti* ont été identifiées chez les deux variétés de *P. camemberti* (Ropars et al., 2020). Les variétés présentent intrinsèquement des faibles diversités mais se distinguent l'une de l'autre en particulier par l'aspect blanc et duveteux de *P. camemberti* var. *camemberti* vs. un aspect gris-vert pour la seconde.

Au-delà de ces espèces, la question de la diversité intraspécifique des autres moisissures d'intérêt des fromages, dont celle de *B. domesticum*, se pose.

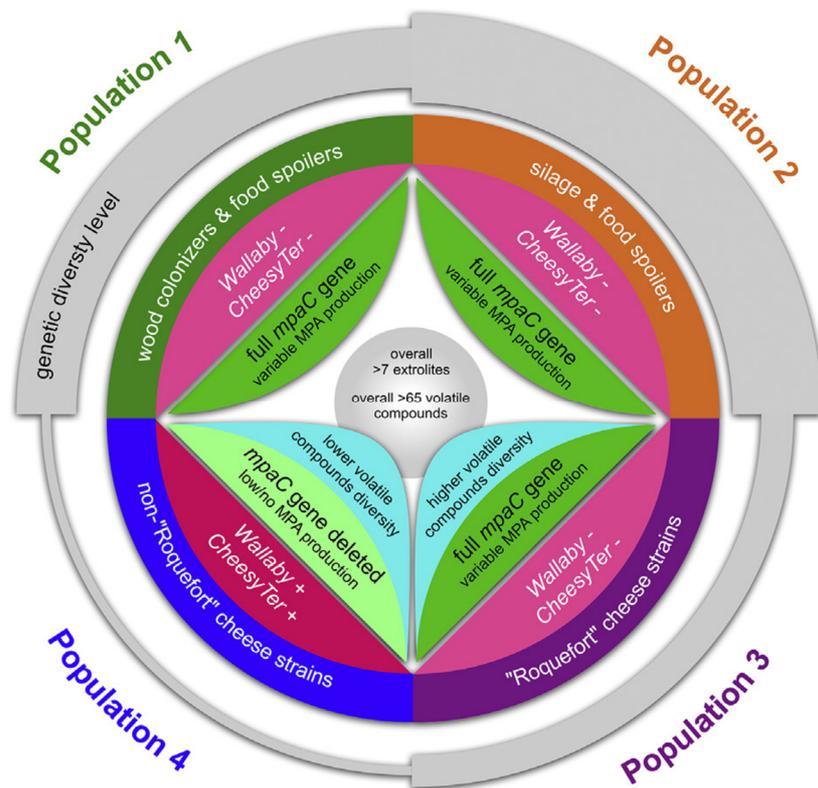


Figure 6 : Représentation de la structure de populations au sein de l'espèce *P. roqueforti*. Pour chaque population sont représentées, l'origine des souches, l'absence (-) ou présence (+) des régions *Wallaby* et *CheesyTer*, la diversité des composés volatils, la délétion dans le gène *mpaC* associée au cluster de gènes impliqués dans la bisynthèse d'acide mycophénolique (MPA) selon les études de (Dumas et al., 2020; Gillot et al., 2017a, 2017b; Gurkan et al., 2018). Figure tirée de Coton et al., 2020.

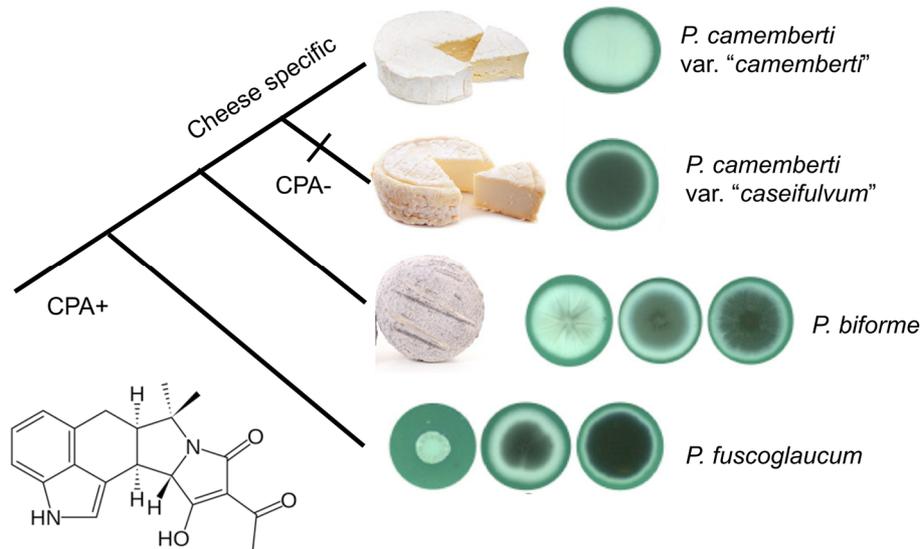


Figure 7 : Représentation schématique des relations entre *P. camemberti* et les espèces précédemment décrites en tant que *P. commune* (i.e. *P. biforme*, *P. fuscoglaucum*). L'incapacité à produire l'acide cyclopiazonique (CPA) est mise en évidence pour *P. camemberti* var. *caseifulvum*. Les fromages représentés correspondent à l'environnement d'origine (respectivement, fromages de chèvre, Camembert, Saint Marcellin). Figure tirée de Ropars et al., 2020.

III.4. Comportement et rôle des champignons en production fromagère

III.4.1. Physiologie des champignons d'intérêt en fromagerie

La croissance d'un champignon sur les fromages, comme d'ailleurs sur tout autre substrat, nécessite des conditions favorables à son développement. Au-delà de la composition même du fromage qui est source de nutriments, la croissance fongique dépend aussi de différents facteurs abiotiques intrinsèques, avec principalement l'activité de l'eau (a_w), le taux de NaCl et le pH ainsi que de facteurs extrinsèques tels que la température. Dans le contexte fromager, suite aux différentes réactions métaboliques qui se déroulent au cours de la production du fromage, ces facteurs, en particulier intrinsèques, sont amenés à évoluer impactant de fait le microbiote, d'où la nécessité de mieux connaître les conditions de croissances des champignons associées avec cette matrice.

En ce sens, depuis quelques années, on observe de plus en plus d'études visant à mieux connaître leurs conditions optimales de croissance afin, en particulier, d'optimiser leur utilisation. En effet, même si les descriptions d'espèces détaillent certaines de ces caractéristiques (e.g. la température, le milieu de culture, la durée d'incubation), ces données sont bien souvent limitées à quelques valeurs et nécessitent de plus amples investigations via des études physiologiques approfondies. En ce sens, des études dites de microbiologie prévisionnelle, classiquement utilisées en bactériologie, ont été étendues aux moisissures (mycologie prévisionnelle) (Dantigny et al., 2005).

Dans cette approche, l'impact de différents facteurs abiotiques (e.g. température, a_w , pH) sur le cycle de vie d'un champignon (germination et croissance, en particulier) est évalué sur une large gamme de valeurs pour un même paramètre (Camardo Leggieri et al., 2020, 2018; Kosegarten et al., 2017; Morin-Sardin et al., 2016; Nguyen Van Long et al., 2021, 2017a, 2017b; Sautour et al., 2002) puis des outils de modélisations sont utilisés. Tout d'abord, à partir des mesures de croissance effectuées au cours du temps, des modélisations primaires sont effectuées qui permettent d'estimer le temps de latence, la vitesse de croissance et la croissance maximale pour chaque valeur étudiée du paramètre considéré. Ensuite, les modélisations secondaires représentent les valeurs précédemment estimées (e.g. vitesses de croissance pour chaque valeur) en fonction de ce paramètre, et ainsi estiment des valeurs limites (X_{min} et X_{max} , e.g. température minimale et maximale de croissance) et optimales de croissance (X_{opt} , e.g. température optimale et μ_{opt} -vitesse de croissance optimale-) que l'on appelle "valeurs cardinales" (Figure 8). Par ailleurs, ces modélisations peuvent être effectuées selon différents modèles (Zwietering et al., 1990), c'est-à-dire des équations mathématiques permettant l'obtention des différents paramètres et qui visent à correspondre au plus près aux observations biologiques associées au champignon étudié. Les modèles primaires les plus appliqués sont le modèle linéaire, le modèle de Baranyi ou le modèle de Gompertz tandis que le modèle de Rosso (Rosso et al., 1993) est très fréquemment utilisé pour les modélisations secondaires (Dagnas and Membré, 2013).

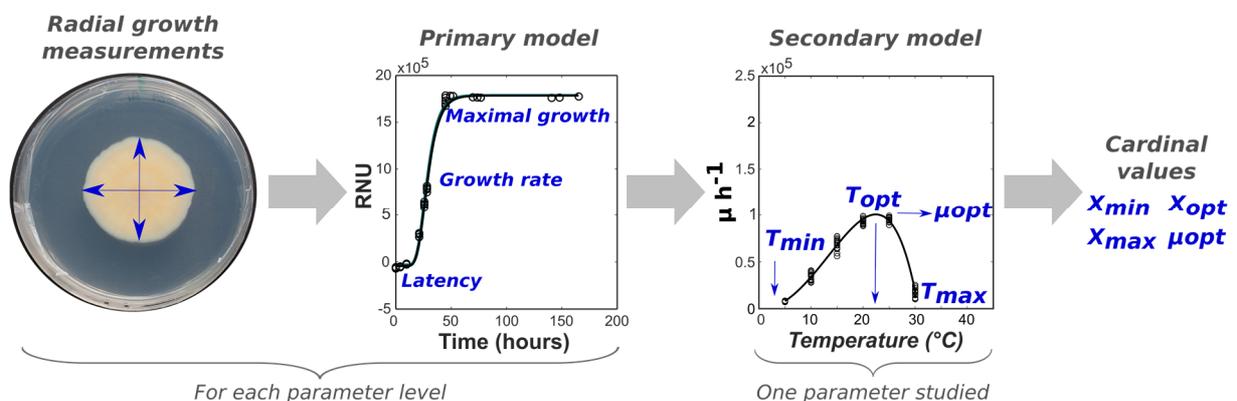


Figure 8 : Démarche expérimentale permettant l'obtention des valeurs cardinales de croissance par modélisations primaires et secondaires.

Par ailleurs, ce type d'étude physiologique, au-delà d'une meilleure connaissance des caractéristiques de croissance d'une espèce donnée, peut également être utilisé comme un outil d'étude de la potentielle adaptation d'une espèce via une meilleure aptitude de croissance sur des valeurs de pH, NaCl ou température ou même en fonction de la matrice de culture. Cette approche a ainsi été adoptée pour certaines espèces du genre *Mucor* pour lesquelles il n'y avait jusqu'alors que

très peu de données de croissance (Morin-Sardin et al., 2016). Cette dernière a, d'une part, enrichi les connaissances scientifiques sur les espèces étudiées qui étaient associées à des niches variées (clinique, endophyte et fromage) et, d'autre part, supporté une possible adaptation des espèces fromagères à leur habitat en montrant notamment une meilleure croissance des souches technologiques *M. fuscus* et *M. lanceolatus* sur Tomme de Savoie par rapport aux milieux synthétiques (Morin-Sardin et al., 2016).

On notera que si l'impact de facteurs abiotiques est largement étudié, l'impact des facteurs biotiques l'est beaucoup moins, certainement en lien avec la complexité des écosystèmes fromagers.

III.4.2. Potentiel métabolique des champignons en production fromagère

Les moisissures sont des micro-organismes connus pour leur potentiel métabolique important, qui est d'ailleurs source de molécules d'intérêts variés. Parmi les voies biochimiques fongiques qui se déroulent au cours de la production du fromage, les plus importantes sont la lipolyse et la protéolyse. Ces dernières jouent un rôle majeur lors de l'affinage intervenant à la fois sur la texture et la production d'arômes (McSweeney, 2017).

III.4.2.1. La protéolyse

La protéolyse intervient sur la texture du fromage en diminuant notamment l' a_w , mais joue également un rôle majeur dans la production d'arômes lors de l'affinage. Cette protéolyse se déroule en plusieurs étapes (**Figure 9**), tout d'abord les protéines (caséines majoritairement) sont hydrolysées en peptides par l'intervention d'enzymes protéases puis ils sont hydrolysés en acides aminés par des aminopeptidases (McSweeney, 2017). Les acides aminés produits sont ensuite catabolisés via l'action de différentes enzymes (e.g. lyases, désaminases, décarboxylases, transaminases) en produisant ainsi des composés aldéhydes, alcools, acides, amines, indoles, phénols, soufrés et sulfurés (Ardö et al., 2017) mais aussi diverses molécules telles que les styrènes, des phénols, des esters, des terpènes, ou encore des pyrazines (Spinnler, 2017). Ces différents composés présentent des potentiels aromatiques variés mais il est à noter que les acides aminés, eux-mêmes, peuvent aussi apporter aux fromages certaines notes aromatiques sucrées (e.g. glycine, sérine, proline), acides (e.g. histidine, glutamate, acide aspartique) ou amères (e.g. arginine, valine, leucine) (McSweeney, 2017).

La protéolyse fait ainsi intervenir diverses enzymes dont des protéases et peptidases qui, bien qu'elles puissent être ajoutées ou provenir naturellement du lait (plasmine venant du plasminogène) ou de la présure (chymosine), sont issus du métabolisme microbien, dont fongique dans le cas qui nous

intéresse (Ardö et al., 2017). En effet, certaines espèces fongiques sont connues pour avoir des activités protéolytiques comme par exemple, *P. roqueforti*, *P. camemberti* et *G. candidum*. L'activité protéolytique de *P. roqueforti* et *P. camemberti* est d'ailleurs bien décrite et s'explique par une production de protéases extracellulaires (aspartyl protéase et métalloprotéase) mais aussi de peptidases intracellulaires (aminopeptidase et carboxypeptidases) (Cerning et al., 1987) tandis que celle de *G. candidum* s'explique par sa production de protéases extra- et intracellulaire ainsi que d'aminopeptidase (Ratray and Eppert, 2011). Par ailleurs, il peut être noté que l'activité de cette dernière serait supérieure à celle de *P. camemberti* (Ratray and Eppert, 2011). De plus, certaines études récentes se sont particulièrement intéressées à la capacité protéolytique de *P. roqueforti* (Caron et al., 2021; Dumas et al., 2020; Gillot et al., 2017b) et ont montré des différences d'intensité de cette activité entre souches testées et tout particulièrement corrélées aux populations génétiques décrites précédemment (Caron et al., 2021).

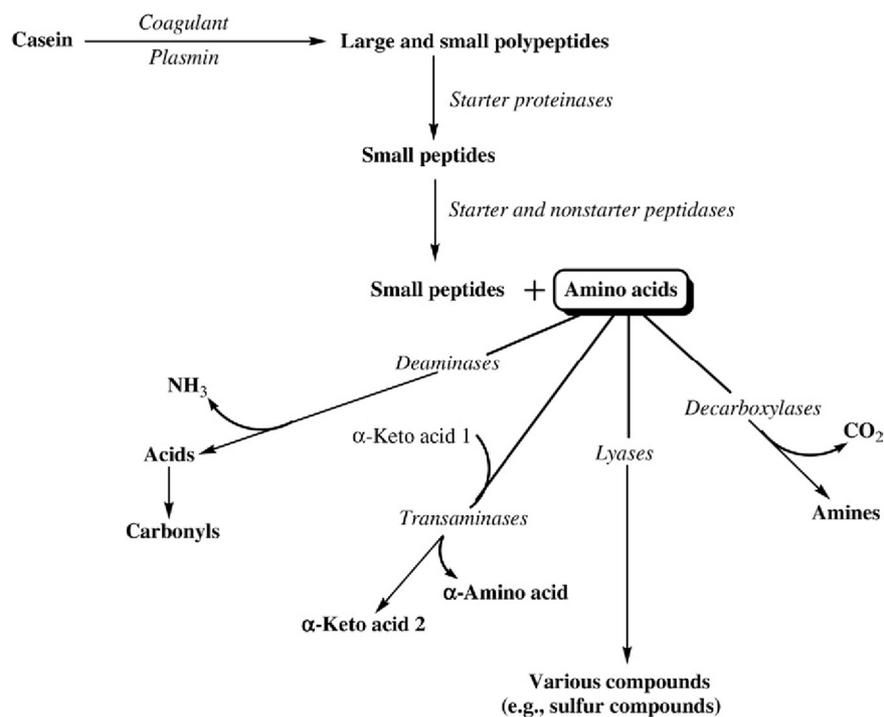


Figure 9 : Voies métaboliques impliquées dans la protéolyse et catabolisme des acides aminés au cours de l'affinage du fromage. Figure tirée de McSweeney, 2017.

Les capacités de protéolyse des autres espèces fongiques d'intérêt en production, dont celles de *B. domesticum*, n'ont, à notre connaissance, pas été explorées.

III.4.2.2. La lipolyse

La matière grasse laitière est connue pour participer grandement aux propriétés aromatiques des fromages. En effet, celle-ci conserve certains composés aromatiques qui sont liposolubles favorisant alors la réalisation de certaines voies métaboliques, mais également offrant au consommateur une libération de ces molécules une fois en bouche. D'un point de vue biochimique, la matière grasse laitière est composée de triglycérides. Ceux-ci peuvent être hydrolysés en acide gras libres, glycérol et mono-ou diglycérides sous l'action de certaines enzymes lipolytiques : les estérases et les lipases. Ce phénomène permet également la production de composés volatiles tout le long de l'affinage des fromages. Brièvement, après l'hydrolyse des triglycérides en acides gras libres, ceux-ci subissent certaines transformations qui sont à l'origine de production de composés volatiles. Parmi les plus fréquents, sont retrouvés les esters qui sont issus d'une transestérification ou alcoololyse à partir des acides gras libres, les lactones issus d'une estérification intramoléculaire d'hydroxyacides provenant des triglycérides, les méthyl-cétones issues d'une bêta-oxydation partielle d'acides gras qui pourront ensuite être réduits en alcools secondaires et enfin, les aldéhydes qui sont également souvent transformés en alcools (**Figure 10**) (Thierry et al., 2017). L'ensemble de ces composés varient qualitativement et quantitativement entre les différentes variétés de fromages et crée ainsi un profil aromatique caractéristique. Les enzymes lipolytiques impliquées dans ces voies métaboliques peuvent être, comme pour la protéolyse, ajoutées ou être naturellement présentes dans le lait ou bien être apportées par la présure (estérases pré gastriques) mais aussi produites par les ferments et cultures fongiques d'affinage (Thierry et al., 2017). Cependant, il est à noter que les lipoprotéine lipases présentes dans le lait ont la particularité de ne pas résister au chauffage et sont donc actives principalement pour les fromages au lait cru tandis que les présures sont souvent sans lipases malgré une présence d'estérases, ces enzymes proviendraient donc majoritairement des micro-organismes. L'activité lipolytique, particulièrement importante dans les fromages type "bleus", a par ailleurs été démontrée pour *P. roqueforti* mais également pour d'autres espèces associées à divers fromages (e.g. *G. candidum*, *P. camemberti*). Celle-ci s'explique chez *P. roqueforti* par la production d'une lipase intracellulaire (Stepaniak et al., 1980) et deux lipases extracellulaires, acide et alcaline, cette dernière étant également produite par *P. camemberti* (Cerning et al., 1987). En plus de cette lipase supplémentaire chez *P. roqueforti* par rapport à *P. camemberti*, l'activité de cette lipase commune serait supérieure chez cette première espèce (Cerning et al., 1987). Enfin, *G. candidum* quant à elle produit deux lipases extracellulaires dont une qui serait spécifique des acides gras insaturés à longues chaînes (Rattray and Eppert, 2011). Diverses études se sont par ailleurs intéressées à cette activité chez *P. roqueforti*, prenant en compte la diversité liées aux différentes populations (Caron et al., 2021; Dumas et al., 2020; Gillot et al., 2017b). Comme pour l'activité protéolytique, Caron et al. (2021) ont également démontré chez *P. roqueforti*, une corrélation positive entre l'intensité de l'activité

lipolytique et les souches de la population “Roquefort” tandis que Dumas et al. (2020) avaient montré une activité plus importante pour la population “non-Roquefort”. Il peut être noté que cette différence peut s’expliquer par la méthodologie adoptée, l’étude la plus récente appliquant une méthode plus précise, par UHPLC-MS (vs. un test semi-quantitatif par “tributyryn agar”).

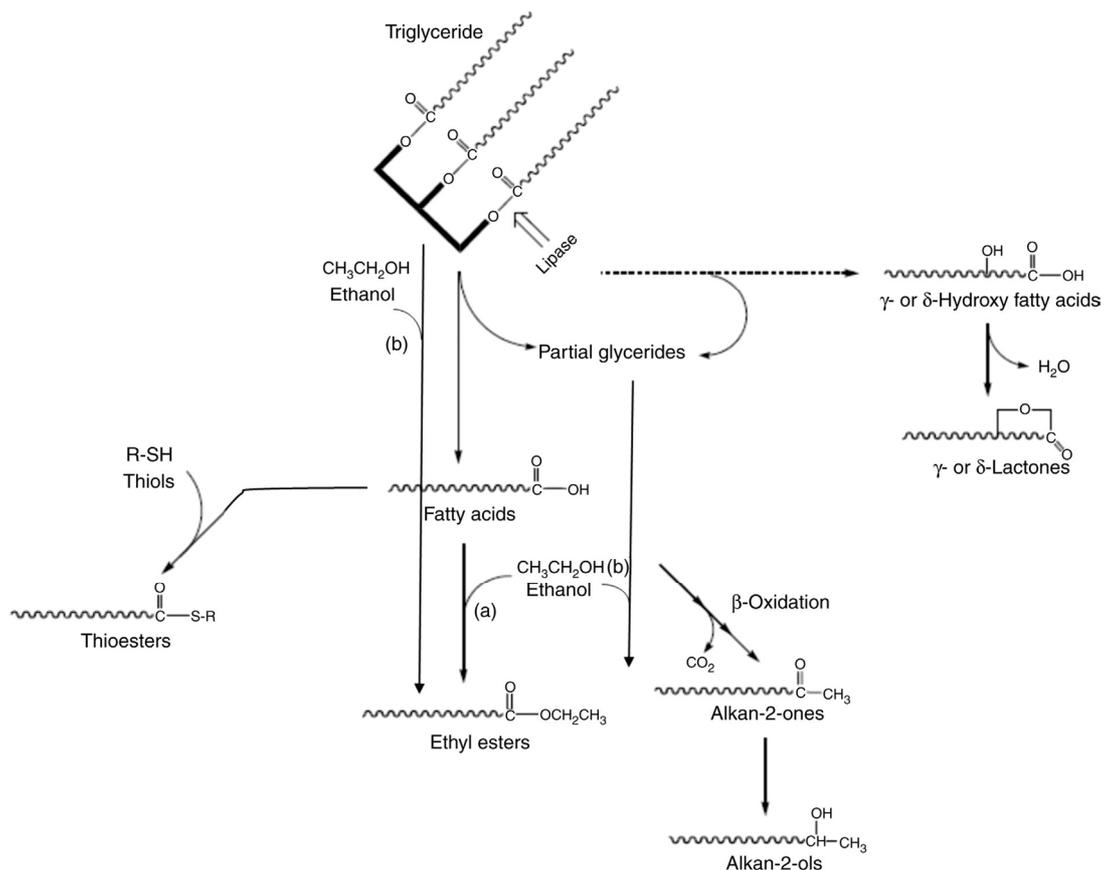


Figure 10 : Voies métaboliques impliquées dans la lipolyse et le catabolisme des acides gras libres au cours de l’affinage du fromage. Figure tirée de Thierry et al., 2017.

Comme indiqué pour la protéolyse, les capacités de lipolyse des autres espèces fongiques d’intérêt en production, dont celles de *B. domesticum*, n’ont, à notre connaissance, pas été explorées.

III.4.2.3. La production de composés volatils

Les champignons filamenteux sont responsables de la production de composés volatils (e.g. acides, méthyl cétones, esters, alcools, aldéhydes) dont certains jouent un rôle considérable sur la flaveur du fromage (**Tableau 3**). Cette production va naturellement être induite par les voies

métaboliques précédemment décrites, la protéolyse et la lipolyse, mais peuvent aussi provenir des voies de glycolyse du lactose et du métabolisme du citrate. De ce fait, la composition fongique présente au sein des fromages et l'intensité de leur potentiel enzymatique conditionnent le profil aromatique de chaque fromage qui évolue au cours du temps (Bertuzzi et al., 2018). A titre d'exemple, les méthylcétones sont issus du métabolisme des acides gras et sont largement associées au métabolisme fongique, en particulier celui de *P. roqueforti*. Il a par exemple été démontré que certaines voies métaboliques associées à la production de composés volatils étaient favorisées dans les fromages à croûte lavée par rapport aux autres fromages étudiés (Wolfe et al., 2014). Diverses études, en plus de s'intéresser aux capacités protéolytiques et lipolytiques ont également évaluées la production de composés volatils de certaines espèces telles que *P. roqueforti* démontrant naturellement, comme précédemment pour la lipolyse et protéolyse, une concordance entre population et composés volatils (Caron et al., 2021; Dumas et al., 2020; Gillot et al., 2017b). Parmi ceux-ci ont été identifiés des méthylcétones (e.g. heptan-2-one, nonan-2-one, butan-2-one et 3-hydroxybutan-2-one), des acides gras (e.g. acide butanoïque) et des alcools (e.g. butan-2-ol, oct-1-en-3-ol). Par ailleurs, concernant ce dernier composé, oct-1-en-3-ol, celui-ci est très fréquent au sein du règne fongique et présente un arôme typique "champignon de Paris" (Cronin and Ward, 1971). La production de composés volatils par *G. candidum* a également été décrite incluant alcools, méthyl cétones (e.g. pentan-2-one, heptan-2-one, nonan-2-one, undecan-2-one) et alcools secondaires correspondants (e.g. heptan-2-ol, nonan-2-ol) (Jollivet et al., 1994).

Le potentiel aromatique des espèces fongiques d'intérêt en fromagerie moins étudiées (*Scopulariopsis*, *Sporendonema*, *Mucor* et *B. domesticum*) reste également à explorer.

Tableau 3 : Composés volatils fréquemment associés aux fromages, retranscrit dans Kilcawley, 2017. Le nom des composés est donné selon la nomenclature IUAPC et les odeurs sont décrites selon les informations du site <http://www.thegoodscentscompany.com>.

Volatile compounds	Odor descriptor	Cheese types
Acids		
Acetic	Pungent, sour, vinegar	Cheddar, Parmesan, Camembert
Butanoic	Cheesy, buttery	Cheddar, Gouda, Parmesan, Bleus
Propionic	Pungent, acidic, cheesy	Fromages suisses
Caprylic	Fatty, waxy, cheesy	Gouda, Parmesan
Palmitic	Waxy, fatty	Gouda
Esters		
Ethyl acetate	Ethereal, fruity, sweet, green	Parmesan, Fromages suisses
Ethyl butanoate	Fruity, juicy	Cheddar, Gouda, Parmesan, Fromages suisses
Ethyl octanoate	Fruity, wine, waxy, sweet	Parmesan
Ketones		
Propan-2-one (acetone)	Ethereal, apple, pear	Bleus
3-hydroxybutan-2-one	Sweet, buttery, creamy	Cheddar, Gouda
Butan-2-one	Fruity, green, acetone-like	Bleus
Oct-1-en-3-one	Herbal, mushroom, earthy	Cheddar, Camembert
Undecan-2-one	Fruity, waxy, creamy, floral	Gouda, Camembert, Bleus
Nonan-2-one	Fresh, sweet, green	Gouda, Parmesan, Cambembert, Fromages suisses, Bleus
Heptan-2-one	Fruity, sweet, herbal	Cheddar, Camembert, Fromages suisses
butane-2,3-dione (diacetyl)	Sweet, creamy, pungent	
Tridecan-2-one	Fatty, waxy, dairy, nutty, herbal	Gouda, Bleus
Aldehydes		
2-phenylacetaldehyde	Sweet, floral	Cheddar
3-Methyl butanal	Ethereal, peach, fatty	Cheddar, Gouda, Parmesan, Cambembert, Fromages suisses, Bleus
Alcohols		
Ethanol	Alcoholic	Fromages suisses
propan-1-ol	Alcoholic, fermented, musty	Camembert, Fromages suisses
butan-2-ol	Sweet, apricot	Fromages suisses
Heptan-2-ol	Fruity, earthy, bitter	Camembert
Oct-1-en-3-ol	Mushroom, fungal, earthy, oily	Camembert
3-methylbutan-1-ol	Alcoholic, fatty, winey, cocoa	Gouda
Sulphurs		
Methanethiol	cabbage garlic	Camembert
(methyltrisulfanyl)methane -		Cheddar, Gouda, Parmesan, Camembert
Lactones		
5-hexyloxolan-2-one	Peach, buttery, sweet	Cheddar, Gouda, Camembert
5-octyloxolan-2-one	Fatty, sweet, fruity	Gouda
Pyrazine		
Tetra-methyl pyrazine	-	Parmesan

III.4.2.4. La production de métabolites secondaires

Comme indiqué dans les parties précédentes, les moisissures ont d'importants potentiels enzymatiques et sont, en particulier, capables de produire des métabolites secondaires. Ces derniers correspondent à des molécules appartenant à différentes familles biochimiques (e.g. polycétides, terpènes) qui vont avoir plusieurs rôles pour la moisissure mais peuvent aussi avoir des conséquences négatives pour l'Homme (e.g. mycotoxines). On notera qu'il existe également des molécules avec un impact positif (e.g. pénicilline, lovastatine, acide mycophénolique). Ainsi, cette production, non systématique, peut conférer au champignon producteur un avantage sélectif par rapport aux autres espèces présentes dans une matrice complexe ou encore jouer un rôle de détoxification (Alshannaq and Yu, 2017; Hymery et al., 2014). Dans le contexte alimentaire, les mycotoxines sont particulièrement étudiées du fait de leur toxicité pour l'Homme ou l'animal si celles-ci sont ingérées en importante quantité (e.g. neurotoxique, hépatotoxique ou cancérigène -Eskola et al., 2020-) ou de façon chronique. Ceci est donc un problème de sécurité sanitaire des aliments qui concerne aussi bien les producteurs que les consommateurs. De plus, ces molécules de bas poids moléculaires sont relativement stables et peuvent résister lors de l'application des procédés technologiques (e.g. pasteurisation). En France, le site de l'ANSES (<https://www.anses.fr/fr/content/les-mycotoxines>) fait référence à plus de 300 mycotoxines identifiées pour seulement une trentaine possédant des propriétés toxiques préoccupantes, ce qui a d'ailleurs conduit à leur réglementation. Ces mycotoxines, peuvent être retrouvées de la fourche à la fourchette étant présentes dans diverses cultures céréalières (un quart des récoltes mondiales selon la Food and Agriculture Organisation), fruits et légumes, d'où une surveillance accrue. Ainsi, le règlement CE n°1881/2006 de la commission du 19 décembre 2006, liste certaines mycotoxines et leurs valeurs limites acceptables en fonction des aliments (de l'ordre du µg/kg) : aflatoxines, déoxynivalénol, fumonisines, ochratoxine A, patuline, toxines T-2 et HT-2 et zéaralénone.

Pour les fromages, l'ochratoxine A (OTA) et l'aflatoxine M1 (AFM1) seraient les plus dangereuses (Hymery et al., 2014) alors que seule cette dernière est réglementée, jusqu'à présent, dans un contexte laitier dans le règlement CE n°1881/2006 qui définit un taux maximal de 0,05 µg/kg pour les denrées alimentaires "lait cru, lait traité thermiquement et lait destiné à la fabrication de produits laitiers". En effet, si la plupart des mycotoxines retrouvés au sein des fromages sont issus d'une croissance de champignons mycotoxinogènes *in situ* (production non systématique), l'AFM1 provient directement du lait (Hymery et al., 2014). Certaines études ont évalué la présence de mycotoxines au sein de divers fromages (Altafini et al., 2021; Fontaine et al., 2015; Kalinina et al., 2018). Il a par ailleurs été démontré dans une étude de 86 fromages à pâte persillée, d'une part, l'absence d'aflatoxine M1 (comme attendue en accord avec la réglementation) et, d'autre part, une

production d'acide mycophénolique et roquefortine C (non réglementées) dans 37,2 et 97,7 % des fromages étudiés (en moyenne, 841 ± 1271 et 848 ± 1670 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivement) pouvant vraisemblablement être associées à l'utilisation de *P. roqueforti* dans cette typologie de fromage (Fontaine et al., 2015). Une seconde étude (Altafini et al., 2021) s'est quant à elle concentrée sur l'ochratoxine A recherchée dans 51 fromages, dans lesquels elle n'a été détectée que dans sept échantillons. Cette étude révèle malgré l'absence de réglementation, un faible risque de contamination par cette dernière, toutefois, les auteurs soulignent que parmi les résultats positifs, des taux supérieurs à ceux autorisés dans le lait en Slovaquie ont été détectés (e.g. > 7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vs. ≤ 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) et sont loin d'être anodins, en particulier pour un échantillon (22,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$) d'où l'importance de considérer cette mycotoxine dans la réglementation européenne (EFSA CONTAM Panel et al., 2020).

Les principales espèces fongiques productrices de mycotoxines au sein des aliments appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* (Sweeney and Dobson, 1998) qui peuvent coloniser les fromages. Pour les espèces d'intérêt technologique, la production (non exhaustive) d'acide mycophénolique (MPA), andrastine A, éremofortines, PR-toxine et roquefortine C (ROQ-C) par *P. roqueforti* est à ce jour très bien décrite avec l'identification des clusters de gènes de biosynthèse associés (Coton et al., 2020) ou encore d'acide cyclopiazonique (CPA) produit par *P. camemberti* (Hymery et al., 2014). Il est important de souligner à nouveau que malgré une présence fréquente d'espèces fongiques sur des fromages (par inoculation ou croissance spontanée désirée), certaines sont parfois encore peu étudiées sous cet angle et leur potentielle innocuité/toxicité méconnue. A titre d'exemple, l'innocuité de *B. domesticum* n'a été étudié par Bachmann et al. (2005) uniquement sur une seule souche, or il est connu que des différences de productions, qualitatives et quantitatives, existent non seulement entre espèces mais également entre souches (Cervini et al., 2020; Coton et al., 2020; Fontaine et al., 2015; Gillot et al., 2017a ; 2017b; Hymery et al., 2014) d'où la nécessité d'études approfondies sur le potentiel de production de métabolites secondaires par des espèces utilisées si communément mais également des études de toxicité de celles-ci.

Au global, on constate donc du point de vue fonctionnel, un déficit conséquent de connaissances sur certaines espèces d'intérêt en production fromagère, dont *B. domesticum* qui a fait l'objet de ces travaux de thèse.

IV. Le genre *Bisifusarium* et l'espèce *Bisifusarium domesticum*

IV.1. Taxonomie des *Bisifusarium* spp.

Le genre *Fusarium* décrit en 1809 appartient à la classification suivante : phylum *Ascomycota*, Classe *Sordariomycetes*, Ordre *Hypocreales*, Famille *Nectriaceae*. Les espèces de la famille *Nectriaceae* sont retrouvées au sein de divers environnements, très fréquemment dans les sols cultivés, plantes et eau et sont particulièrement associées à la dégradation de matériels végétaux (Paziani et al., 2019; Pitt and Hocking, 2009). Le genre *Fusarium*, très étudié par les mycologues et les phytopathologistes, a, au cours du temps et plus particulièrement durant ces dernières années, fait l'objet de nombreuses études taxonomiques (**Figure 11**). En effet, au sein de ce genre sont retrouvés de nombreux complexes (e.g. complexes *Fusarium dimerum*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*) que certains taxonomistes tentent de clarifier et de décomposer en de nouveaux genres car selon les cibles moléculaires d'intérêt taxonomique employées ou les analyses réalisées, ils forment des clades distincts (Crous et al., 2021; Geiser et al., 2021; Lombard et al., 2015; O'Donnell et al., 2020). Dans ce cadre, en 2015, au cours d'une étude phylogénétique menée sur la famille *Nectriaceae* grâce au séquençage de dix gènes cibles, une reclassification de certains de ces complexes a été proposée en créant de nouveaux genres (Lombard et al., 2015). Ainsi, il a été proposé dans ladite étude d'attribuer aux espèces du complexe *Fusarium dimerum* ("*Fusarium dimerum* species complex", FDSC) le rang de genre, avec la création, de ce fait, d'un nouveau genre nommé *Bisifusarium* L. Lombard, Crous & W. Gams (Mycobank MB810226) dont le nom fait référence à leurs macroconidies à deux cellules très caractéristiques. A noter que cette taxonomie est encore à ce jour débattue comme le montre les récentes publications de Geiser et al. (2021), favorables à la précédente taxonomie, et celle de Crous et al. (2021), qui maintient la proposition des nouveaux genres (**Figure 12**). Dans le cadre de cette thèse, nous avons opté, pour l'utilisation de la taxonomie décrite par Lombard et al. (2015) car au démarrage de la thèse, elle était la plus récente.

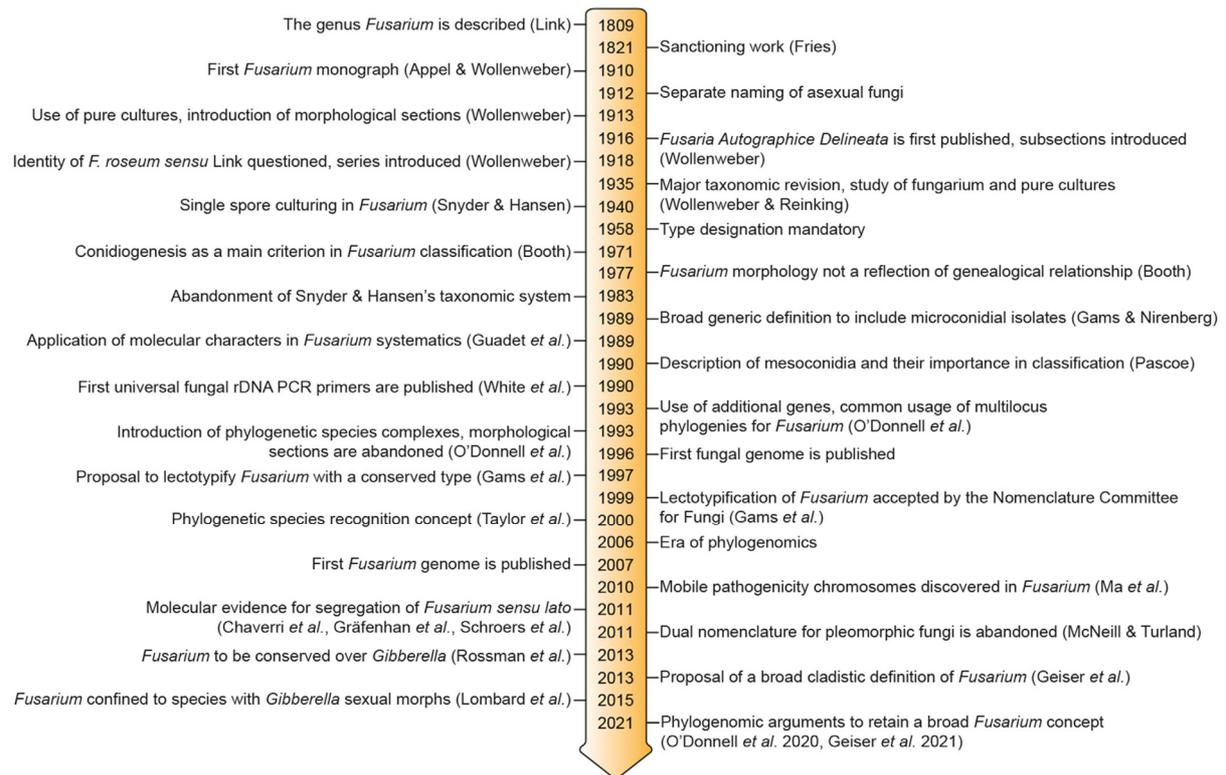


Figure 11 : Représentation chronologique des évolutions majeures sur la taxonomie et nomenclature du genre *Fusarium*. Figure tirée de Crous *et al.*, 2021.

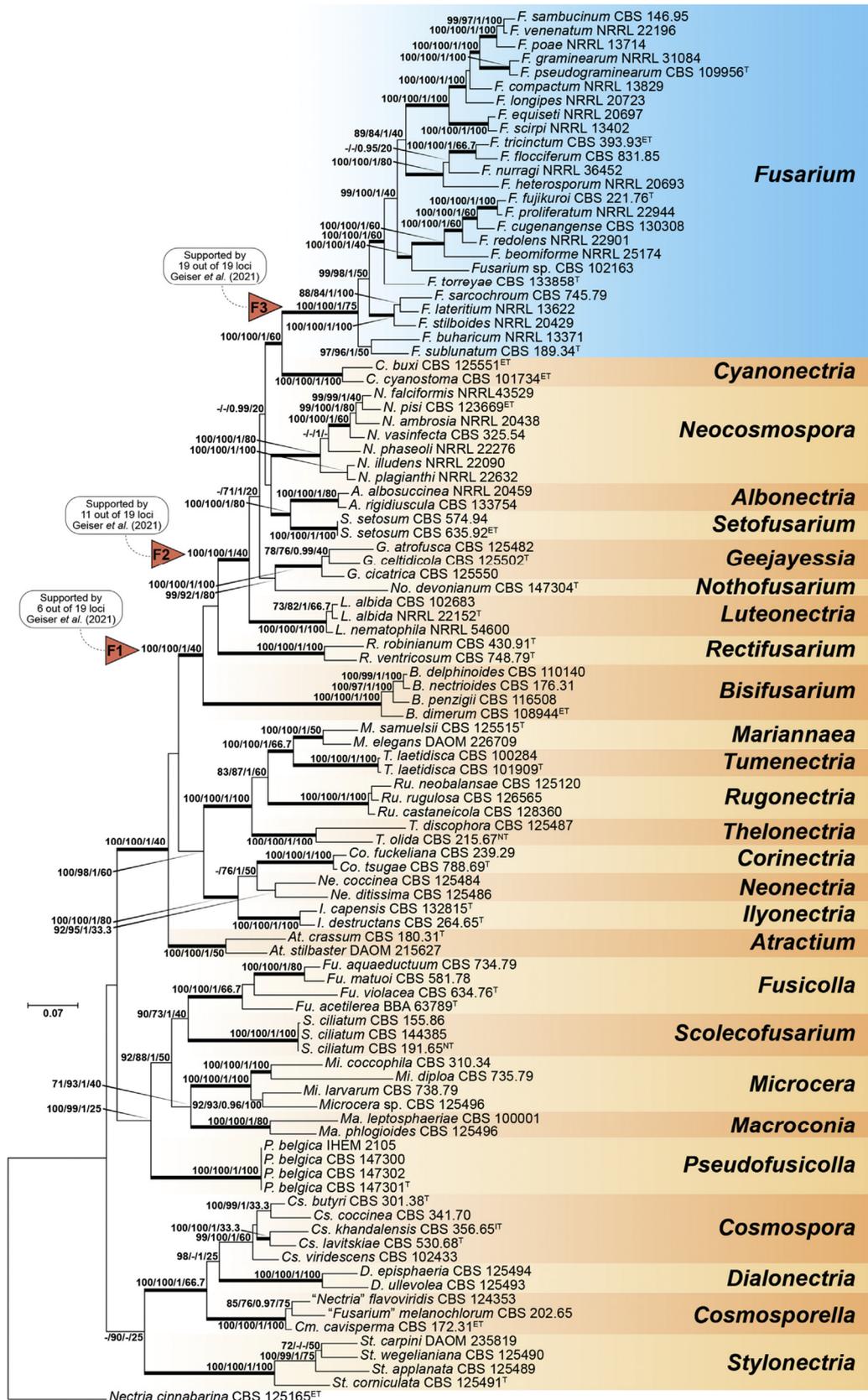


Figure 12 : Place du genre *Bisifusarium* au sein de la famille *Nectriaceae*. Arbre en Maximum-Likelihood consensus obtenu à partir des séquences ITS, LSU, rpb1, rpb2 et tef1 des membres de la famille *Nectriaceae*. Figure tirée de Crous et al., 2021.

Sur la base de cette taxonomie, le genre *Bisifusarium* incluait, jusqu'au démarrage de la thèse, huit espèces (Lombard et al., 2015 ; Sun et al., 2017) dont sept étaient présentes dans le FDSC (Schroers et al., 2009), à savoir : *B. biseptatum* (Schroers, Summerbell & O'Donnell) L. Lombard & Crous 2015, *B. delphinooides* (Schroers, Summerbell, O'Donnell & Lampr.) L. Lombard & Crous 2015, *B. dimerum* (Penz.) L. Lombard & Crous 2015, *B. domesticum* (Fr.) L. Lombard & Crous 2015, *B. lunatum* (Ellis & Everh.) L. Lombard & Crous 2015, *B. nectrioides* (Wollenw.) L. Lombard & Crous 2015 et *B. penzigii* (Schroers, Summerbell & O'Donnell) L. Lombard & Crous 2015. La huitième espèce décrite, *B. tonghuanum* B.D. Sun, Y.G. Zhou & A.J. Chen, 2017, a été isolée et identifiée plus récemment en tant que nouveau membre du genre *Bisifusarium* basé sur le séquençage de quatre gènes parmi les dix sélectionnés par Lombard et al. (2015) (Sun et al., 2017). Il est intéressant de noter qu'au sein de ce genre, les différentes espèces sont associées à des habitats particuliers. En effet, certaines sont principalement associées à un environnement naturel (sol et plantes) pouvant, dans certains cas, être phytopathogènes (e.g. *B. lunatum*) tandis que d'autres sont retrouvés dans un environnement cliniques (e.g. *B. dimerum*) étant associés à des pathologies humaines (e.g. infection au niveau des yeux), et certaines espèces peuvent être même retrouvées dans ces deux environnements (e.g. *B. delphinooides*). A l'inverse, *B. domesticum* a la particularité d'être jusqu'à présent exclusivement associé à l'environnement fromager (**Figure 13**). De ce fait, un tel lien entre une espèce donnée et un habitat donné soulève des questions en termes d'adaptation.

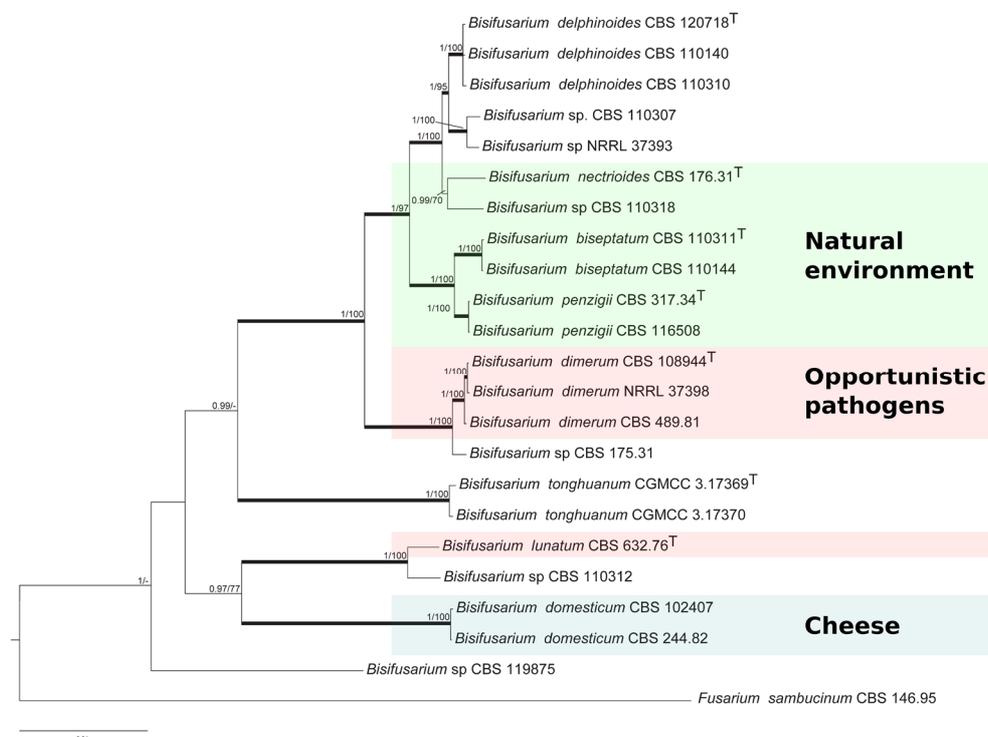


Figure 13 : Arbre phylogénétique Maximum Likelihood du genre *Bisifusarium* sur le jeu de données de séquences *LSU*, *ITS*, *tef1* et *tub2*. Figure adaptée de Sun et al., 2017.

IV.2. Caractéristiques des *Bisifusarium* spp.

IV.2.1. Caractéristiques morphologiques

Au-delà de leur position taxonomique, les espèces *Bisifusarium* se distinguent des autres espèces du genre *Fusarium* par des critères microscopiques. En effet, comme évoqué précédemment, leur courtes macroconidies, à l'inverse des *Fusarium* spp., comportent souvent deux cellules avec un maximum de trois septa (**Figure 14**). D'autre part, une autre caractéristique de ce genre, sont les courtes phialides formées de façon latérale sur les hyphes, appelées « pegs » (**Figure 15**) tandis qu'ils ne sont que rarement observés au sein du genre *Fusarium* (Gerlach and Nirenberg, 1982; Lombard et al., 2015; Schroers et al., 2009; Sun et al., 2017).

Concernant les critères microscopiques de ce genre, outre les éléments caractéristiques évoqués, il peut être noté la présence de structures conidiophores monophialidiques, rarement polyphialidiques, cylindriques, légèrement effilées vers l'apex, ou en forme de flasque, pouvant être solitaires ou agrégées. Les microconidies sont non septées ou bicellulaires et effilées aux deux extrémités, droites, ellipsoïdales, allantoïdes, réniformes ou encore pouvant être lunaires. Les macroconidies, quant à elles, peuvent être non septées ou jusqu'à trois septums, incurvées jusqu'à lunaire avec l'extrémité distale plus courbée ou bien les deux extrémités marquées. Les chlamydo-spores quant à eux peuvent être globuleuses à ellipsoïdales, solitaires ou en chaînes (descriptions de Lombard et al., 2015 et Schroers et al., 2009).

Enfin, des caractéristiques micro- et macroscopiques sont également décrites pour chacune des espèces *Bisifusarium* qui présentent par ailleurs des aspects macroscopiques contrastés (**Figure 16**).

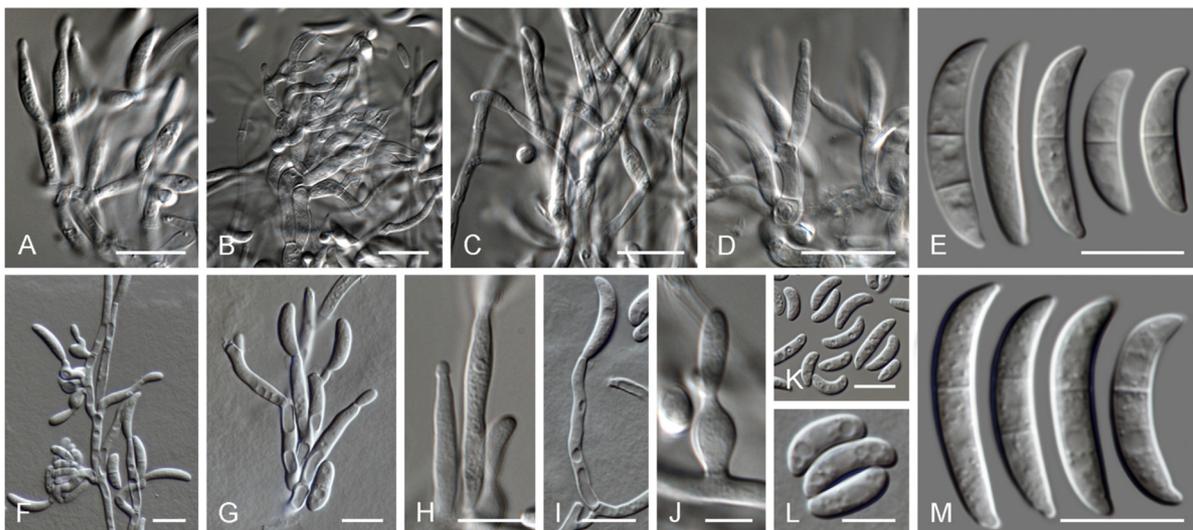


Figure 14 : Observations microscopiques de *Bisifusarium dimerum* CBS 108944 (A–E) et *Bisifusarium delphinoides* (CBS 120718 (F–M)). Sont représentées en A–D et F–J des conidiophores et cellules conidiogènes, en K et L des microconidies, puis en E et M des macroconidies. La barre d'échelle équivaut à 10 μ m sauf pour H et J où elle équivaut à 5 μ m. Figure tirée de Crous et al., 2021.

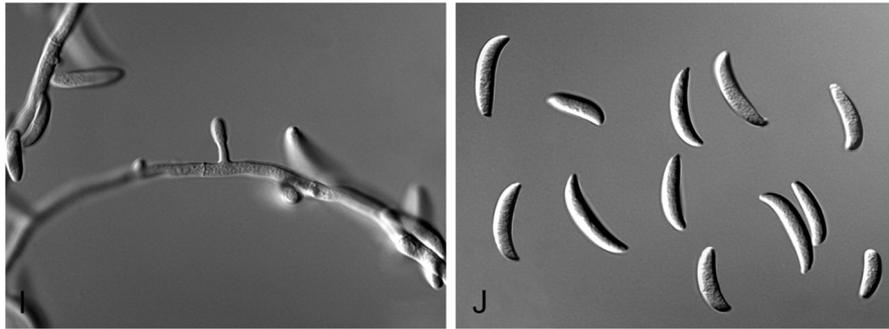


Figure 15 : Observation microscopique d'un phialide latéral « pegs » (I) et de conidies (J) de *Bisfusarium delphinoides* CBS 120718. Acquisitions tirées de Lombard et al., 2015.

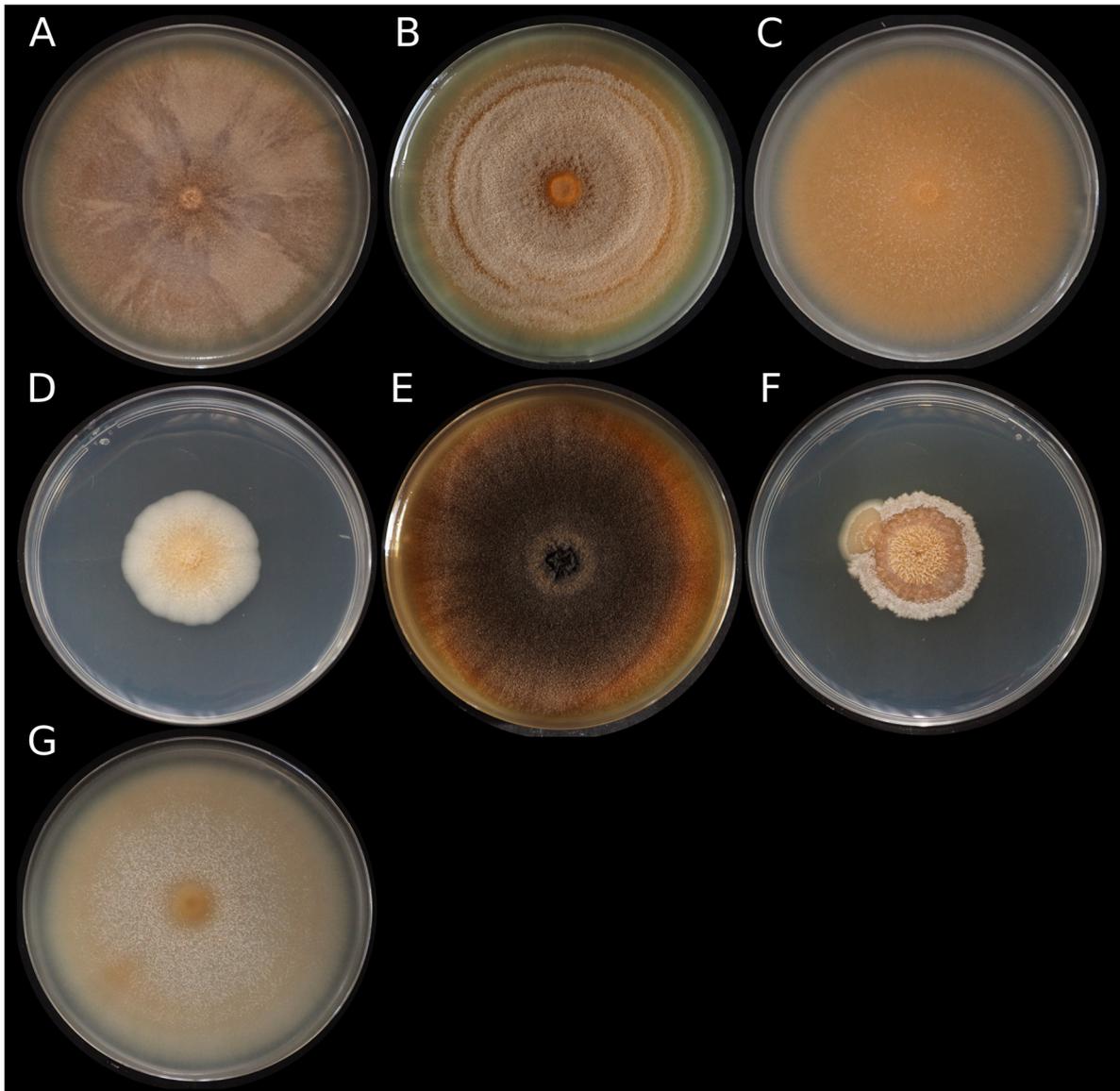


Figure 16 : Observations macroscopiques de (A) *B. biseptatum* CBS 110311^T, (B) *B. delphinoides* CBS 120718^{HT}, (C) *B. dimerum* MNHN-RF-05625^{ET}, (D) *B. domesticum* MNHN-RF-05627^{NT}, (E) *B. lunatum* CBS 632.76^{NT}, (F) *B. nectrioides* CBS 176.31^{LT} et (G) *B. penzigii* CBS 317.34^{HT}. Les cultures ont été effectuées sur PDA (inoculum 5µL à 10⁶ spores/mL) et incubées pendant quatorze jours à 25°C. Sont distingués les souches ^Ttype, ^{HT}holotype, ^{ET}epitype, ^{NT}neotype, ^{LT}lectotype.

IV.2.2. Caractéristiques physiologiques et métaboliques

Le genre *Bisifusarium*, auparavant considéré comme saprotrophe des bois ou plantes en décomposition, abrite, comme indiqué, des espèces provenant en réalité de différents habitats ayant des caractéristiques intrinsèques et extrinsèques contrastées (i.e. plantes, sols, Homme, fromage). Ces espèces sont parfois décrites en tant que phytopathogènes et/ou en tant qu'agent infectieux chez l'Homme, avec principalement des cas d'infection de l'œil chez les personnes immunocompétentes et immunodéprimées (Lombard et al., 2015; Schroers et al., 2009; Sun et al., 2017). Bien que dans la littérature existante, le FDSC soit fréquemment associé aux infections humaines et représenté dans l'environnement cliniques (Al-Maqtoofi and Thornton, 2016; O'Donnell et al., 2007; Short et al., 2011) il n'y a, jusqu'à présent, que très peu d'études menées sur ces espèces. De plus, la distinction de l'espèce étudiée au sein du complexe n'est parfois pas ou mal définie avec des identifications autrefois basées sur des critères macroscopiques et microscopiques selon les clés d'identifications décrites par Gerlach and Nirenberg (1982) ou Leslie and Summerell (2006), ce qui peut engendrer quelques confusions. On peut par ailleurs raisonnablement penser qu'avec le développement des méthodes d'identifications actuelles, leur identification dans des cas cliniques sera plus fréquente dans les années à venir.

Au sein du genre *Bisifusarium* certaines espèces sont davantage associées aux plantes et/ou sol comme *B. biseptatum*, *B. nectrioides* et *B. penzigii* qui sont associées à un environnement naturel (sol) (Schroers et al., 2009). *B. lunatum*, quant à elle, a été isolée de cactus du genre *Opuntia* ou *Gymnocycium* (Schroers et al., 2009) et peut être considéré comme phyto-pathogène de ces derniers (Flores-Flores et al., 2013; Gryzenhout et al., 2017; Mongiardino Koch et al., 2015); enfin, l'espèce *B. tonghuanum*, décrite par Sun et al. (2017), a été récemment isolée des plantes *Atriplex centralasiatica* et *Suaeda salsa*. *B. penzigii* et *B. lunatum* peuvent également être considérées comme pathogènes humains puisqu'elles ont été isolées chez l'Homme dans un cas d'ulcère de la cornée et des sinus, respectivement (do Carmo et al., 2016; Schroers et al., 2009). Concernant *B. delphinoides*, cette espèce a été isolée à partir de lésions de la plante *Hoodia gordonii* et peut être retrouvée dans les sols ou matériels végétaux (Kulkarni et al., 2011 ; Schroers et al., 2009) mais a également été, chez l'Homme, associée à des cas d'infections de la peau ou affection de l'œil (Collado et al., 2013; Hassan et al., 2016; Park et al., 2019; Pазiani et al., 2019; Salah et al., 2015; Schroers et al., 2009). Quant à *B. dimerum sensu stricto*, à l'origine isolée du cédrat (*Citrus medica* L.) (Schroers et al., 2009), cette espèce est considérée comme pathogène humain pouvant être à l'origine de mycoses importantes telles que des kératites, onychomycoses et endophtalmies endogènes (Hassan et al., 2016; Ray et al., 2016; Salah et al., 2015; Schroers et al., 2009; Simon et al., 2018). Enfin, *B. domesticum*, est la seule espèce strictement associée au fromage (Bachmann et al., 2005, 2003; Lombard et al., 2015; Ropars et al.,

2012; Schroers et al., 2009) ce qui en fait sa particularité au sein du genre *Bisifusarium*, et même plus largement parmi les *Nectriaceae*.

Comme indiqué précédemment, nous ne disposons que de très peu d'informations sur ces espèces. En ce qui concerne leurs caractéristiques de croissance, cet aspect n'a été également que très peu étudié, à l'exception de l'article de Schroers et al. (2009) qui indique que les températures optimales sont situées entre 27 et 30°C pour *B. biseptatum*, *B. delphinooides*, *B. dimerum*, *B. penzigii* et *B. lunatum* tandis que pour *B. nectrioides*, une température optimale entre 24 et 30°C est rapportée. Enfin, une température optimale plus basse pour *B. domesticum*, entre 21 et 24°C, est indiquée, ce qui peut laisser supposer une température minimale potentiellement plus basse que les précédentes espèces citées. Ce point est *a priori* en accord avec le fait que les températures de production des fromages sont plus basses que celles rencontrées dans les autres environnements cités (entre 8 et 15°C au cours de l'affinage).

D'un point de vue métabolique, il a été noté, pour *B. dimerum*, une production intéressante d'énatiines qui sont connues pour leurs propriétés antibiotiques, antifongiques et phytotoxiques (Buchtová et al., 2014). De plus, il a été montré que les espèces du genre *Bisifusarium* pourraient également produire de l'acide dimerumique (molécule ayant des propriétés antioxydantes et hépatoprotectrice -Aniya et al., 2000; Lai et al., 2019) et de l'indole acide acétique (phytohormone de la famille des auxines) (Crous et al., 2021; Diekmann, 1970; Kulkarni et al., 2011, 2013).

IV.2.3. Caractéristiques de *B. domesticum*

Historiquement, la mise en évidence de *B. domesticum* est due à une étude menée sur différentes variétés de fromages Suisses à croûte affinée (e.g. Gruyère, Raclette, Appenzeller) pour lesquelles le développement d'une morge collante (surface du fromage) avait été constatée (Bachmann et al., 2003). Tandis que le but de l'étude était de comprendre l'origine de ce développement, un lien a pu être fait, entre le développement naturel d'une moisissure et des fromages présentant une croûte exempte de l'altération, d'où le nom vernaculaire "*Anticollanti*" (pour anti-collant) avant l'identification de cette espèce en 2005 (Bachmann et al., 2005). Cette capacité anti-collante a par ailleurs été démontrée dans le premier article cité (Bachmann et al., 2003), mettant en évidence que l'ajout de *B. domesticum* dans l'eau de lavage permettait son développement à la surface du fromage et l'assèchement de la croûte ce qui limitait alors l'aspect collant. Toutefois, à ce jour le mécanisme lié à cette capacité reste encore inconnu. De plus, il a également été noté que son utilisation n'engendrait pas de décoloration de la surface du fromage. Concernant son identification, l'étude de 2005 a permis d'identifier "*Anticollanti*" comme identique à la souche CBS 434.34 appartenant à l'espèce *Trichothecium domesticum*, sur la base du gène ADN ribosomique 28S.

Cependant, cette même étude met en évidence que cette espèce serait plus proche phylogénétiquement de l'espèce *Fusarium dimerum* que de *Trichothecium roseum* et posséderait également des critères microscopiques allant dans ce sens (présence de phialides et production de conidies similaires à ceux de *F. dimerum*). Ainsi, sur la base de ces résultats, le nom taxonomique *Fusarium domesticum* (Fries: Fries ex Sacc.) Bachmann, comb. nov. Basionym *Trichothecium domesticum*, Sylloge Fungorum 4: 179, 1886 a pu être proposé. C'est ensuite dix ans plus tard, que comme indiqué, l'utilisation d'approches multigéniques a conduit à une reclassification en tant que *Bisifusarium domesticum* (Lombard et al., 2015). A noter que *T. domesticum* était auparavant nommée en tant que *Cylindrocarpon* sp. (Ratomahenina et al., 1995) ce qui peut également être source d'ambiguïtés dans certains articles ou même collections.

Macroscopiquement, *B. domesticum* a des colonies de couleurs blanches à jaunâtres formant un mycélium dense bien accroché à la gélose avec quelques hyphes aériens (Bachmann et al., 2005 et observations personnelles sur l'ensemble de la collection) (**Figure 17**) tandis que sa croissance sur fromage se caractérise par un aspect blanchâtre poudreux à rosé (Wolfe, 2014). Microscopiquement, les phialides sont cylindriques et légèrement effilées à l'extrémité et peuvent mesurer 10 à 70 μm de long et 3,5 à 4 μm de large à la base et 1,5 à 2 μm à l'extrémité. Les conidies sont non septées ou bicellulaires pouvant mesurer 7–17 x 3,5–5 μm et sont de forme ellipsoïdale à cylindriques, droits et légèrement effilés. Enfin, des chlamydospores intercalaires sous-globuleux en courtes chaînes peuvent être observés (description de Schroers et al., 2009).



Figure 17 : Observation macroscopique de *B. domesticum* MNHN-RF-05627^{NT} (A) et microscopique de *B. domesticum* UBOCC-A-120004 avec un montage au bleu coton (B et C). Les cultures ont été effectuées sur PDA et incubées pendant quatre semaines à 25°C.

Destinée à être appliquée dans un contexte fromager et donc alimentaire, l'innocuité de *B. domesticum* a été succinctement étudiée via la recherche (Bachmann et al., 2005) de métabolites secondaires délétères tels que les mycotoxines (e.g. déoxynivalénol, fumonisine, trichothécènes et zéaralénone, produites par certaines espèces *Fusarium*). Dans ce contexte, aucune production de

métabolites cytotoxiques ni de propriétés antibiotiques n'a été détectée. Cependant, il est important de souligner que cette étude n'a été réalisée que sur une seule souche de *B. domesticum* (CBS 109209).

En conclusion, cet état de l'art montre clairement un déficit de connaissances sur ce micro-organisme pourtant utilisé quotidiennement pour la production fromagère en tant qu'auxiliaire technologique, ajouté volontairement par le fromager pour la production et l'affinage de certains fromages. Comme indiqué, son utilisation dans le contexte fromager a en particulier pour but de limiter le défaut de morge collante qui peut être observé pour certains fromages de type Raclette; cependant, cette espèce n'ayant pas été davantage étudiée il se pourrait qu'elle présente d'autres intérêts en production fromagère. Ce constat est à la base de la thèse dont les objectifs sont présentés ci-après.

V. Objectifs des travaux de thèse

Au regard des éléments présentés précédemment, l'objectif principal de cette thèse était donc de contribuer à une connaissance fine de *B. domesticum*, micro-organisme d'importance en production fromagère mais pour lequel le déficit de connaissance est patent. Pour ce faire, le travail de thèse a consisté à apporter des éléments de réponses à un certain nombre de questionnements scientifiques existants.

Ainsi, on peut s'interroger de prime abord quant aux diversités phénotypique et génétique, au sein de cette espèce et la possible existence de populations pouvant être associées à un environnement donné comme cela a été étudié sur *P. roqueforti* (Dumas et al., 2020; Gillot et al., 2015; Ropars et al., 2014).

Par ailleurs, comme évoqué précédemment, au sein du genre *Bisifusarium* et plus largement au sein des *Nectriaceae*, *B. domesticum* était la seule espèce décrite dans l'habitat fromager et, qui plus est, est à ce jour exclusivement associée à cette matrice. A l'inverse, les autres *Bisifusarium* spp. ont été associés soit aux environnements "sol" et "plantes", pouvant être phytopathogènes ou bien associés à des pathologies humaines. De ce fait, l'exclusivité de l'association de *B. domesticum* à son habitat interroge naturellement sur son adaptation audit habitat et donc sur sa physiologie.

En termes de potentiel technologique, au-delà de l'effet *anticollanti*, il existe bon nombre de questions du point de vue organoleptique (e.g. production de composés volatiles, activité lipolytique et protéolytique) ou encore antimicrobien. Cette espèce a été décrite comme ne présentant pas *a priori* de caractère mycotoxinogène (Bachmann et al., 2005). Sa production d'extrolites et son potentiel génétique de production de métabolites secondaires sont donc d'intérêt, d'autant plus que

cette espèce est phylogénétiquement proche d'espèces connues comme étant productrices de mycotoxines telles que les fumonisines, trichothécènes ou zéaralénone.

Ainsi, au démarrage, cette thèse s'articulait autour de trois grands questionnements scientifiques, qui feront chacun l'objet d'un chapitre dédié dans de ce manuscrit, à savoir :

- 1. Quelle est la diversité génétique au sein de l'espèce *B. domesticum* ?**
- 2. Existe-t-il une adaptation de *B. domesticum* aux matrices fromagères ?**
- 3. Quelle est la diversité fonctionnelle au sein de l'espèce *B. domesticum* ?**

Afin de pouvoir répondre à ces questions de diversité génétique, physiologique et fonctionnelle au sein de l'espèce *Bisifusarium domesticum*, la première étape a consisté à mettre en place une collection d'isolats la plus large possible, en supplémentant les collections existantes par des isollements à partir de divers fromages. Cette investigation a, par ailleurs, conduit à la mise en évidence de nouvelles espèces putatives de *Nectriaceae*. Sur la base de cette collection trois axes d'études ont été entrepris et feront l'objet des chapitres de ce manuscrit de thèse :

i) une étude génétique inter-espèces, visant à décrire quatre nouvelles espèces de *Nectriaceae* associées aux fromages, et intra-espèce, visant à évaluer s'il existait ou non diverses populations au sein de l'espèce *B. domesticum*. Du fait de leur association avec la matrice fromagère, ces quatre nouvelles espèces ont été étudiées en même temps que *B. domesticum* pour la suite des travaux.

ii) une étude physiologique afin de décrire les caractéristiques de croissance complètes des isolats d'intérêt et, en parallèle, étudier la question de l'adaptation au fromage via l'étude de l'impact de divers facteurs abiotiques et milieux de culture.

iii) une étude fonctionnelle permettant d'évaluer le potentiel métabolique de *B. domesticum* (lipolyse, protéolyse, production de composés aromatiques et métabolites secondaires, couplée pour ces derniers à une étude génomique ciblée sur les voies de biosynthèse associées).

Résultats

Chapitre I : Etude de la diversité inter- et intraspécifique

I. Introduction et stratégie expérimentale

Pour pouvoir évaluer les diversités génétique, phénotypique et fonctionnelle au sein d'une espèce, il est nécessaire de disposer d'une collection d'isolats la plus représentative possible. Après avoir sollicité toutes les collections de cultures ayant des souches de *B. domesticum* dans leur catalogue, la collection de travail ne comptait que 16 isolats, dont trois ferments communément utilisés par les industriels (vendus par Agroscope, le Laboratoire Interprofessionnel de Production –LIP- et Danisco). Afin de compléter cette collection, une phase d'isolements a été effectuée à partir de croûtes de 46 fromages susceptibles de présenter une croissance de *B. domesticum* tels que du Saint-Nectaire, de la Raclette, du Reblochon et autres fromages à croûte lavée provenant de France (n=26), Suisse (n=14), Italie (n=4), Espagne (n=1) et Canada (n=1).

Comme présenté en introduction de cette thèse, une importante diversité fongique caractérise les croûtes de ces fromages qui sont par ailleurs susceptibles d'être colonisées par des *Mucor* spp., en particulier le Saint-Nectaire pour lequel l'occurrence de *Mucor* spp. et de *B. domesticum* inoculé est connue. La croissance rapide des Mucorales peut alors être un frein considérable pour les isolements d'autres espèces. Aussi, en plus d'un milieu classique de culture des champignons "malt yeast extract agar" (M2Lev) supplémenté en antibiotiques (pénicilline et streptomycine), le milieu "Dichloran glycerol chloramphenicol" (DG18), connu pour diminuer la taille des thalles, a été sélectionné après s'être assuré qu'il n'empêchait pas la croissance de *B. domesticum* et limitait bien celle des *Mucor* spp. (essais sur *M. fuscus* et *M. lanceolatus*) (résultats non présentés).

Sur la totalité des échantillons analysés, 30 isolats ont été sélectionnés sur la base d'observations macroscopiques et microscopiques évoquant un phénotype "*Fusarium-like*", et complétés par des isolats provenant d'études d'autres chercheurs. Puis une identification par un séquençage du facteur d'élongation alpha (*tef1*) a été entreprise. Ainsi, cette étape nous a permis d'enrichir la collection pour atteindre un total de 25 isolats de *B. domesticum*. De plus, nous avons pu entrevoir la diversité fongique importante qu'abrite les fromages, notamment par la présence d'autres espèces telles que *Geotrichum* spp., *Mucor* spp., *Penicillium* spp. et *Scopulariopsis* spp. (sur la base de critères macro et/ou microscopiques uniquement) mais aussi de *Fusarium* spp. via l'identification d'isolats des

espèces de *F. babinda*, *F. culmorum*, *F. oxysporum* et *F. solani sensu lato*. Enfin, une diversité inattendue a été mise en évidence par la présence de onze isolats non identifiés à l'espèce sur la base de l'analyse de la séquence du gène *tef1*. Les séquences obtenues étaient proches de celles d'autres espèces *Fusarium* et semblaient correspondre potentiellement à quatre nouvelles espèces distinctes.

Après une analyse phylogénétique préliminaire, de par leur proximité évidente avec le genre *Fusarium* et même *Bisifusarium*, il nous a semblé pertinent d'identifier finement ces isolats. Ainsi, l'identification a été effectuée, d'une part, en réalisant une analyse phylogénétique, en amplifiant et séquençant, pour les onze isolats, les dix mêmes gènes que ceux utilisés dans l'étude de Lombard et al. (2015), qui redéfinissait la taxonomie des *Nectriaceae* avec la description, notamment, du nouveau genre *Bisifusarium*, et d'autre part, grâce à des critères micro- et macroscopiques mais également une évaluation du profil de production de métabolites secondaires (**partie II.**). L'ensemble de cette étude a conduit à la description de quatre nouvelles espèces et a fait l'objet d'une publication (**publication n°1**). Pour les descriptions d'espèces fongiques, comme évoqué dans l'introduction générale, plusieurs méthodes existent comme la GC-PSR (Taylor et al., 2000) ou bien des méthodes plus probabilistes, basées sur la théorie de la coalescence (Chethana et al., 2021). Cependant, ces approches nécessitent un nombre d'isolats important pour chaque population testée. Or ici nous n'avions collecté qu'un nombre réduit d'isolats pour chaque clade défini par nos analyses phylogénétiques. C'est la raison pour laquelle, par défaut nous nous sommes basés sur une analyse de plusieurs gènes concaténés en définissant les espèces sur la base de l'analyse des groupes réciproquement monophylétiques et supportés statistiquement (valeur de bootstrap > 70 % et probabilité postérieure bayésienne > 90%). Il est cependant avéré que cette approche peut aboutir vraisemblablement à une surestimation de la vraie diversité des espèces (Hilário et al., 2021). Mais il convient également de souligner que la description de différentes espèces de *Nectriaceae* (Lombard et al., 2015) ont été conduites en utilisant cette dernière approche.

Sur la base de l'analyse multi-phylogénétique précédemment effectuée par Lombard et al. (2015), les séquences nucléotidiques analysées dans cette dernière étude ont été utilisées et complétées par les séquences de ces dix mêmes loci sur nos isolats. C'est à partir de ce jeu amendé de données que nous avons reconstruit un arbre phylogénétique et défini le positionnement des nouvelles espèces putatives sur la base des divergences nucléotidiques entre les différents clades. A la suite de cette première analyse phylogénétique, l'exploitation des séquences complètes de 40 génomes de *Nectriaceae* via une reconstruction phylogénomique basée sur l'utilisation de 2724 groupes d'orthologues simple copie a ensuite été menée (**parties III.**), afin de répondre avec cette précédente étude à la question suivante : **Quel est le positionnement taxonomique de ces nouvelles espèces isolées des fromages ?**

La constitution de la collection de *B. domesticum* nous a aussi permis d'aborder des questions de diversité génétique intraspécifique et de structure de populations, comme cela a déjà pu être fait pour d'autres moisissures associées aux fromages (i.e. *P. roqueforti* et *P. camemberti*). Ainsi, la **partie IV.** de ce même chapitre vise à répondre à la question suivante : **Existe-t'il une diversité génétique au sein de *B. domesticum* ?**

Enfin, les points saillants de ce premier axe d'étude seront rappelés à la fin de ce chapitre (**partie V.**) et discutés dans la discussion générale de ce manuscrit.

II. Article publié dans le journal *Mycosphere*

Savary O., Coton M., Frisvad J.C., Nodet P., Ropars J., Coton E. and Jany J-L. (2021). Unexpected *Nectriaceae* species diversity in cheese, description of *Bisifusarium allantoides* sp. nov., *Bisifusarium penicilloides* sp. nov., *Longinectria* gen. nov. *lagenoides* sp. nov. and *Longinectria verticilliforme* sp. nov. *Mycosphere* 12(1), 1077–1100, Doi 10.5943/mycosphere/12/1/13

Le journal “*Mycosphere*” a un “impact factor” de 4,11 et se situe dans le quartile 1 dans la catégorie : “Ecology, Evolution, Behavior and Systematics”.



Article

Doi 10.5943/mycosphere/12/1/13

Unexpected *Nectriaceae* species diversity in cheese, description of *Bisifusarium allantoides* sp. nov., *Bisifusarium penicilloides* sp. nov., *Longinectria* gen. nov. *lagenoides* sp. nov. and *Longinectria verticilliforme* sp. nov.

Savary O¹, Coton M¹, Frisvad JC², Nodet P¹, Ropars J³, Coton E¹ and Jany J-L^{1#}

¹Univ Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne, F-29280 Plouzané, France

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

³Ecologie Systématique et Evolution, Université Paris-Saclay, CNRS, AgroParisTech, 91400 Orsay, France

Savary O, Coton M, Frisvad JC, Nodet P, Ropars J, Coton E and Jany J-L 2021 – Unexpected *Nectriaceae* species diversity in cheese, description of *Bisifusarium allantoides* sp. nov., *Bisifusarium penicilloides* sp. nov., *Longinectria* gen. nov. *lagenoides* sp. nov. and *Longinectria verticilliforme* sp. nov. Mycosphere 12(1),1077-1100, Doi 10.5943/mycosphere/12/1/13

Abstract

Investigation of various cheese rinds for *Bisifusarium domesticum* revealed a completely unexpected diversity of *Fusarium*-like fungi. Elongation factor 1-alpha gene sequence data, classically used for *Fusarium* spp. identification, suggested that some isolates corresponded to so far undescribed *Nectriaceae* species. In this context, a multi-gene phylogenetic analysis, based on ten loci, namely the large subunit of the ATP citrate lyase (*acII*), alpha-actin (*act*), calmodulin (*cmdA*), histone H3 (*his3*), the internal transcribed spacer region and intervening 5.8S nrRNA (*ITS*), 28S large subunit (*LSU*), RNA polymerase II largest subunit (*rpb1*), RNA polymerase II second largest subunit (*rpb2*), translation elongation factor 1-alpha (*tef1*) and β -tubulin (*tub2*), was therefore performed to determine the phylogenetic position of ten cheese and one environmental isolates. Phylogenetic reconstructions were then done using a *Nectriaceae* sequence dataset. Additionally, morphological observations as well as metabolite profiling were performed. Results clearly revealed the existence of four novel cheese-associated species, namely *Bisifusarium allantoides*, *Bisifusarium penicilloides*, *Longinectria lagenoides*, *Longinectria verticilliforme*, the two latter belonging to a novel genus (*Longinectria* gen. nov.).

Keywords – Fungi – *Fusarium*-like – Phylogeny – Taxonomy

Introduction

Cheese making dates back at least 8000 years (Fox & Guinee 2020) and in some cheeses, fungi play a major role during cheese ripening by contributing to their organoleptic richness and diversity (Irlinger et al. 2015). The most well-known examples worldwide are probably

moldy rind soft cheeses (e.g. Brie and Camembert) produced using *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum*, and blue-veined cheeses (e.g. Roquefort, Gorgonzola, Stilton) produced with *Penicillium roqueforti* (Cheeseman et al. 2014, Gillot et al. 2017, Dumas et al. 2020). Beyond these emblematic examples, other moulds contribute to cheese making (e.g. *Mucor* spp., *Scopulariopsis* spp. or *Bisifusarium domesticum*) (Hermet et al. 2012, Morin-Sardin et al. 2016, Dupont et al. 2017, Lebreton et al. 2020). During the last decades, many studies have revealed that cheeses harbour substantial fungal diversity (Ropars et al. 2012, Wolfe et al. 2014, Hermet et al. 2014, Dugat-Bony et al. 2016). These fungi may be either indigenous, originating from the ripening rooms or cheese environment, or voluntarily inoculated as adjunct cultures. At least part of the main species associated with cheese making are thought to have undergone a domestication process (i.e. adaptive divergence under human pressure at a human time scale), as observed for the emblematic *P. camemberti* and *P. roqueforti* species (Ropars et al. 2015, 2016, 2017, 2020, Bodinaku et al. 2019, Dumas et al. 2020), or have been described as well adapted to the cheese substrate, such as *Mucor* spp. found in Tomme (Morin-Sardin et al. 2016). Besides the above mentioned species, which have been extensively studied, common cheese taxa such as *Scopulariopsis* spp. or *B. domesticum* have been seldomly investigated (Ropars et al. 2012). The latter species is commonly used by cheesemakers as an adjunct culture for cheese productions (e.g. Saint-Nectaire, Reblochon), and in some cases, to prevent excessive surface stickiness (e.g. Raclette, Gruyère, Appenzeller), a property from which its trivial name “*Anticollanti*” is derived (Bachmann et al. 2003, 2005). To date, *B. domesticum* has been solely isolated from cheese and is the only species within the family *Nectriaceae* associated with this food matrix. It was originally identified as *Trichothecium domesticum*, then described as *Fusarium domesticum* by Bachman et al. (Bachmann et al. 2003, 2005). Recently, nomenclatural changes divided *Fusarium* into seven different genera (Lombard et al. 2015, Sandoval-Denis et al. 2018, 2019). *Fusarium domesticum* was therefore assigned to the new genus *Bisifusarium* (and named *B. domesticum*) along with six other taxa previously assigned to the *Fusarium dimerum* species complex (FDSC) (Schroers et al. 2009, Lombard et al. 2015), namely *B. biseptatum* (Schroers, Summerbell & O’Donnell) Lombard & Crous, 2015, *B. delphinoides* (Schroers, Summerbell, O’Donnell & Lampr.) Lombard & Crous, 2015, *B. dimerum* (Penz.) Lombard & Crous 2015, *B. domesticum* (Fr.) Lombard & Crous 2015, *B. lunatum* (Ellis & Everh.) Lombard & Crous 2015, *B. nectrioides* (Wollenw.) Lombard & Crous 2015 and *B. penzigii* (Schroers, Summerbell & O’Donnell) L. Lombard & Crous, 2015 (Lombard et al. 2015). An eighth species, *Bisifusarium tonghuanum* B.D. Sun, Y.G. Zhou & A.J. Chen, 2017, was also recently added to the genus (Sun et al. 2017). Species within the genus *Bisifusarium* were described as having short macroconidia with a maximum of three septa and short phialides arising as lateral pegs from the hyphae (Gerlach & Nirenberg 1982, Schroers et al. 2009, Lombard et al. 2015, Sun et al. 2017).

It is noteworthy that the circumscription of the *Fusarium* genus, and consecutively the definition of *Bisifusarium* has recently been highly debated (Crous et al. 2021 vs Geiser et al. 2021) and, so far, no consensus nomenclature has been provided.

Accessing a large number of isolates is crucial for studying a species of interest. We therefore investigated different cheeses to create a large working collection of *B. domesticum* (*F. domesticum sensu* Geiser et al. 2020) isolates which led to the isolation and identification of various *Fusarium*-like isolates. Sequencing of the translation elongation factor 1-alpha used for rapid isolate identifications highlighted an unexpected diversity within the *Nectriaceae* family for four putative novel taxa. In order to clarify the taxonomic position of these four taxa, a multi-gene phylogenetic analysis using the ten gene set described by Lombard et al. (2015) was performed. To complete this description, morphological characters and secondary metabolite profiles were determined.

Material & Methods

Fungal isolations from cheeses

In total, fifty-six cheeses were analysed. On the one hand, forty-six different cheeses (from France, Switzerland, Italy, Spain and Canada), including artisanal and industrial cheeses, were obtained for fungal isolations. For each cheese sample, 10 g of rind were removed using a sterile scalpel, transferred into 90 mL of Tween 80 (0.015% v/v) in a sterile stomacher bag equipped with a filter membrane and mixed for 180 seconds using a Stomacher homogenizer (AES, France). Serial dilutions of the homogenate were spread on dichloran glycerol chloramphenicol selective agar (DG18, Millipore, Merck, Germany) and malt yeast extract agar (M2Lev) supplemented with antibiotics (20 g/L malt extract, 3 g/L yeast extract 15 g/L agar, 100 mg/L penicillin and 100 mg/L streptomycin). Agar plates were incubated at 25°C for 7 days. Fungal colonies harbouring typical macroscopic and/or microscopic characters of *B. domesticum* or *Fusarium*-like fungi were further isolated and purified on M2Lev medium. On the other hand, analysis of ten different cheeses by international colleagues allowed us to increase the number of *Fusarium*-like isolates. All isolates were conserved at -80°C in 10% glycerol (v/v).

DNA extraction, PCR amplification and sequencing

DNA extractions were performed on seven to ten-day monospore cultures grown on M2Lev medium using the FastDNA SPIN kit (MP Biomedicals, Fisher Scientific) according to manufacturer recommendations. Each DNA extract was diluted to 40 ng/μL and stored at -20°C until PCR amplification.

Firstly, sequencing of the translation elongation factor 1-alpha (*tef1*) was used for species identification. Generated sequence data was compared to the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Then, a subset of thirteen representative isolates, including eleven unidentified ones, was selected and used for the phylogenetic study (Table 1).

Secondly, their phylogenetic position was assessed using the ten loci and same primers as those described by Lombard et al. (2015) which was the only set available at the beginning of this study. Pending adoption of a consensus taxonomy, we named taxa according to the nomenclature proposed by the same authors. The ten loci corresponded to the large subunit of the ATP citrate lyase (*acl1*), alpha-actin (*act*), calmodulin (*cmdA*), histone H3 (*his3*), the internal transcribed spacer region and intervening 5.8S nrRNA (*ITS*), 28S large subunit (*LSU*), RNA polymerase II largest subunit (*rpb1*), RNA polymerase II second largest subunit (*rpb2*), translation elongation factor 1-alpha (*tef1*) and β-tubulin (*tub2*) genes. PCR mixtures (Table 2) using the different primers are detailed in Table S1. Specific PCR amplifications were checked after migration of resulting amplicons on a 1% (w/v) agarose gel in 1X Tris-acetate-EDTA buffer (molecular biology grade, Promega). Sequencing was performed using the different forward and reverse primers by Eurofins Genomics platform (Ebersberg, Germany). Contig assembly was done using Geneious prime v2020.0.3. The sequences generated and used in the phylogenetic analysis were deposited in GenBank under accession numbers detailed in Table 1.

Dataset preparation

Since a preliminary phylogenetic reconstruction performed using *tef1* sequences nested all the isolates of interest within the IX to XII clades described in Lombard et al. (2015) (data not shown), for each of the ten analyzed loci, a first dataset, consisting of the sequences of the isolates of interest from our collection as well as 57 sequences corresponding to unique representative strains of each taxon from those four clades, was established (Table S2). An additional reduced dataset that included only *ITS*, *LSU*, *rpb1*, *rpb2*, *tef1* and *tub2* genes

sequences from the first dataset identified as pertaining to *Bisifusarium*, based on the phylogenetic reconstruction obtained with the full dataset in the present study, was used to confirm that the four loci missing for *B. tonghuanum* had no impact on the positioning of several isolates (despite our best efforts, additional sequence data could not be obtained due to the unavailability of any *B. tonghuanum* strain).

Alignment and phylogenetic reconstruction

Sequences of the ten loci: *acl1*, *act*, *cmdA*, *his3*, *ITS*, *LSU*, *rpb1*, *rpb2*, *tef1* and *tub2* were aligned independently using MAAFT v7.450 (Kuraku et al. 2013, Katoh et al. 2019) with the Auto algorithm as implemented in Geneious prime v2020.0.3. Introns and exons were separated in each dataset. Alignment of the exonic region was ascertained by checking the deduced translated aminoacyl alignment and alignment of the intronic regions was edited using Gblocks b0.91b

(http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html) with all the options enabled to allow less stringent selection, discard highly ambiguous regions and ensure reproducibility. Since phylogenetic incongruence between the different genes was not detected ($P = 0.001$) by performing an Incongruence Length Difference (ILD) test on 1000 replicates as implemented in PAUP 4.0a166 (Swofford 2003), the whole dataset was used after concatenation of the ten individual alignments.

Table 1 Information for strains sequenced for the phylogenetic analyses

Species	Isolate	Substrate	Collector and/or Depositor	Locality	GenBank Accession No.									
					<i>acl1</i>	<i>act</i>	<i>cmdA</i>	<i>his3</i>	<i>ITS</i>	<i>LSU</i>	<i>rpb1</i>	<i>rpb2</i>	<i>tef1</i>	<i>tub2</i>
<i>Bisifusarium allantooides</i>	UBOCC-A-120035	Cheese (Manchego)	O. Savary	Spain	MW810987	MW811002	MW811017	MW811031	MW654536	MW654511	MW811046	MW811060	MW811075	MW811090
	UBOCC-A-120036 ^T	Soft cheese type	F. Deniel	France	MW810999	MW811014	MW811029	MW811044	MW654548	MW654523	MW811054	MW811072	MW811087	MW811102
	UBOCC-A-120037	Soft cheese type	F. Deniel	France	MW811000	MW811015	MW811030	MW811040	MW654549	MW654524	MW811055	MW811073	MW811088	MW811103
<i>Bisifusarium bisepatum</i>	CBS 110311 ^T	Soil	P. Nelson & W. Marasas	South-Africa	MW810998	MW811013	MW811028	MW811039	MW654547	MW654522	MW811053	MW811071	MW811086	MW811101
<i>Bisifusarium dimerum</i>	MNHN RF-05625 ^T	<i>Homo sapiens</i>	H. Ph. Endtz	Netherlands	MW810997	MW811012	MW811027	MW811038	MW654546	MW654521	MW811058	MW811070	MW811085	MW811100
<i>Bisifusarium penicilloides</i>	UBOCC-A-120021 ^T	Cheese (Mont d'Or)	O. Savary	France	MW810993	MW811008	MW811023	MW811035	MW654542	MW654517	MW811051	MW811066	MW811081	MW811096
	UBOCC-A-120034	Cheese (Mont d'Or)	O. Savary	France	MW810992	MW811007	MW811022	MW811034	MW654541	MW654516	MW811050	MW811065	MW811080	MW811095
	VTT-D-041022	Surface of sandstone building, Arbroat Abbey	Suihko et al.	Scotland, UK	MW810986	MW811001	MW811016	MW811041	MW654535	MW654510	MW811045	MW811059	MW811074	MW811089
<i>Fusarium babinda</i>	UBOCC-A-120044	Raw cow's milk cheese	O. Savary	France	MW810995	MW811010	MW811025	MW811037	MW654544	MW654519	-	MW811068	MW811083	MW811098
<i>Fusarium solani s.l.</i>	UBOCC-A-120045	Raw cow's milk cheese	O. Savary	France	MW810996	MW811011	MW811026	-	MW654545	MW654520	MW811052	MW811069	MW811084	MW811099
<i>Longinectria lagenoides</i>	ESE 00140	Cheese (Tilsit)	J. Ropars	France	MW810994	MW811009	MW811024	MW811036	MW654543	MW654518	MW811057	MW811067	MW811082	MW811097
	UBOCC-A-120038	Cheese (Raclette d'alpage)	O. Savary	France	MW810988	MW811003	MW811018	MW811042	MW654537	MW654512	MW811047	MW811061	MW811076	MW811091
	UBOCC-A-120039 ^T	Cheese (Vacherin Fribourgeois)	O. Savary	France	MW810990	MW811005	MW811020	MW811032	MW654539	MW654514	MW811048	MW811063	MW811078	MW811093

Table 1 Continued.

Species	Isolate	Substrate	Collector and/or Depositor	Locality	GenBank Accession No.									
					<i>acl1</i>	<i>act</i>	<i>cmdA</i>	<i>his3</i>	<i>ITS</i>	<i>LSU</i>	<i>rpb1</i>	<i>rpb2</i>	<i>tef1</i>	<i>tub2</i>
<i>Longinectria verticilliforme</i>	UBOCC-A-120041	Raw cow's milk cheese	O. Savary	France	MW810989	MW811004	MW811019	MW811043	MW654538	MW654513	MW811056	MW811062	MW811077	MW811092
	UBOCC-A-120043 ^T	Cheese (Alpeggio)	O. Savary	France	MW810991	MW811006	MW811021	MW811033	MW654540	MW654515	MW811049	MW811064	MW811079	MW811094

Table 2 PCR amplification mix for the ten loci

	<i>acl1</i> , <i>rpb1</i> , <i>rpb2</i> , <i>tub2</i>	<i>act</i>	<i>cmdA</i>	<i>his3</i>	<i>ITS</i> , <i>LSU</i>	<i>tef1</i>
PCR Buffer (X)	1	1	1	1	1	1
MgCl₂ (mM)	1.5*	2	2	2	2	1.5
Primers (μM)	0.2	0.5	0.2	0.08	0.2	0.15
dNTPs (mM)	0.2	0.2	0.08	0.2	0.2	0.3
GoTaq DNA polymerase (Promega) (U/μL)	0.025	0.05	0.02	0.025	0.025	0.025

*For some isolates, in order to obtain amplicons with *rpb1* primers, the MgCl₂ concentration was adjusted to 3.5 mM.

Phylogenetic analyses were based on Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI). For ML analysis, the best partition scheme and evolution models were assessed using PartitionFinder2 v2.1.1 using the “greedy” algorithm and selecting the best models for each partition using the corrected Akaike information criterion (AICc), restricting the search among the models available in RAxML2 v8.2.4.1 (Stamatakis 2014) and excluding the models with proportion of invariable (P-Invar) site estimates since it can cause analysis problems according to the RAxML manual (Yang 2006, Stamatakis 2016). The ML analysis was performed using RAxML2 v8.2.4.1 on the ABiMS platform (<http://abims.sb-roscoff.fr/>), using the default algorithm (-f d) and the GTRGAMMA model. The robustness of the analysis was indirectly evaluated by bootstrap support among 1000 replicates (-N 1000) and a majority-rule consensus tree was further built (-J MR). For BI analysis, the best models (among the namedExtended models of the bModelTest add on in Bayesian Evolutionary Analysis Utility -BEAUti2-) were estimated for each intronic and exonic regions of each gene (a total of 24 partitions) simultaneously with the BI analysis using the Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees (BEAST)2 v2.6.2 package. The BI analysis was performed using the Monte Carlo Markov Chain method using the BEAST2 v2.6.2 package by performing eight independent repetitions of 100,000,000 generations each, with sampling a tree at every 1,000 generations and a burn-in was fixed at 10% (discard the first 10% trees). For both analyses, *Allantonectria miltina* (CBS 121121) was selected as an outgroup. Convergence of the independent BI analyses was checked using Tracer v1.7.1. software (Rambaut et al. 2018) and a consensus tree was obtained using Logcombiner and Treeannotator. The two phylogenetic trees obtained with the ML and BI methods were compared using FigTree v1.4.4 (Rambaut 2006) (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>). A tree based on the topology of ML tree with nodes with bootstrap support < 60% collapsed using Tree Collapser CL 4 (Hodcroft), and annotated with bootstrap and

posterior probability node supports was built. The number of informative sites was calculated using the web server DIVEIN (Deng et al. 2010). The exact same set of methods was applied to analyze the reduced dataset (six loci) focused on *Bisifusarium* isolates.

Morphological characters

Fungal isolates pertaining to putative new species were inoculated in a three-point position on Potato Dextrose Agar (PDA, Difco, Fisher Scientific) for morphological descriptions. Additional cultures were also performed on M2Lev and oatmeal agar (OA; 50 g/L oatmeal, 5 g/L sodium chloride and 12 g/L agar) media and incubated at 25°C, in the dark. Macroscopic morphological characters (e.g. pigment production, aerial hyphae) were examined after a minimum of 14 days. Moreover, as recommended by Leslie & Summerell (2006), synthetic nutrient-poor agar (*Spezieller Nährstoffarmer Agar*, SNA) prepared as described in the publication cited above, was tested for all strains while carrot agar medium (400 g/L carrot, 20 g/L agar) was used for the induction of sexual characters when isolates were mated using all possible combinations. These plates were incubated at 25°C, in the dark, for eight weeks.

In parallel, for isolates identified as new type strains, five µL of an inoculum concentrated at 10⁶ conidia/mL were also inoculated on PDA medium (two biological and two technical replicates) and incubated at 15 and 25°C in darkness. Colony diameters were monitored for 40 and 21 days, respectively. Growth rates fitting each kinetic were estimated by the modified Gompertz equation (Zwietering et al. 1990) and using the MATLAB software (MATLAB. 9.5.0.944444. (R2018b), Natick, Massachusetts: The MathWorks Inc.). Two supplementary technical replicates were also deposited and incubated at 5, 10, 20, 30 and 37°C in darkness, then colony diameters were monitored during 14 days to determine growth limits as a function of temperature.

As for microscopic characteristics, descriptions were done based on PDA cultures as well as supplementary observations on M2Lev medium after 7 to 17 days growth. Fungal structures were mounted on glass slides using lactophenol cotton blue solution as a mounting fluid. Additional observations were performed after 40–46 days (fourteen days in the dark then exposure to natural light during a minimum of fourteen days) to potentially observe chlamydospores. An Olympus BX40 microscope equipped with an Olympus Digital Camera DP70 (Olympus, Tokyo, Japan) was used to observe microscopic characteristics (e.g. presence, shape and length of macroconidia and/or microconidia, phialidic pegs, chlamydospores) based on the recommendation of “The *Fusarium* laboratory manual” (Leslie & Summerell 2006). Several measurements were taken with a magnification of 400x and 1000x.

Then, conidia observations were performed on the isolates identified as new type strains using scanning electron microscopy. To do so, two mL of tween 80 (0.005 %, v/v) were added on each 10–12 days monospore culture on PDA medium to collect conidia suspensions. Concentrations were determined by counting spores in Malassez cells and were adjusted at 10⁷ conidia per mL. One mL of each suspension was filtered on a 0.2 µm polycarbonate membrane filter (GTTP01300, Milipore, Merck, Germany) using a 13 mm filter holder (SX0001300, Milipore, Merck, Germany). The filter was transferred on a Whatman filter paper to absorb excess liquid, then a fragment was bonded on the observation plot. Finally, two µL of Hitachi ionic liquid HILEM IL 1000 (Hitachi High-Tech, Europe, GmbH) was deposited and the observations were directly performed by scanning electron microscopy (SEM; HITACHI S-3200N) at the PIMM microscopy platform (Université de Bretagne Occidentale, France), without any additional fixation or metallization steps.

Secondary metabolite production

The four holotype strains UBOCC-A-120021, UBOCC-A-120036, UBOCC-A-120039 and UBOCC-A-120043 were inoculated as three replicates using five µL of 10⁶ conidia/mL suspensions, on PDA, malt extract agar (MEA: 20 g/L malt extract, 1 g/L peptone, 20 g/L glucose and 20 g/L agar), yeast extract sucrose agar (YES, pH 5.2) and skim milk agar (100 g/L Difco skim milk powder, 10 g/L yeast extract and 20 g/L agar) for 14 days at 25°C. Then, five 6 mm plugs were removed from the agar colonies for extractions with ethyl acetate / isopropanol (3:1) supplemented with 1%

(vol/vol) formic acid using ultra-sonication. After removal of the extracted plugs, the remaining liquid was evaporated and the extract re-dissolved in methanol. Three μL of the methanol extract were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) using diode array (DAD) and fluorescence detection (emission 230 nm, excitation 333 nm & emission 230 nm and excitation 450 nm) (Thermo Scientific, Dionex, Sunnyvale, California, USA) as described by Frisvad & Thrane (1987). A bracketed alkylphenone retention index was calculated for each compound as described by Frisvad & Thrane (1987, 1993). The UV spectra of the compounds eluting were compared to authentic standards of known secondary metabolites as described by Nielsen et al. (2011), Klitgaard et al. (2014) and Kildgaard et al. (2014) by comparing retention time, retention index and UV spectra recorded from 200 – 600 nm (diode array detection). The water / acetonitrile gradient used in the HPLC analyses and the column and other conditions used are described by Nielsen et al. (2011).

Results

Cheese sampling and analysis

Among the 56 cheeses sampled to collect *B. domesticum* isolates, a large number of fungal isolates pertaining to different genera such as *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium* or *Scopulariopsis* were observed (data not shown) along with the typical *B. domesticum* morphotypes (n = 9, one isolate per cheese). Interestingly, other isolates (n = 10, one macroscopically different isolate per cheese) exhibited *Fusarium*-like morphotypes. Identifications based on translation elongation factor 1-alpha sequencing confirmed that the isolates exhibiting the typical *B. domesticum* morphotypes indeed belonged to the latter species, while the sequences obtained for the *Fusarium*-like isolates could not be identified at the species level. Based on the observed blastn scores (closest identification to already described *Nectriaceae* species estimated to 83.5 to 85.9%, data not shown), the possibility of four putative new *Nectriaceae* species was highlighted. Among these isolates, two were macroscopically similar to an environmental strain (surface of sandstone building) described as *Trichothecium* sp. (94.9% similarity to *B. domesticum* based on ITS gene (Suihko et al. 2007)). ITS sequencing later confirmed the identity of this environmental strain with two of the obtained cheese isolates (data not shown), which was therefore included in this phylogenetic analysis (for a total of 11 unidentified *Fusarium*-like isolates). Noteworthy, during cheese investigation, other *Nectriaceae* species were identified, namely *F. babinda* (e.g. UBOCC-A-120044), *F. oxysporum* (e.g. ESE 00175), *F. culmorum* (e.g. ESE 00152) and *F. solani s.l.* (e.g. UBOCC-A-120045, ESE 00026, ESE 00073, ESE 01219), indicating that, beyond *B. domesticum*, members of this family can be associated with this food matrix although they may well be just environmental contaminants.

Phylogenetic analyses

A phylogenetic reconstruction (Fig. 1) was performed using a concatenated non-redundant dataset of ten loci: *act1*, *act*, *cmdA*, *his3*, *ITS*, *LSU*, *rpb1*, *rpb2*, *tef1* and *tub2* sequences of 64 strains (Table 1, Supplementary Table 2) belonging to 19 genera (18 based on Lombard et al. nomenclature (2015) and a new genus proposed in this study), as well as *A. miltina* CBS 121121 as an outgroup. The multi-gene alignment length was 5134 nucleotides, including few gaps and missing data (*act1* 487 bp, *act* 536 bp, *cmdA* 413 bp, *his3* 319 bp, *ITS* 533 bp, *LSU* 758 bp, *rpb1* 656 bp, *rpb2* 780 bp, *tef1* 351 bp and *tub2* 301bp). Moreover, this alignment contained 2226 informative sites (2122 without gaps). After alignment using the ten loci dataset, some of the unidentified isolates presented high identity levels between them, thus forming four distinct genetic groups, namely (i) UBOCC-A-120021, UBOCC-A-120034 and VTT-D-041022 (maximum divergence of 10/6441 nucleotides over the whole raw dataset), (ii) UBOCC-A-120035, UBOCC-A-120036 and UBOCC-A-120037 (maximum divergence of 2/6173 nucleotides), (iii) ESE-00140, UBOCC-A-120038, UBOCC-A-120039 and UBOCC-A-120041 (maximum divergence of 6/6187 nucleotides) and (iv) UBOCC-A-120043. Therefore, given the very low nucleotide divergence, only one representative sequence for each group, namely UBOCC-A-120021, UBOCC-A-120036, UBOCC-A-120039 and UBOCC-A-

120043, was conserved for further phylogenetic analyses. The obtained phylogenetic tree (Fig. 1) indicated that the putative new species were not clustered with already described species within the *Nectriaceae* family. Interestingly, UBOCC-A-120021 and UBOCC-A-120036 were nested within the *Bisifusarium* genus (*Fusarium dimerum* species complex *sensu* Geiser et al. 2021) with nucleotide differences comprised between 566 to 676/5134 and 571 to 680/5134, respectively, with other already described *Bisifusarium* species (Supplementary Table 3) and therefore likely correspond to two new species within this genus. On the other hand, UBOCC-A-120039 and UBOCC-A-120043 constituted an independent sister clade with a group including different *Nectriaceae* genera (described by Lombard et al. (2015) as *Neocosmospora*, *Albonectria*, *Geejayessia*, *Cyanonectria* and *Fusarium*) with a minimum nucleotide divergence of 566/5134 bp with species from these clades (Supplementary Table 4) suggesting that they belong to a distinct genus from *Neocosmospora*, *Albonectria*, *Geejayessia*, *Cyanonectria* and *Fusarium*, and other more phylogenetically distant Nectriaceae. Indeed, this minimum nucleotide divergence are comparable to those observed between the genera within this group, or even higher as for *Neocosmospora* and *Albonectria* (539/5134 bp) or *Neocosmospora* and *Geejayessia* (560/5134 bp) or *Neocosmospora* and *Cyanonectria* (554/5134 bp) (Supplementary Table 4).

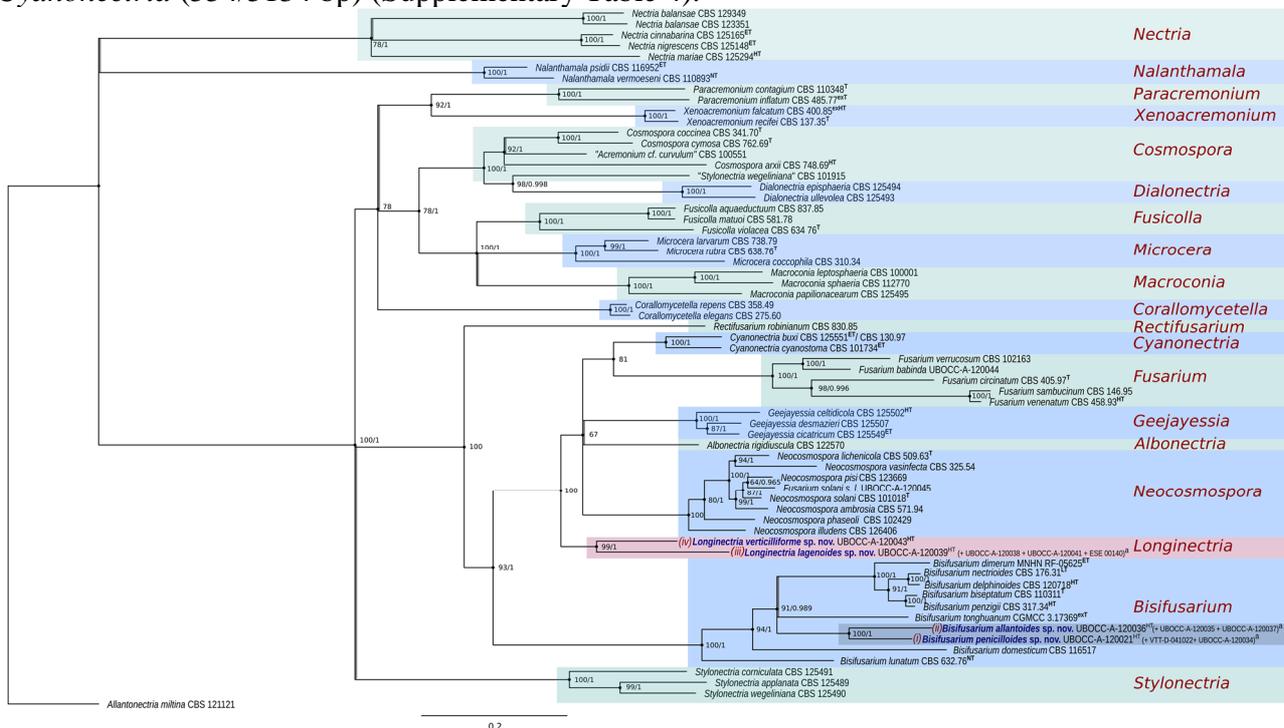


Figure 1 – Maximum-Likelihood phylogenetic consensus tree of Nectriaceae species inferred from the combined ten gene sequence subset (*act1*, *act*, *cmdA*, *his3*, *ITS*, *LSU*, *rpb1*, *rpb2*, *tef1* and *tub2*). Maximum-Likelihood bootstrap supports (in percentage, 1000 replicates) and Bayesian posterior probabilities are represented at nodes (respectively right and left). The tree is rooted with *A. miltina* CBS 121121. “ET”, “LT”, “HT”, “T”, “exT”, “exHT”, “NT” respectively mean epitype, lectotype, holotype, type, ex-type, ex-holotype and neotype. The four new species are written in blue and bold. “a”: Only the sequences of the type strain of each proposed species were used in the phylogenetic analysis given the very low nucleotide divergence between strains within the considered species.

As the latest addition to the *Bisifusarium* genus (*B. tonghuanum*) was based only on six genes of the “Lombard et al.” gene set, we wanted to confirm that the missing data had no impact on the positioning of putative *Bisifusarium* isolates. Therefore, a second phylogenetic reconstruction was performed using a concatenated non-redundant dataset of the six common loci (*ITS*, *LSU*, *rpb1*, *rpb2*, *tef1* and *tub2*) of the ten species belonging to the *Bisifusarium* genus (the eight already described and the two additional ones based on this study) and *F. venenatum* CBS 458.93^T as an outgroup. This

alignment length was 2854 nucleotides long, including few gaps. It contained 400 informative sites (391 without gaps). The resulting ML and BI analyses were highly concordant (data not shown) and the position of UBOCC-A-120021 and UBOCC-A-120036 in the resulting phylogenetic tree (Fig. S1) was concordant with the one observed for the ten loci-based analysis. *Bisifusarium allantoides* sp. nov. and *B. penicilloides* sp. nov. were placed in a sister clade of *B. tonghuanum* with a nucleotide divergence of 225 and 193/2854 nucleotides, respectively with *B. tonghuanum* CGMCC 3.17369. Both multi-gene phylogenetic analyses were deposited in TreeBASE (Study ID 28488 and 28538).

Taxonomy

Bisifusarium allantoides O. Savary, M. Coton, E. Coton and J-L. Jany, sp. nov. Figs 2, 3

MycoBank number: MB840947

Etymology – From latin “*allantois*” referring to the allantoid-shape of the conidia.

Holotype – UBOCC-A-120036, CBS 147587

Macromorphology – Based on UBOCC-A-120036 (CBS 147587) colony growth for 16 days at 25°C, colony surface on PDA was pale orange (RGB [167, 137,106] to [175, 137, 90]) with many white powdery structures and cottony hyphae, more or less aerial, with an elevation at the colony center (Fig. 2A). Margins were smooth and less colored. After natural light exposure during several days, colony color became more pronounced. It can be noted that the mycelium was very well attached to the agar. The colony reverse on PDA was orange at the center (RGB [148, 100, 59]) and progressively less colored until the margins (RGB [144, 130, 103]) (Fig. 2B). No pigment diffusion in the agar was observed. Interestingly, on the M2Lev medium, the morphological aspect was highly similar to that on PDA with more cottony structures, a more pronounced colony color, and smooth and regular margins (Fig. 3).

Micromorphology – Ascomatal state unknown. Phialides were less abundant than in the other described *Bisifusarium* species. Monophialides formed terminally (Fig. 2C) or laterally on hyphae and were cylindrical, tapering toward the tip (81–127 µm). Formation of lateral phialidic pegs common on PDA (and on M2Lev) were observed (Fig. 2D). Polyphialides were not observed. Microconidia and macroconidia were difficult to distinguish (Fig. 2E–K) but observed macroconidia were typically allantoidal, straight or curved and cylindrical (size on average 12.41 x 3.2 µm, 9.5–23.6 x 2.72–4.1 µm). The apical cells were papillate while the basal cells were distinctly notched. They were mostly 1-septate or more. Microconidia could be characterized by short conidia 0-septate or 1-septate with median septum or mostly an off-centered septum (size on average 7.6 x 2.5 µm, 4.7–9.7 x 1.5–3.2 µm). They were cylindrical, straight or curved, and slightly notched. After several weeks of growth, no chlamydospore was observed. SNA medium did not provide any supplementary information.

Growth characteristics on PDA – Moderately fast growth was observed at 25°C, colony diameter measuring 70.5 ± 1.7 mm versus 43.5 ± 0.6 mm at 15°C and growth rates were estimated at 5.2 ± 0.3 mm/days versus 3.3 ± 0.1 mm/days, respectively. Moreover, *B. allantoides* growth was observed between 5°C and 30°C, colony diameters measuring at 14 days were 8.0 ± 0.0 mm at 5°C, 19.0 ± 0.0 mm at 10°C, 55.0 ± 4.2 mm at 20°C, 39.0 ± 2.8 mm at 30°C and no growth at 37°C.

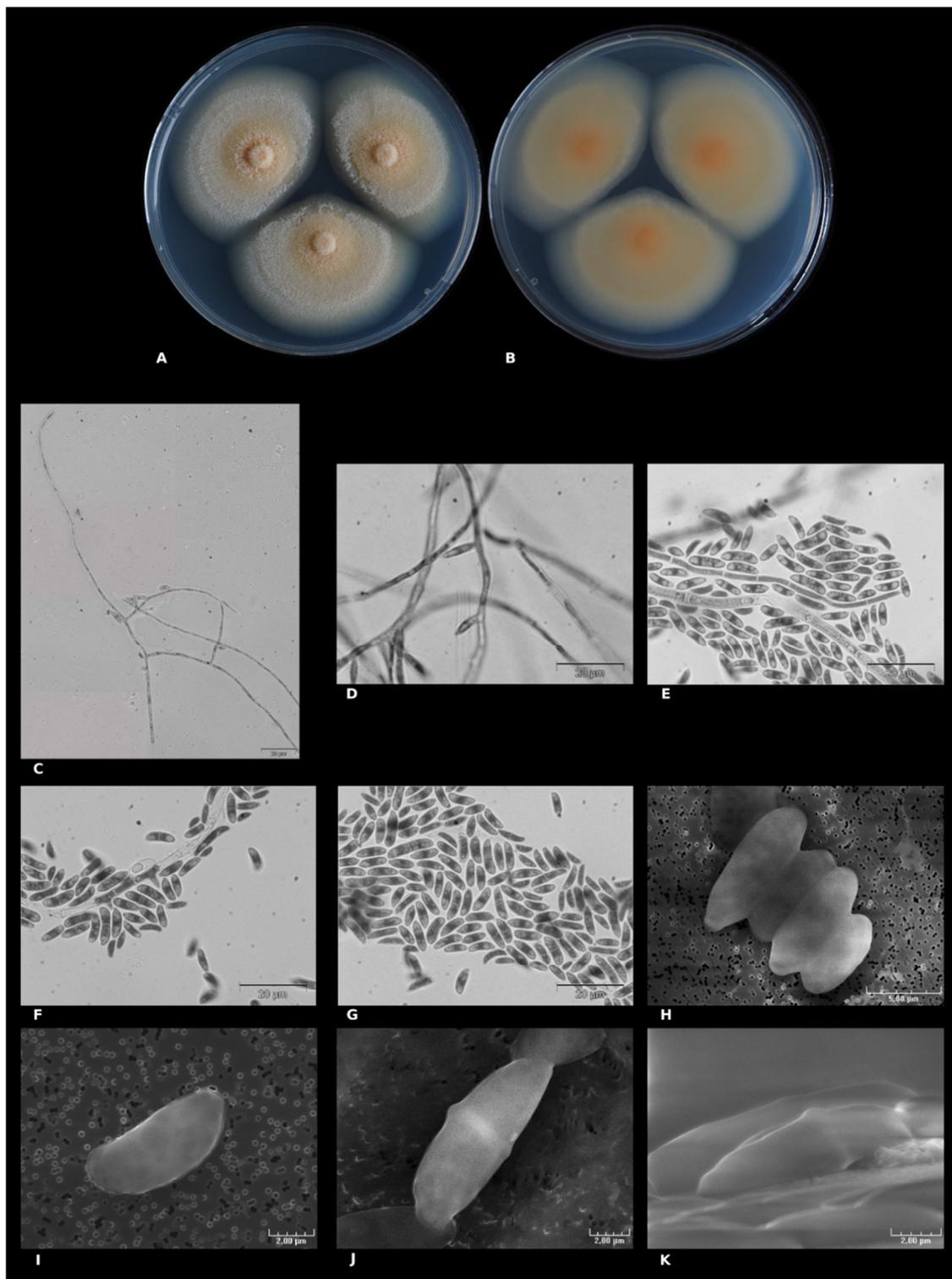


Figure 2 – Macroscopic morphological and microscopic characteristics of *Bisifusarium allantoides* (UBOCC-A-120036^{HT}). A colony on PDA (14 days at 25°C). B colony reverse on PDA (14 days at 25°C). C terminal monophialides. D phialidic pegs. E–K conidia. C–G microscopic acquisitions using classical microscopy. H–K microscopic acquisition using scanning electron microscopy.

Secondary metabolites – No known mycotoxins already described to be produced by *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* or *Alternaria* spp. (e.g. fusaric acid, zearalenone, trichothecenes, butenolide or enniatins) were detected. For most detected compounds, except ergosterol, extrolites could not be identified but belonged to 47 chromophore families (Table 3). These secondary metabolites included the “emon” chromophore or corresponded to extra apolar free fatty acids (including linoleic acid and

probably oleic acid), mid-cyclic lipopeptides with tyrosine in the cyclic peptide, indole alkaloids or 2-pyruvoylaminobenzamide-like molecules (Table 3).

Substrate and distribution – To date, *B. allantoides* has been solely isolated from European cheese.

Material examined – France, isolated from French soft cheese rind, F. Deniel, 11 Dec. 2013, holotype UBOCC-A-120036 = CBS 147587.

Additional material examined – France, isolated from French soft cheese rind, F. Deniel, UBOCC-A-120037, 11 Dec. 2013; Spain, isolated from Spanish cheese (Manchego), B. Mayo, before Nov. 2018, UBOCC-A-120035.

Note – On oatmeal agar media, sporodochia could be noted for the three *B. allantoides* strains (Fig. 3).

Bisifusarium penicilloides O. Savary, M. Coton, E. Coton and J-L. Jany, sp. nov. Figs 3, 4

MycoBank number: MB840948

Etymology – From latin “*penicillus*”, referring to the penicillate organisation of polyphialides.

Holotype – UBOCC-A-120021, CBS 147586

Macromorphology – Based on UBOCC-A-120021 (CBS 147586) colony growth for 16 days at 25°C on PDA, short aerial mycelial strands with a fungal colony very well attached to the agar. Colony surface on PDA was slightly colored, beige (RGB [191,181,163]) with yellow shades (Fig. 4A) and color intensified during sporulation in natural light becoming orange (RGB [210,163,114]). No powdery structure was observed, but velvety and downy aspects were. A slight elevation could be noted in the center and lighter regular margins were observed. The colony reverse on PDA was pale (RGB [168,163,149]) (Fig. 4B), to orange pale (RGB [170,143,119]) after natural light exposure for several days. No pigment production in agar was observed. On M2Lev medium (Fig. 3), a similar macroscopic profile was observed with slightly more aerial hyphae and more pronounced colony color than on PDA medium.

Micromorphology – Ascotal state unknown. Several types of conidiogenous cells were observed. Indeed, while polyphialides with a penicillate configuration were frequently observed (Fig. 4C, D) (phialides length after bifurcation on average 15 µm, 9–25 µm) and appear as a species characteristic. several monophialides formed terminally (≥ 73–92 µm) or laterally on hyphae and lateral phialidic pegs (Fig. 4E) could be also noted. Phialides were cylindrical tapering towards the tip. Microconidia were not observed and macroconidia were mostly 0-septate or rarely 1-septate with a median septum (Fig. 4F–J) (size on average 6.5 x 2.7 µm, 5.6–7.2 x 2.1–3.2 µm). They were ellipsoidal, straight or curved presenting a lunate or reniform shape, and basal cells were distinctly notched. After several weeks of growth, globose chlamydospores were observed, typically intercalary, solitary or in chains that can be long. SNA medium did not provide any supplementary information.

Growth characteristics on PDA – Slow growth was observed at 25°C, colony diameter measuring 36.0 ± 1.8 mm versus 43.0 ± 0.8 mm at 15°C and the growth rates were estimated at 2.6 ± 0.2 mm/days versus 3.2 ± 0.1 mm/days, respectively. Moreover, *B. penicilloides* growth was observed between 5°C and 25°C, colony diameters measuring at 14 days 9.5 ± 0.7 mm at 5°C, 20.5 ± 0.7 mm at 10°C, 49.0 ± 1.4 mm at 20°C, and no growth at 30°C and 37°C.

Secondary metabolites – No known mycotoxins already described to be produced by *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* or *Alternaria* spp. were detected. For most detected compounds, except ergosterol, extrolites could not be identified but belonged to 47 chromophore families (Table 3). These secondary metabolites included the “emon” chromophore, extra apolar free fatty acids (including linoleic acid and probably oleic acid), mid-cyclic lipopeptides with tyrosine in the cyclic peptide, indole alkaloids or 2-pyruvoylaminobenzamide-like molecules (Table 3).

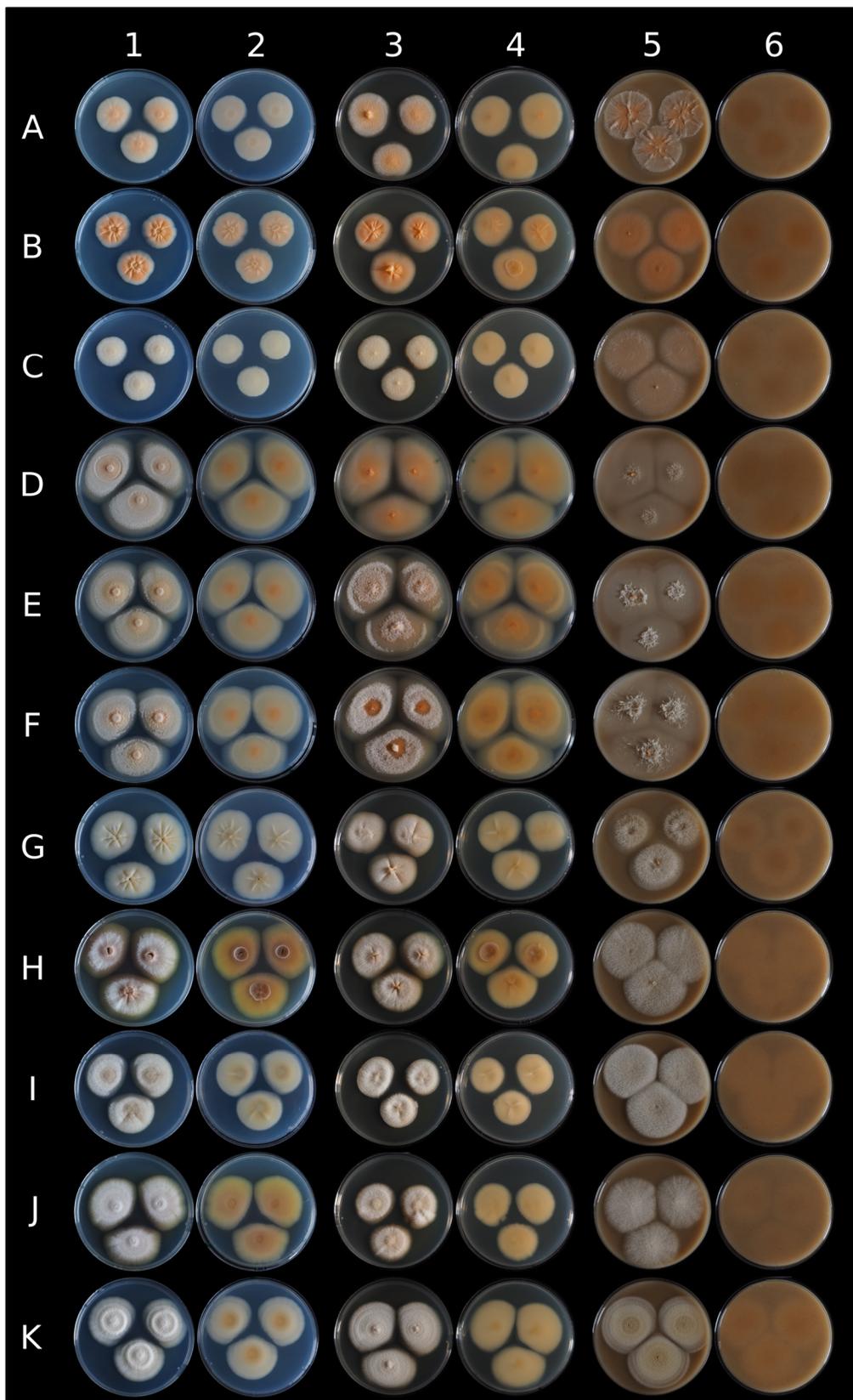


Figure 3 – Macroscopic comparison of eleven strains belonging to four new *Nectriaceae* species on different culture media. Lines A to K respectively correspond to *Bisifusarium penicilloides* VTT-D-041022, *B. penicilloides* UBOCC-A-120034, *B. penicilloides* UBOCC-A-120021, *Bisifusarium allantoides* UBOCC-A-120035, *B. allantoides* UBOCC-A-120036, *B. allantoides* UBOCC-A-120037, *Longinectria lagenoides* UBOCC-A-120038, *L. lagenoides* UBOCC-A-120039, *L. lagenoides* UBOCC-A-120041, *L. lagenoides* ESE-00140 and *Longinectria verticilliforme* UBOCC-

A-120043 grown during 14 days at 25°C on Potatoes Dextrose Agar (column 1 & 2: observe & reverse), M2Lev (column 3 & 4: observe & reverse) and oatmeal agar (column 5 & 6: observe & reverse).

Substrate and distribution – Two strains isolated from cheese rind, including the holotype. One strain (VTT-D-041022), previously identified as *Trichothecium* sp. (94.9% similarity to *B. domesticum*, based on ITS sequencing) was also obtained from the outer surface of a sandstone building, Arbroat Abbey (Suihko et al. 2007).

Material examined – France, isolated from French soft cheese (Mont d’Or), O. Savary, 22 Jan. 2019, holotype UBOCC-A-120021 = CBS 147586.

Additional material examined – France, isolated from French cheese (Mont d’Or), O. Savary, 21 Jan. 2019, UBOCC-A-120034; Scotland, isolated from outer surface of sandstone building, Arbroat Abbey, Suihko et al. (2007), before Nov. 2006, VTT-D-041022.

Note – A “yeasty” odour was clearly detected during fungal growth on PDA. A few macroscopic differences were observed among the three studied isolates (Fig. 3). Colony surface was more colorful during the first days of culture for the VTT-D-041022 and UBOCC-A-120034 isolates but after several days of exposure to natural light, all three fungal cultures presented the same intense color. While VTT-D-041022 and UBOCC-A-120021 had the same mycelium characteristics, UBOCC-A-120034 strain colonies were radially furrowed with a concave center and margins were lighter and irregular.

Longinectria O. Savary, M. Coton, E. Coton and J-L. Jany, gen. nov.

MycoBank number: MB840949

Etymology – From the latin *longus* = long, “Longi-” refers to the phialides length (on average 42 µm; 15–72 µm, some being very long – 153 to 237 µm) observed for the *Longinectria* species and “-nectria” refers to the *Nectriaceae* family.

Type species – *Longinectria lagenoides* O. Savary, M. Coton, E. Coton & J-L. Jany, sp. nov.

Ascomatal state unknown. Conidiophores are variable-length phialides, sometimes extremely long (e.g. 153–237 µm), lateral, sometimes verticillate, hyaline. Macroconidia straight to slightly curved, apical cell morphology blunt to papillate and a basal cell often notched, 0–3 septate, hyaline. Microconidia ovoid, ellipsoid to allantoid, 0–1 septate, hyaline. Chlamydospores absent to abundant, globose, single, in pairs or chains, intercalary or terminal.

Longinectria lagenoides O. Savary, M. Coton, E. Coton and J-L. Jany, sp. nov.

Figs 3, 5

MycoBank number: MB840950

Etymology – From latin *lagoena* = bottle, refers to the observed phialide shape.

Holotype – UBOCC-A-120039, CBS 147588

Macromorphology – Based on UBOCC-A-120039 (CBS 147588), colony growth for 16 days at 25°C, colony surface on PDA was heterogeneously colored (Fig. 5A). The center was mainly brown (RGB [139,112,93]), the smooth margin was brown (RGB [104,95,78]) and intensified during growth. The intermediate zone appeared grey (RGB [164,167,173]) with brown shades because of the aerial white hyphae with powdery structures. Brown pigments were diffused in the agar around the colony. Colonies were radially furrowed with a convex center. Colony reverse was also heterogeneously colored (Fig. 5B), the center being brown (RGB [98,61,43]), then progressively clearer (RGB [128,90,51]) and highly visible on the reverse face, the fungal colony dug into the agar. Concerning fungal growth on M2Lev, colonies were beige with shades of brown and, in particular, in the regular margins and convex center (Fig. 3). Very aerial hyphae were observed with powdery and/or cottony structures and the mycelium dug into agar.

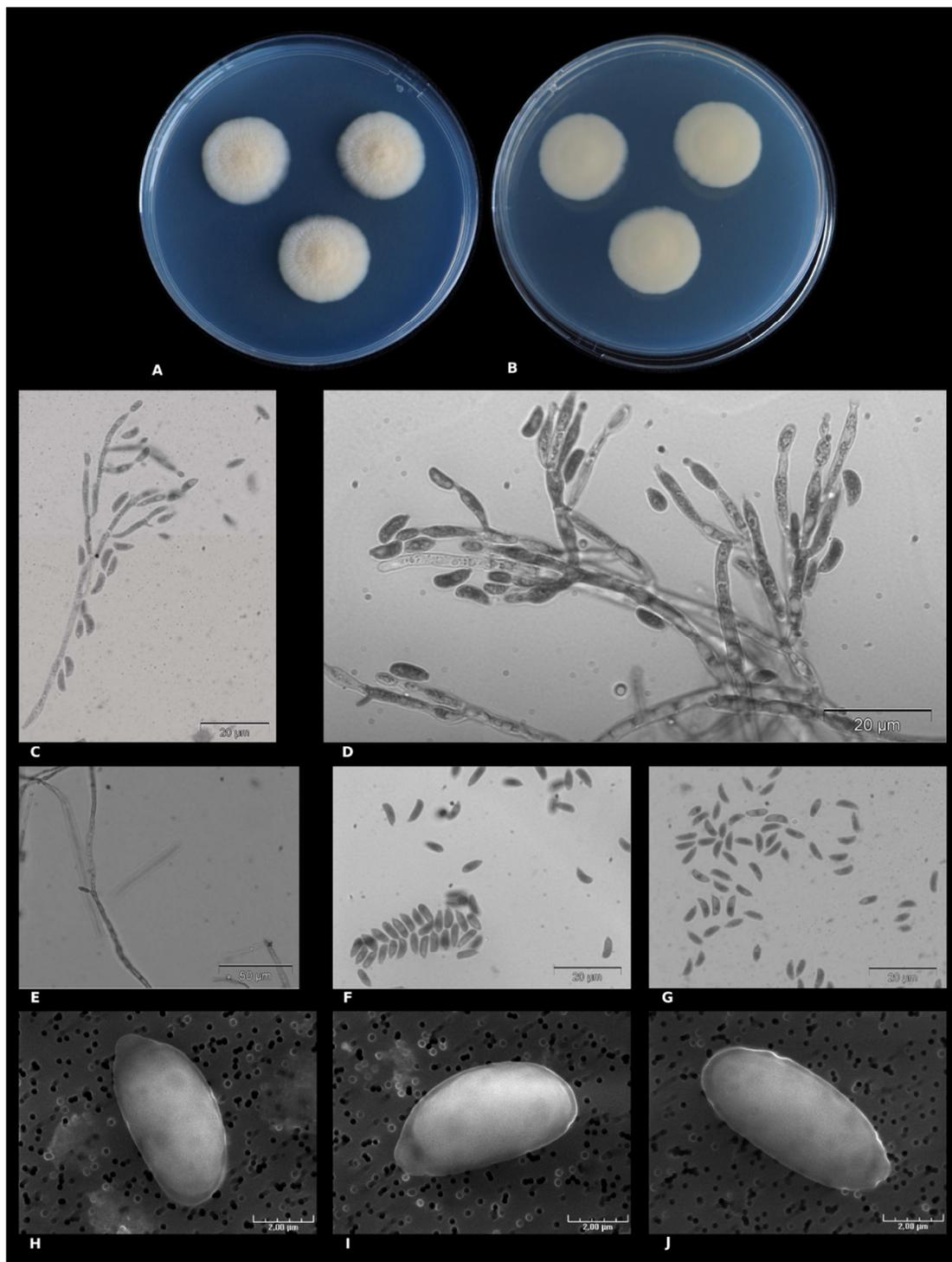


Figure 4 – Macroscopic morphological and microscopic characteristics of *Bisifusarium penicilloides* (UBOCC-A-120021^{HT}). A Colony on PDA (14 days at 25°C). B Colony reverse on PDA (14 days at 25°C). C–D polyphialides. E phialidic pegs. F–J conidia. C–G microscopic acquisitions using classical microscopy. H–J microscopic acquisitions using scanning electron microscopy.

Micromorphology – Ascum state unknown. Lateral phialides with different sizes were observed (on average 44 μm , 15–72 μm), some being very long (size 153–237 μm) (Fig. 5C – D) while others are short and could even be assimilated to phialidic peg. Macroconidia 0–3 septate, very straight in shape with an apical form, blunt to papillate, and basal cell very pronounced and notched (Fig. 5E –J). Their size is on average 17 x 4 μm (12–29 x 3–7 μm) length range. Microconidia 0–1 septate ovoid to allantoid shape (8–12 x 3–5), apical form blunt and basal cell slightly notched (Fig. 5E, G). After several weeks of growth, globoses chlamydospores were observed typically intercalary,

or terminal with mainly ≥ 2 chlamydospores. SNA medium did not provide any supplementary information.

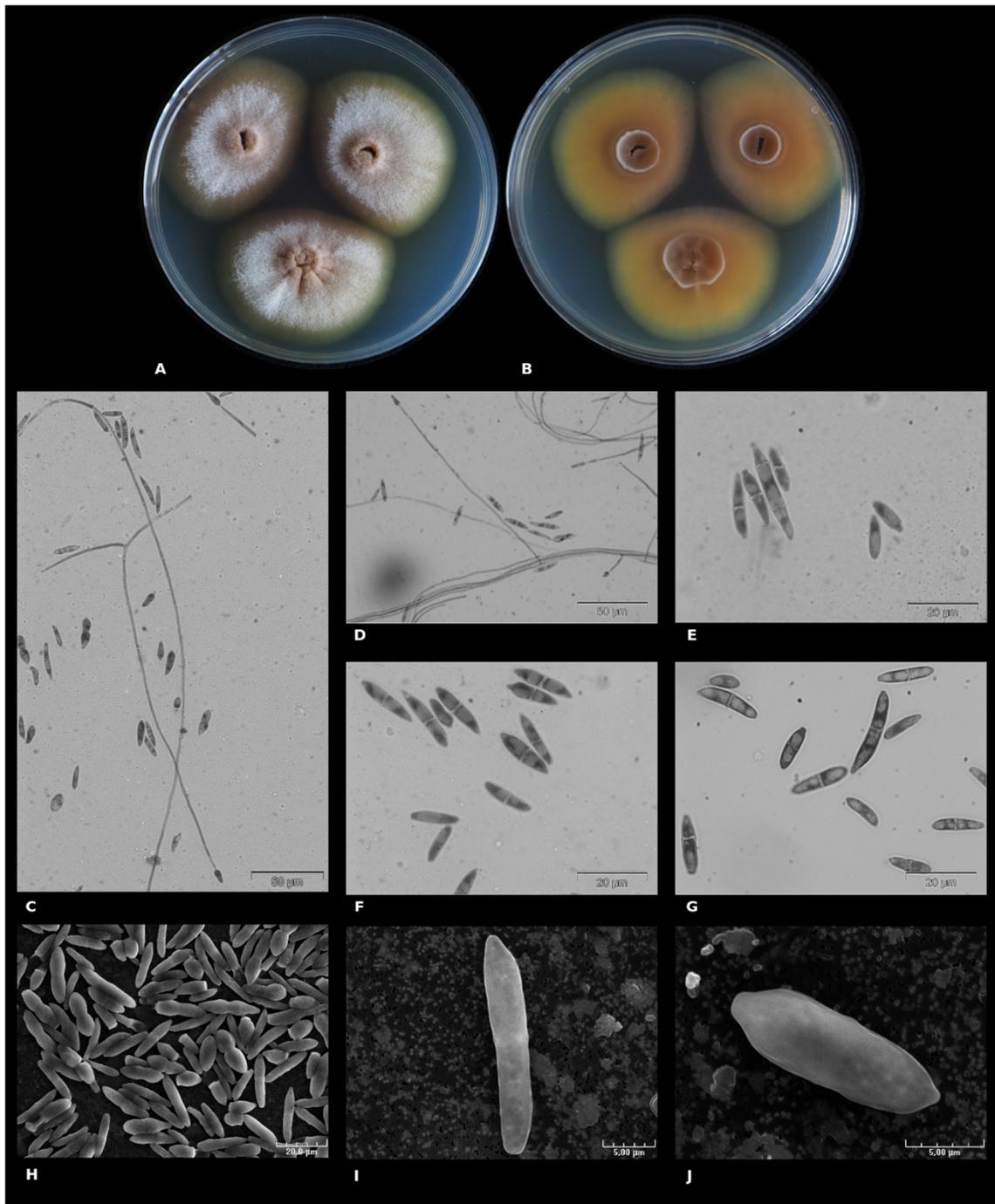


Figure 5 – Macroscopic morphological and microscopic characteristics of *Longinectria lagenoides* (UBOCC-A-120039^{HT}). A Colony on PDA (14 days at 25°C). B Colony reverse on PDA (14 days at 25°C). C–D phialides. E–J micro- and macro- conidia. C–G microscopic acquisitions using classical microscopy, H–J: microscopic acquisition using scanning electron microscopy.

Growth characteristics on PDA – Slow growth was observed at 25°C, colony diameter measuring 53.0 ± 1.6 mm versus 32.3 ± 0.5 mm at 15°C and the growth rates were estimated at 3.7 ± 0.1 mm/days versus 2.3 ± 0.0 mm/days, respectively. Moreover, *L. lagenoides* growth was observed between 5°C and 25°C, colony diameters measuring at 14 days 4.5 ± 0.0 mm at 5°C, 13.0 ± 0.0 mm at 10°C, 44.5 ± 2.1 mm at 20°C, and no growth at 30°C and 37°C.

Secondary metabolites – No known mycotoxins already described to be produced by *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* or *Alternaria* spp. were detected. For most detected compounds, except ergosterol, extrolites could not be identified but belonged to 38 chromophore families (Table 3). These secondary metabolites again included the “emon” chromophore or corresponded to extra apolar free fatty acids (including linoleic acid and probably oleic acid), mid-cyclic lipopeptides with tyrosine in the cyclic peptide, indole alkaloids, 2-pyruvoylaminobenzamide-like molecules but also an alkylphenone chromophore and atrovenetin chromophore (Table 3).

Substrate and distribution – To date, *L. lagenoides* has been solely isolated from European cheese.

Material examined – France, isolated from Swiss cheese, O. Savary, 22 Nov. 2018, holotype UBOCC-A-120039, CBS 147588.

Additional material examined – France, isolated from Swiss cheese, O. Savary, 20 Nov. 2018, UBOCC-A-120038; France, isolated from Swiss cheese, O. Savary, UBOCC-A-120041, 27 Nov. 2018; France, isolated from semi-hard Swiss cheese, J. Ropars, ESE 00140, 2018.

Note – Few macroscopically differences were observed among the four isolates observed on PDA (Fig. 3). Indeed, colony color was more or less pronounced (RGB [156,153,136] or [157,157,162]) depending on the considered strain), and in particular, one strain (UBOCC-A-120038) remained yellow/beige (RGB [151, 153, 148]) even with natural light exposure during several days. Radial furrows with a convex center were mainly pronounced for UBOCC-A-120038 and UBOCC-A-120039 but also slightly more observable for ESE-00140. The colony reverse could be beige (RGB [140,134,121]) to brown (RGB [143,109,80]) depending on the strains.

Longinectria verticilliforme O. Savary, M. Coton, E. Coton and J-L. Jany, sp. nov. Figs 3, 6
Mycobank number: MB840951

Etymology – Name refers to the phialides bifurcation as a verticille.

Holotype – UBOCC-A-120043, CBS 147589

Macromorphology – Based on UBOCC-A-120043 (CBS 147589) colony growth for 16 days at 25°C, colony surface on PDA was white (RGB [209,212,218]) to white grey (RGB [176,175,178]) (Fig. 6A) and did not change color after several days when exposed to natural light. Mycelium was very powdery and cottony, with more elevated circular zones of slightly aerial hyphae. Interestingly, few transparent exudate droplets have been observed at 25°C as well as at 15°C. Colony reverse on PDA was more colored in the center (RGB [153,124,85]) then lighter until the margin (RGB [147,141,129]) (Fig. 6B). No pigment production in agar was observed. Moreover, a more powdery aspect was observed on M2Lev medium (Fig. 3) *versus* PDA and the margins, although smooth and regular, were beige instead of grey white.

Micromorphology – Ascomatal state unknown. Verticillate phialides (mainly three branches or more) which could be in terminal as well lateral position with successive bifurcations were observed (Fig. 6C–E). Lateral phialides were also noted, sometimes very long (on average, length after bifurcation: 39 µm, with variations from 27 to 58 µm), and frequently septate containing a probable formation of new phialide bifurcations (size 3–15 µm). Moreover, conidia clusters, similar to false head structures, formed from the same isolated phialides were observed (Fig. 6F). Macroconidia 1–3 septate, mainly straight or slightly ellipsoidal with an apical cell morphology blunt to papillate and a basal cell distinctly notched, size on average 15.3 x 2.8 µm (9.4–26.9 x 2.3–3.2 µm) (Fig. 6G–J). Microconidia 0-1 septate, straight or curved, reniform, apical cells morphology is blunt while basal cell is notched, size on average 7.6–3.1 (5.5–9.5 x 2.0–4.1 µm) (Fig. 6I, K). No chlamydospores observed. SNA medium did not provide any supplementary information.

Growth characteristics on PDA – Slow growth was observed at 25°C, colony diameter measuring 49.5 ± 3.3 mm versus 28.6 ± 2.9 mm at 15°C and the growth rates were estimated at 3.4 ± 0.3 mm/days versus 2.1 ± 0.3 mm/days, respectively. Moreover, *L. verticilliforme* growth was observed between 5°C and 25°C, colony diameters measuring at 14 days 5.0 ± 0.0 mm at 5°C, 15.0 ± 0.0 mm at 10°C, 41.5 ± 0.7 mm at 20°C, and no growth at 30°C and 37°C.

Secondary metabolites – No known mycotoxins already described to be produced by *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* or *Alternaria* spp. were detected. For most detected compounds, except ergosterol, extrolites could not be identified but belonged to 32 chromophore families (Table 3). These secondary metabolites included the “emon” chromophore or corresponded to extra apolar free fatty acids (including linoleic acid and probably oleic acid), mid-cyclic lipopeptides with tyrosine in the cyclic peptide as well as RED chromophore (Table 3).

Substrate and distribution – To date, the only strain isolated for this species was from an Italian cheese.

Material examined – France, isolated from an Italian cheese (Alpeggio), O. Savary, 10 Dec. 2018, holotype UBOCC-A-120043, CBS 147589.

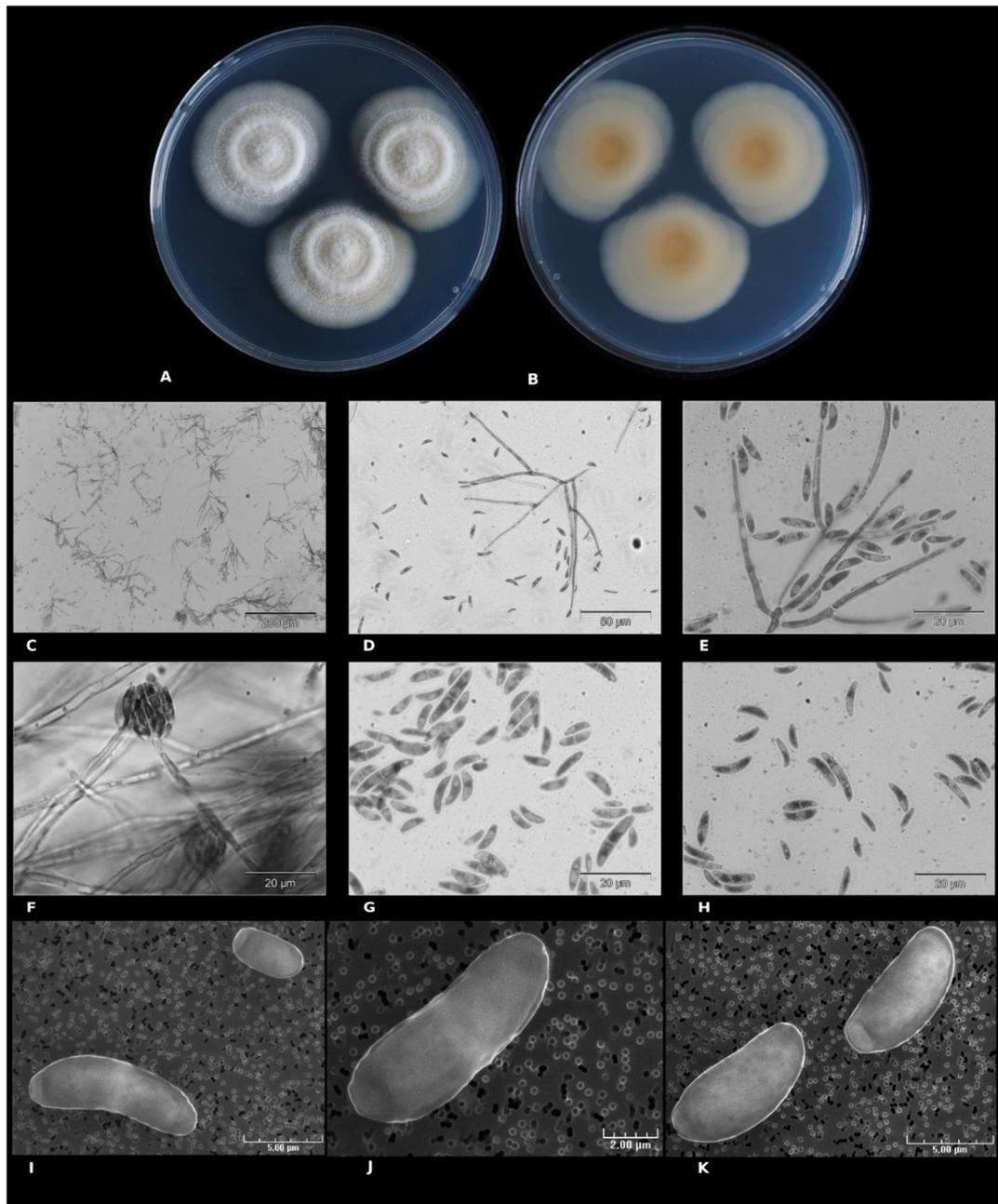


Figure 6 – Macroscopic morphological and microscopic characteristics of *Longinectria verticilliforme* (UBOCC-A-120043^{HT}). A Colony on PDA (14 days at 25°C). B Colony reverse on PDA (14 days at 25°C). C–E phialides. F–K micro- and macro- conidia. C–H microscopic acquisitions using classical microscopy, I–K: microscopic acquisitions using scanning electron microscopy.

Table 3 Production of different chromophore groups of secondary metabolites by *Nectriaceae* spp.

Chromophore family	Identity or chromophore	<i>Bisifusarium allantoides</i> UBOCC-A-120036 ^{HT}	<i>Longinectria lagenoides</i> UBOCC-A-120039 ^{HT}	<i>Bisifusarium penicilloides</i> UBOCC-A-120021 ^{HT}	<i>Longinectria verticilliforme</i> UBOCC-A-120043 ^{HT}
Alk 1-3	indole alkaloid chromophore	+	+	+	-
Alk 4	indole alkaloid chromophore	-	+	-	-
Aspham	alkylphenone chromophore	-	+	-	-
Atrov	atrovenetin chromophore	-	+	-	-
Cyt	tyrosine chromophore	+	+	+	+
e1-12	no chromophore	+	+	+	+
e15-21	no chromophore	+	+	+	+
e38-48	fatty acid	+	-	+	-
Emon		+	+	+	+
Ergosterol	(common membrane constituent)	+	+	+	+
Ffa 1-4	fatty acid	+	+	+	+
Flit		-	+	-	-
Fluorescing compound at retention time 12.95		-	+	-	-
Linoleic acid	linoleic acid	+	+	+	+
Pal		-	-	+	-
Pyru	pyruvoylaminobenzamide chromophore	+	+	+	-
RED		-	-	-	+
Snor		+	-	+	-
Ulm		+	-	+	+
Vit		+	+	+	+
Vor		+	+	+	+
xx		+	-	-	+

The production and detection by HPLC-DAD of chromophore family is highlighted by the “+” symbol and its absence is represented by the “-” symbol

Discussion

The Ascomycete *Nectriaceae* (Hypocreales) family includes saprotrophic and/or plant and human pathogens. Interestingly, several species within the family have been used for industrial purposes (Lombard et al. 2015). One species, namely *Bisifusarium domesticum*, plays an essential role for many washed-rind cheeses to reduce surface stickiness (Bachmann et al. 2003, 2005). To date, the latter species has only been isolated from cheese and was the only *Nectriaceae* species clearly associated with this food matrix. However, this study reports the

unexpected diversity of *Fusarium*-like species occurring in the cheese environment, and describes four new cheese-associated *Nectriaceae* species, including two that may pertain to a new genus.

While sampling washed-rind cheeses to obtain *B. domesticum* isolates on DG18 agar medium, we were firstly able to collect multiple *Fusarium* spp. isolates, rarely described in cheeses. In particular, isolates belonging to *Fusarium babinda*, *F. culmorum*, *F. oxysporum* and *Fusarium solani* s.l. were isolated from different cheeses although these species, considered as plant pathogens and/or soil saprophytes, are mainly recovered from soil and plant debris, but also the cause of some human infections (Leslie & Summerell 2006, Zhang et al. 2006, Geiser et al. 2013, Summerell 2019). Obviously, the question arises about their presence on cheeses, which is likely due to undesirable environmental contaminations. Secondly, in addition to these species, several isolates with a *Fusarium*-like morphology were also found and further grouped into four different taxa. Based on blastn analysis using *tefl* sequence, they could not be assigned to *Bisifusarium domesticum* or to any other known species within the *Nectriaceae* family.

Deciding whether or not these four taxa indeed corresponded to new species, i.e. “segments of evolutionary lineages” that evolve independently (de Queiroz 1998), is not a trivial task. Different criteria exist to detect lineages that have evolved independently. However, neither the Biological Species Concept (BSC, see Anderson & Ullrich 1979) nor the Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition (Taylor et al. 2000) could be applied in this study. First, cross-mating between isolates collected in this study and other strains representative of phylogenetically close species was not possible since the teleomorphs for these species are not always known. Moreover, we did not collect a sufficient number of isolates of each putative new species to consider evaluating the concordance/incongruity of multiple unlinked genes to indicate a lack of genetic exchanges between lineages evolving independently as proposed by the GC-PSR criterium (Taylor et al. 2000) or even to observe the number of shared/unique single nucleotide polymorphisms (SNPs) among/within lineages. Therefore, this study focused on the use of multiple locus phylogenetic reconstructions that could identify independent clades and inform about the nucleotide divergences between taxa. By using the same set of loci as the one used by Lombard et al. (2015), that was publicly available at the beginning of this study, we were able to assess the phylogenetic placement of the four taxa representing putative species within the *Nectriaceae* family, and evaluate the nucleotide divergence between these taxa and the other phylogenetically close species and genera.

It is noteworthy that the circumscription of the *Fusarium* genus has recently been highly debated (Crous et al. 2021 vs. Geiser et al. 2021), mainly with two concepts: (i) a broad *Fusarium* concept (O’Donnell et al. 2020, Geiser et al. 2021) corresponding to a monophyletic group initiated at node F1 (node F1 in Geiser et al. 2013). This hypothesis was recently supported by a 19-gene phylogeny (Geiser et al. 2021) which showed a better phylogenetic support for node F1 than for other internal nodes. In addition, different practical arguments provided in O’Donnell et al. 2020 encourage the scientific community to use the broad *Fusarium* concept. (ii) A second concept with a *Fusarium* genus corresponding to a monophyletic group initiated at node F3 (node F3 in Geiser et al. 2013) that excludes the following genera: *Albonectria*, *Cyanonectria*, *Geejayessia*, *Neocosmospora*, *Rectifusarium* and *Bisifusarium*. The latter proposition brings forward the strongly supported monophyly of these different genera as well as its morphological, biochemical and ecological consistency that contrasts with the absence of synapomorphy when considering the broad *Fusarium* concept.

Pending adoption of a consensus taxonomy, we named taxa based on the nomenclature used by Lombard et al. (2015), although future studies may lead to genus name changes. This approach also led to the proposal of a new genus (i.e. *Longinectria*) within the *Nectriaceae*

family based on the definition of Crous et al. (2021), O'Donnell et al. (2020), Geiser et al. (2021).

In the context of this study, after a preliminary identification based on *tef1* sequencing, a phylogenetic analysis was performed comparing the ten-locus sequence set used by Lombard et al. (2015), namely *acl1*, *act*, *cmdA*, *his3*, *ITS*, *LSU*, *rpb1*, *rpb2*, *tef1* and *tub2*, from thirteen isolates, eleven corresponding to unidentified isolates with a *Fusarium*-like morphology and the two others where *F. babinda* and *F. solani s.l.* isolates. Finally, *B. biseptatum* CBS 110311^T, missing from Lombard et al. 2015 analysis, and *B. dimerum* MNHN-RF-05625^T, as an internal control, were also analysed. The obtained sequences were compared with the corresponding sequences from 57 strains issued from the dataset analyzed by the latter authors and supplemented with *B. tonghuanum* CGMCC 3.17369^T (Sun et al. 2017) sequences (6/10 loci available). A complementary analysis was then performed with the sequences of six loci, namely *ITS*, *LSU*, *rpb1*, *rpb2*, *tef1* and *tub2*, from the ten isolates identified as pertaining to the *Bisifusarium* genus. This was done to ensure that the missing sequence data for the recently described *B. tonghuanum* (Sun et al. 2017) had no impact on the positioning of some of our isolates as new *Bisifusarium* species.

Firstly, the ten loci analysis showed that six of the *Fusarium*-like cheese isolates clustered into two groups, the first one (i) containing UBOCC-A-120021, UBOCC-A-120034 and VTT-D-042022 strains, and the second one (ii) UBOCC-A-120035, UBOCC-A-120036 and UBOCC-A-120037 strains. These groups positioned within the supported *Bisifusarium* genus (Lombard et al. 2015) and were phylogenetically separated from other already described species within this genus as well as other *Fusarium* species. Moreover, the complementary analysis focused on the *Bisifusarium* genus (using six loci) confirmed the same topology. These two species formed a sister clade of *B. tonghuanum*. The nucleotide differences between these isolates and *B. tonghuanum* CGMCC 3.17369^T (299/5134 (90.2% identity) and 325/5134 (89.2% identity) nucleotides for *B. penicilloides* and *B. allantoides*, respectively), as well as with the other *Bisifusarium* species (e.g. 566/5134 (88.5% identity) and 571/5134 (88.4% identity) nucleotide differences with *B. biseptatum* CBS 110311^T), supports the existence of two new *Bisifusarium* species. Indeed, among *Bisifusarium*, several species have nucleotide differences that are 5-fold lower than between *B. allantoides* and *B. penicilloides* (e.g. 73/5134 nucleotides (98.5% identity) between *B. penzigii* CBS 317.34^T and *B. biseptatum* CBS 110311^T). Following morphological observations, the names *Bisifusarium allantoides* and *B. penicilloides* were proposed for these two new species. These two species were isolated from cheese rinds and their growth was confirmed at temperatures as low as 5°C thus compatible with cheese-making conditions. Interestingly, among *B. penicilloides* isolates, one strain was also isolated from the environment (sandstone building). This presumptive identification proximity based on macromorphological observation was confirmed using the ten loci sequencing phylogenetic analysis. This strain, isolated from the outer surface of a sandstone building, could provide key information about the environmental origin of this species. Indeed, this association to sandstone might suggest that this species is naturally found in some cheese, via its presence in ripening cellars (i.e. on walls or building surfaces). It is noteworthy that the genus *Bisifusarium* might actually include a larger number of species than the ten *Bisifusarium* spp. presented in this study. Indeed, among the five strains assigned to unnamed *Bisifusarium* species in Sun et al. (2017), a preliminary Maximum Likelihood analysis was carried out on a reduced dataset comprising the only sequences available for four loci for these strains (*ITS*, *LSU*, *tef1* and *tub2*). The results suggested that these strains might pertain to new *Bisifusarium* species (data not shown).

As for the other isolates, the position of the genetic cluster (iii) consisting of UBOCC-A-120038, UBOCC-A-120039, UBOCC-A-120041 and ESE-00140, on the one hand, and (iv) UBOCC-A-120043, on the other hand, that formed two branches within an independent sister

clade of a clade grouping *Albonectria*, *Fusarium*, *Geejayessia*, *Cyanonectria* and *Neocosmospora* genera (as described by Lombard et al. 2015), is compatible with their affiliation to two new species within a new genus. The minimal nucleotide divergence (566/5134 nucleotides) existing between this clade and its sister clade, grouping *Albonectria*, *Fusarium*, *Geejayessia*, *Cyanonectria* and *Neocosmospora* genera, is similar or higher than those existing between genera of the latter clade (e.g. minimal nucleotide divergence 554/5134 nucleotide between *Cyanonectria* and *Neocosmospora*). Furthermore, nucleotide differences (483/5134 nucleotides, 90.2% identity) occurring between UBOCC-A-120043 and UBOCC-A-120038 / UBOCC-A-120039 / UBOCC-A-120041 / ESE-00140 supported the fact that the two branches actually correspond to two different species within the genus. According to morphological characters of these five isolates, namely the observed length of the phialides, which appear to be longer than phialides commonly observed within the *Nectriaceae*, the name *Longinectria* (gen. nov.) is proposed in the present study for members of this genus. Then, following morphological observations, the names *Longinectria verticilliforme* and *L. lagenoides* were proposed for these two new species. Noteworthy, Crous et al. (2021) very recently described several new *Nectriaceae* genera, among which two (*Luteonectria* gen. nov. and *Nothofusarium* gen. nov.) are positioned close to the previously cited genus. However, the phylogenetic divergence between the *Longinectria* spp. (based on a Maximum Likelihood analysis using the accessible sequence, Supplementary Fig. 2) and these new genera, as well as morphological differences regarding phialides and conidia, were in agreement with the existence of another new genus (i.e. *Longinectria* gen. nov.) within the *Nectriaceae* family. Otherwise, temperature impact was investigated on these two species and, interestingly, growth was observed at 5°C while no growth occurred at 30°C and 37°C on PDA. These observations are clearly in agreement with cheese production, as reported for *B. domesticum* for which a maximum growth temperature (T_{max}) was estimated to be 30°C (Schroers et al. 2009).

Overall, the present study clearly highlighted the unexpected diversity of *Nectriaceae* in cheeses which, up to now, were considered to be solely colonized by *B. domesticum* that is used as a technological auxiliary for its “*anticollanti*” ability (Bachmann et al. 2003, 2005). As shown in this study, one can note that even microbial ecosystems that have been associated with human activity for centuries, and quite extensively studied, are still sources to discover novel microbial diversity. The obtained data clearly suggests that cheeses, which is obviously the case for other fermented foods, might harbour much higher diversity than expected. By sampling a relatively small panel of washed-rind cheeses (n = 56), we identified four new species within the *Nectriaceae* family, a family that is best documented for pathogenic species (plant and/or human) (Lombard et al. 2015). This study is therefore a hint that, besides the most emblematic *Penicillium* species, there is still much to discover about cheese microbiota and more specifically the fungal communities of fermented foods. Regarding the four species described in the present study, it should be noted that the obtained results on extralite production tend, so far, towards a safety status (in the sense of the European Qualified Presumption of Safety -QPS- or the US Generally Recognized As Safe -GRAS- statuses) of these isolates as no known mycotoxins, metabolites largely produced by *Fusarium* genus members (e.g. *F. graminearum* or *F. avenaceum*), were observed in the tested conditions. However, as some metabolites are unknown, this aspect should be further investigated. In the future, it could also be of interest to assess the respective functional diversity of these species to better understand their metabolic potential and to use comparative genomics to potentially identify cheese adaptation footprints and elucidate their role in cheese.

Acknowledgments

We thank all people who kindly sent us the various cheeses analyzed in this study (Pr. Luca Cocolin, Pr. Jérôme Mounier, Dr. Guillaume Dubrulle, MR Sten Marc) as well as those

who have provided isolates from their research studies (Dr. Miguel Alvarez, Dr. Baltasar Mayo and Franck Deniel). Otherwise, we would like to thank Mr. Philippe Elies of the PIMMS platform at the Université de Bretagne Occidentale for electronic microscopy acquisitions and Maud Etienne Duplessis for her help regarding the new species names. We would also like to thank Erwan Corre for his help for developing bioinformatics workflows (ABiMS Platform, Station Biologique de Roscoff). Finally, we are also grateful to Pr. Pedro W. Crous, Dr. Lorenzo Lombard and Dr. Marcelo Sandoval-Denis for helpful discussions and for providing the sequences of recently described new *Nectriaceae* genera.

Funding

OS benefited from a Ph. D grant from the Région Bretagne and the French Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation. This work was co-funded by the French Dairy Interbranch Organization (CNIEL) (DIFUS Project, 2019_00627).

Declarations

Conflicts of interest/Competing interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Availability of data and material

The sequences generated and used in this phylogenetic analysis were deposited in GenBank under accession numbers detailed in this paper and the multi-gene phylogenetic analyses were deposited in TreeBASE. The holotype strains were made available at the UBOCC (Université de Bretagne Occidentale, France) and CBS-KNAW (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, The Netherlands) culture collections.

Authors' contributions

EC, MC, and JLJ obtained the funding, supervised the study and designed the experiments. OS performed the experimental work and analysed all data. OS and JLJ performed phylogenetics analysis. OS and MC were involved in extrolite preparations while JCF performed all extrolite analyses on fungal cultures. JR performed some of the *Fusarium*-like fungi isolations and molecular identifications. PN supervised OS for microscopical observations and JLJ contributed to the new species morphological descriptions. OS drafted the manuscript and all co-authors edited and proofread the manuscript.

References

- Anderson JB, Ullrich RC. 1979 – Biological species of *Armillaria mellea* in North America. *Mycologia* 71: 402–414.
- Bachmann H-P, Bobst C, Bütikofer U, Casey MG et al. 2005 – Occurrence and significance of *Fusarium domesticum* alias *Anticollanti* on smear-ripened cheeses. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 38: 399–407.
- Bachmann H-P, Bobst C, Bütikofer U, Dalla M et al. 2003 – Sticky cheese smear and natural white mould. *Milchwissenschaft* 58: 117–232
- Bodinaku I, Shaffer J, Connors A, Steenwyk J et al. 2019 – Rapid phenotypic and metabolomic domestication of wild *Penicillium* molds on cheese. In: *MBio* 10: e02445-19.
- Cheeseman K, Ropars J, Renault P, Dupont J et al. 2014 – Multiple recent horizontal transfers of a large genomic region in cheese making fungi. *Nat Commun* 5:2876.

- Crous PW, Lombard L, Sandoval-Denis M, Seifert KA et al. 2021 – *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. *Studies in Mycology* 98:100116.
- de Queiroz K. 1998 – The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation. In: Howard DJ, Berlocher SH (eds) *Endless Forms: Species and Speciation*. Oxford University Press, pp. 57–75
- Deng W, Maust BS, Nickle DC et al. 2010 – DIVEIN: a web server to analyze phylogenies, sequence divergence, diversity, and informative sites. *Biotechniques* 48: 405–408.
- Dugat-Bony E, Garnier L, Denonfoux J, Ferreira S et al. 2016 – Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. *International Journal of Food Microbiology* 238: 265–273.
- Dumas E, Feurtey A, Rodríguez de la Vega RC, Le Prieur S et al. 2020 – Independent domestication events in the blue-cheese fungus *Penicillium roqueforti*. *Mol Ecol*. 29:2639–2660.
- Dupont J, Dequin S, Giraud T, Le Tacon F et al. 2017 – Fungi as a Source of Food. *Microbiology Spectrum* 5:FUNK-0030-2016.
- Fox PF, Guinee TP. 2020 – Cheese: Overview. In: Reference module in food science. Elsevier.
- Frisvad JC, Thrane U. 1987 – Standardized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone retention indices and UV-VIS spectra (diode array detection). *J Chromatogr* 404: 195–214.
- Frisvad JC, Thrane U. 1993 – Chapter 8 Liquid column chromatography of mycotoxins. In: Betina V (ed) *Journal of Chromatography Library*. Elsevier, pp. 253–372
- Geiser DM, Al-Hatmi A, Aoki T, Arie T et al. 2021 – Phylogenomic analysis of a 55.1 kb 19-gene dataset resolves a monophyletic *Fusarium* that includes the *Fusarium solani* Species Complex. *Phytopathology*.
- Geiser DM, Aoki T, Bacon CW, Baker S et al. 2013 – One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves long standing use. *Phytopathology* 103: 400–408.
- Gerlach W, Nirenberg H. 1982 – The genus *Fusarium* - a pictorial atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem* 209: 1–406.
- Gillot G, Jany J-L, Poirier E, Maillard MB et al. 2017 – Functional diversity within the *Penicillium roqueforti* species. *Int J Food Microbiol* 241: 141–150.
- Hermet A, Méheust D, Mounier J, Barbier G et al. 2012 – Molecular systematics in the genus *Mucor* with special regards to species encountered in cheese. *Fungal Biology* 116: 692–705.
- Hermet A, Mounier J, Keravec M, Vasseur V et al. 2014 – Application of capillary electrophoresis single-stranded conformation polymorphism (CE-SSCP) analysis for identification of fungal communities in cheese. *Food Microbiology* 41: 82–90.
- Irlinger F, Layec S, Hélinck S, Dugat-Bony E. 2015 – Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. *FEMS Microbiol Lett* 362: 1–11.
- Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. 2019 – MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* 20: 1160–1166.
- Kildgaard S, Mansson M, Dosen I, Klitgaard A et al. 2014 – Accurate dereplication of bioactive secondary metabolites from marine-derived fungi by UHPLC-DAD-QTOFMS and a MS/HRMS library. *Mar Drugs* 12: 3681–3705.
- Klitgaard A, Iversen A, Andersen MR, Larsen TO et al. 2014 – Aggressive dereplication using UHPLC-DAD-QTOF: screening extracts for up to 3000 fungal secondary metabolites. *Anal Bioanal Chem* 406: 1933–1943.

- Kuraku S, Zmasek CM, Nishimura O, Katoh K. 2013 – aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity. *Nucleic Acids Research* 41: W22–W28.
- Lebreton A, Corre E, Jany J-L, Brillet-Guéguen L et al. 2020 – Comparative genomics applied to *Mucor* species with different lifestyles. *BMC Genomics* 21: 235.
- Leslie JF, Summerell BA. 2006 – *The Fusarium Laboratory Manual*, Blackwell Publishing.
- Lombard L, van der Merwe NA, Groenewald JZ, Crous PW. 2015 – Generic concepts in *Nectriaceae*. *Studies in Mycology* 80: 189–245.
- Morin-Sardin S, Rigalma K, Coroller L, Jany J-L et al. 2016 – Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor* spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese. *Food Microbiol* 56: 69–79.
- Nielsen KF, Månsson M, Rank C, Frisvad J et al. 2011 – Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. *J Nat Prod* 74: 2338–2348.
- O'Donnell K, Al-Hatmi AMS, Aoki T, Brankovics B et al. 2020 – No to *Neocosmospora*: phylogenomic and practical reasons for continued inclusion of the *Fusarium solani* Species Complex in the genus *Fusarium*. *mSphere* 5: e00810-20.
- Rambaut A. 2006 – FigTree. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (Accessed on April 19, 2021).
- Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G et al. 2018 – Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst Biol* 67: 901–904.
- Ropars J, Cruaud C, Lacoste S, Dupont J. 2012 – A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. *Int J Food Microbiol* 155: 199–210.
- Ropars J, Didiot E, Vega RCR de la, Bennetot B et al. 2020 – Domestication of the emblematic white cheese-making fungus *Penicillium camemberti* and its diversification into two varieties. *bioRxiv* 2020.02.12.945238.
- Ropars J, Lo Y-C, Dumas E, Snirc A et al. 2016 – Fertility depression among cheese-making *Penicillium roqueforti* strains suggests degeneration during domestication. *Evolution* 70: 2099–2109.
- Ropars J, López-Villavicencio M, Snirc A, Lacoste S et al. 2017 – Blue cheese-making has shaped the population genetic structure of the mould *Penicillium roqueforti*. *PLoS One* 12: e0171387.
- Ropars J, Rodríguez de la Vega RC, López-Villavicencio M, Gouzy J et al. 2015 – Adaptive horizontal gene transfers between multiple cheese-associated fungi. *Curr Biol* 25: 2562–2569.
- Sandoval-Denis M, Guarnaccia V, Polizzi G, Crous PW. 2018 – Symptomatic *Citrus* trees reveal a new pathogenic lineage in *Fusarium* and two new *Neocosmospora* species. *Persoonia* 40: 1–25.
- Sandoval-Denis M, Lombard L, Crous PW. 2019 – Back to the roots: a reappraisal of *Neocosmospora*. *Persoonia* 43: 90–185.
- Schroers H-J, O'Donnell K, Lamprecht SC, Kammeyer PL et al. 2009 – Taxonomy and phylogeny of the *Fusarium dimerum* species group. *Mycologia* 101: 44–70.
- Stamatakis A. 2014 – RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312–1313.
- Stamatakis A. 2016 – *The RAxML v8. 2. X Manual*. Heidelberg Institute for Theoretical Studies.
- Suihko M-L, Alakomi H-L, Gorbushina A, Fortune I et al. 2007 – Characterization of aerobic bacterial and fungal microbiota on surfaces of historic Scottish monuments. *Syst Appl Microbiol* 30: 494–508.
- Summerell BA. 2019 – Resolving *Fusarium*: Current Status of the Genus. *Annu Rev Phytopathol* 57: 323–339.

- Sun B-D, Zhou Y-G, Chen A. 2017 – *Bisifusarium tonghuanum* (Nectriaceae), a novel species of *Fusarium*-like fungi from two desert oasis plants. *Phytotaxa* 317: 123.
- Swofford DL. 2003 – Paup*. Phylogenetic analysis using parsimony and other methods. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T et al. 2000 – Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31: 21–32.
- Wolfe BE, Button JE, Santarelli M, Dutton RJ. 2014 – Cheese rind communities provide tractable systems for *in situ* and *in vitro* studies of microbial diversity. *Cell* 158: 422–433.
- Yang Z. 2006 – Computational Molecular Evolution. Oxford: Oxford University Press.
- Zhang N, O'Donnell K, Sutton DA, Nalim FA et al. 2006 – Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *J Clin Microbiol* 44: 2186–2190.
- Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, van 't Riet K. 1990 – Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol* 56: 1875–1881

Supplementary data

Table S1 List and details of primers used for the ten locus phylogenetic analyses.

Locus	Primers	Sequences	References	Included sites
<i>acl1</i>	acl1-230up	AGC CCG ATC AGC TCA TCA AG	Gräfenhan et al. 2011	487
	acl1-1220low	CCT GGC AGC AAG ATC VAG GAA GT		
<i>act</i>	ACT-512F	ATG TGC AAG GCC GGT TTC GC	Carbone & Kohn 1999	536
	ACT1Rd	CRT CGT ACT CCT GCT TBG AGA TCC AC	Groenewald et al. 2013	
<i>cmdA</i>	CAL-228F	GAG TTC AAG GAG GCC TTC TCC C	Carbone & Kohn 1999	413
	CAL2Rd	TGR TCN GCC TCD CGG ATC ATC TC	Groenewald et al. 2013	
<i>his3</i>	CYLH3F	AGG TCC ACT GGT GGC AAG	Crous et al. 2004	319
	CYLH3R	AGC TGG ATG TCC TTG GAC TG		
<i>ITS</i>	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White et al. 1990	533
	ITS5	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G		
<i>LSU</i>	LR0R	GTA CCC GCT GAA CTT AAG C	Rehner & Samuels 1994	758
	LR5	ATC CTG AGG GAA ACT TC	Vilgalys & Hester 1990	
<i>rpb1</i>	RPB1-Ac	GAK TGT CCK GGW CAT TTT GG	Matheny et al. 2002	656
	RPB1-Cr	CC NGC DAT NTC RTT RTC CAT RTA		
<i>rpb2</i>	RPB2-5F2	GGG GWG AYC AGA AGA AGG C	O'Donnell et al. 2007	780
	RPB2-7cR	CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT		
<i>tef1</i>	EF1-728F	CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG	Carbone & Kohn 1999	351
	EF2	GGA RGT ACC AGT SAT CAT GTT	O'Donnell et al. 1998	
<i>tub2</i>	T1	AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT	O'Donnell & Cigelnik 1997	301
	CYLTUB1R	AGT TGT CGG GAC GGA AGA G		

Carbone I, Kohn LM. 1999 – A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91:553–556.

Crous PW, Groenewald JZ, Risède J-M, et al 2004 – *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. *Studies in Mycology* 50:415–429

Gräfenhan T, Schroers H-J, Nirenberg HI, Seifert KA. 2011 – An overview of the taxonomy, phylogeny, and typification of nectriaceous fungi in *Cosmospora*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Stilbella*, and *Volutella*. *Studies in Mycology* 68:79–113.

Groenewald JZ, Nakashima C, Nishikawa J, et al. 2013 – Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. *Stud Mycol* 75:115–170.

Matheny PB, Liu YJ, Ammirati JF, Hall BD. 2002 – Using RPB1 sequences to improve phylogenetic inference among mushrooms (*Inocybe*, Agaricales). *Am J Bot* 89:688–698.

O'Donnell K, Cigelnik E. 1997 – Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol Phylogenet Evol* 7:103–116.

O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC. 1998 – Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2044–2049.

O'Donnell K, Sarver BAJ, Brandt M, et al. 2007 – Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic *Fusaria*, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. *J Clin Microbiol* 45:2235–2248.

Rehner SA, Samuels GJ. 1994 – Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* 98:625–634.

Vilgalys R, Hester M. 1990 – Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J Bacteriol* 172:4238–4246.

White T, Bruns T, Lee S, et al. 1990 – Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *Pcr Protocols: a Guide to Methods and Applications*, pp 315–322

Table S2 Strains and sequences (from Lombard et al., 2015) included in the phylogenetic analyses.

Species	Isolate	Substrate	Locality	GenBank Accession No.									
				<i>acl1</i>	<i>act</i>	<i>cmdA</i>	<i>his3</i>	<i>ITS</i>	<i>LSU</i>	<i>rpb1</i>	<i>rpb2</i>	<i>tef1</i>	<i>tub2</i>
<i>"Acremonium cf. curvulum"</i>	CBS 100551	<i>Olea europaea</i>	Italy	KM231057	KM231223	KM231400	KM231552	KM231818	HQ232031	KM232244	KM232385	KM231949	KM232088
<i>Albonectria rigidiuscula</i>	CBS 122570; GJS 01-170	Bark	Cameroon	HQ897896	KM231205	KM231382	KM231533	HQ897815	KM231676	KM232228	HQ897760	KM231937	KM232070
<i>Allantonectria miltina</i>	CBS 121121; AR 4391	<i>Agave americana</i>	Italy	KM231081	HM484514	KM231431	KM231593	HM484547	HM484572	HM484587	KM232409	HM484524	HM484609
<i>Bisifusarium delphinoides</i>	CBS 120718T; CPC 13041	<i>Hoodia gordonii</i>	South Africa	KM230994	KM231188	KM231363	KM231515	EU926229	KM231660	KM232210	-	EU926296	KM232056
<i>B. domesticum</i>	CBS 116517; NRRL 29976	Cheese	Switzerland	KM230997	KM231191	KM231366	KM231518	EU926219	JQ434512	KM232213	HQ897694	EU926286	JQ434531
<i>B. lunatum</i>	CBS 632.76T; BBA 63199; NRRL 20690	<i>Gymnocalcium damsii</i>	Germany	HQ897902	KM231192	KM231367	KM231519	HQ897819	KM231662	KM232214	HQ897766	EU926291	KM232057
<i>B. nectrioides</i>	CBS 176.31T; NRRL 20689	Soil	Honduras	KM230993	KM231187	KM231362	KM231514	EU926245	KM231659	KM232209	JX171591	EU926312	KM232055
<i>B. penzigii</i>	CBS 317.34T; NRRL 22109	<i>Fagus sylvatica</i>	UK	KM230995	KM231189	KM231364	KM231516	KM231795	KM231661	KM232211	KM232362	EU926324	EU926390
<i>B. tonghuanum</i>	CGMCC 3.17369T	<i>Atriplex centralasiatica</i>	China, Inner Mongolia	-	-	-	-	KX790413	KX790414	KY964341	KY964339	KX790418	KX790417
<i>Corallomycetella elegans</i>	CBS 275.60	<i>Musa sapientum</i>	Zaire	-	KM231237	-	KM231567	KM231828	KM231710	-	KM232393	KM231963	KM232100
<i>C. repens</i>	CBS 358.49	<i>Carica papaya</i>	Java	KM231063	KC479740	-	KM231565	KC479756	KM231708	KM232258	KM232391	KM231961	KC479785
<i>Cosmospora arxii</i>	CBS 748.69T	<i>Hypoxylon</i> sp.	Germany	-	KM231224	KM231401	KM231553	KM231819	KM231694	KM232245	HQ897725	KM231950	KM232089
<i>C. coccinea</i>	CBS 341.70T	<i>Inonotus nodulosus</i>	Germany	HQ897913	KM231221	KM231398	KM231550	HQ897827	KM231692	KM232242	HQ897777	KM231947	KM232086
<i>C. cymosa</i>	CBS 762.69T	<i>Inonotus radiatus</i>	Germany	HQ897914	KM231222	KM231399	KM231551	HQ897828	KM231693	KM232243	HQ897778	KM231948	KM232087

Table S2 Continued

Species	Isolate	Substrate	Locality	GenBank Accession No.									
				<i>act1</i>	<i>act</i>	<i>cmdA</i>	<i>his3</i>	<i>ITS</i>	<i>LSU</i>	<i>rpb1</i>	<i>rpb2</i>	<i>tef1</i>	<i>tub2</i>
<i>Cosmospora</i> sp./ <i>Stylonectria</i> <i>wegeliniana</i>	CBS 101915; GJS 83-159	Lichen	New Zealand	KM231058	KM231225	KM231402	KM231554	KM231820	KM231695	KM232246	KM232386	KM231951	KM232090
<i>Cyanonectria buxi</i>	CBS 125551T; HJS 1398	<i>Buxus sempervirens</i>	Slovenia	HM626630	-	-	-	HM626661	HM626673	-	-	HM626648	-
	CBS 130.97	<i>Buxus sempervirens</i>	France	-	KM231210	KM231388	KM231539	-	-	KM232233	HM626690	-	KM232075
<i>C. cyanostoma</i>	CBS 101734T; GJS 98-127	<i>Buxus sempervirens</i>	France	HQ897895	GQ505961	KM231387	KM231538	FJ474076	HM626671	GQ506017	HQ897759	HM484611	HM484611
<i>Dialonectria episphaeria</i>	CBS 125494; TG 2006-11	Unknown Ascomycete	Canada	HQ897892	KM231227	KM231404	KM231556	HQ897811	KM231697	KM232248	HQ897756	KM231953	KM232092
<i>D. ullevolea</i>	CBS 125493; TG 2007-56	Unknown Ascomycete	USA	HQ897918	KM231226	KM231403	KM231555	KM231821	KM231696	KM232247	HQ897782	KM231952	KM232091
<i>Fusarium circinatum</i>	CBS 405.97T; BBA 69720; NRRRL 25331	<i>Pinus radiata</i>	USA	KM231017	KM231215	KM231393	KM231544	U61677	AY249397	-	JX171623	KM231943	KM232080
<i>F. sambucinum</i>	CBS 146.95; BBA 64226	<i>Solanum tuberosum</i>	UK	KM231015	KM231213	KM231391	KM231542	KM231813	KM231682	KM232235	KM232381	KM231941	KM232078
<i>F. venenatum</i>	CBS 458.93T; BBA 64537; NRRRL 26228	Winter wheat	Austria	KM231016	KM231214	KM231392	KM231543	KM231814	KM231683	KM232236	KM232382	KM231942	KM232079
<i>F. verrucosum</i>	CBS 102163; GJS 84-426	Bamboo	Venezuela	HQ897920	KM231212	KM231390	KM231541	KM231812	KM231681	KM232234	HQ897784	KM231940	KM232077
<i>Fusicolla aquaeductuum</i>	CBS 837.85; BBA 64559; NRRRL 20865	Plug in water tap	Germany	HQ897880	-	KM231406	-	KM231823	KM231699	KM232250	HQ897744	KM231955	KM232094
<i>F. matuoi</i>	CBS 581.78; ATCC 18694; NRRRL 20427	<i>Albizia julibrissin</i>	Japan	HQ897858	KM231228	KM231405	KM231557	KM231822	KM231698	KM232249	HQ897720	KM231954	KM232093
<i>F. violacea</i>	CBS 634.76T; BBA 62461; NRRRL 20896	<i>Quadraspidiotus perniciosus</i>	Iran	KM231059	KM231229	KM231407	KM231558	KM231824	KM231700	KM232251	HQ897696	KM231956	KM232095
<i>Geejayessia celtidicola</i>	CBS 125502T; TG 2008-32	<i>Celtis occidentalis</i>	Canada	HM626625	KM231209	KM231386	KM231537	HM626657	HM626669	KM232232	HM626685	HM626638	KM232074

Table S2 Continued

Species	Isolate	Substrate	Locality	GenBank Accession No.									
				<i>acl1</i>	<i>act</i>	<i>cmdA</i>	<i>his3</i>	<i>ITS</i>	<i>LSU</i>	<i>rpb1</i>	<i>rpb2</i>	<i>tef1</i>	<i>tub2</i>
<i>G. cicatricum</i>	CBS 125549T; HJS 1372	<i>Buxus sempervirens</i>	Slovenia	HM626636	KM231208	KM231385	KM231536	KM231810	KM231678	KM232231	HM626679	HM626643	KM232073
<i>G. desmazieri</i>	CBS 125507; TG 2007-87	<i>Buxus sempervirens</i>	Spain	HM626633	KM231207	KM231384	KM231535	HM626651	HM626663	KM232230	HM626675	HQ728146	KM232072
<i>Macroconia leptosphaeria</i>	CBS 100001	<i>Urtica dioica</i>	The Netherlands	HQ897891	KM231234	KM231412	KM231562	HQ897810	KM231705	KM232255	HQ897755	KM231959	KM232097
<i>M. leptosphaeria</i>	CBS 112770	<i>Cucurbitaria laburni</i>	Austria	KM231061	KM231235	KM231413	KM231563	KM231826	KM231706	KM232256	KM232389	KM231960	KM232098
<i>M. papilionacearum</i>	CBS 125495; DAOM 238119; TG 2007-03	Black ascomycete on <i>Fabaceae</i>	USA	HQ897912	KM231233	KM231411	KM231561	HQ897826	KM231704	KM232254	HQ897776	KM231958	KM232096
<i>Microcera coccophila</i>	CBS 310.34; NRRL 13962	Scale insect	Italy	HQ897843	KM231232	KM231410	KM231560	HQ897794	KM231703	JX171462	HQ897705	JF740692	-
<i>M. larvarum</i>	CBS 738.79; BBA 62239; MUCL 19033; NRRL 20473	<i>Quadrapidiotus perniciosus</i>	Iran	KM231060	KM231230	KM231408	KM231559	KM231825	KM231701	KM232252	KM232387	KM231957	-
<i>M. rubra</i>	CBS 638.76T; BBA 62460; NRRL 20475	<i>Quadrapidiotus perniciosus</i>	Iran	HQ897903	KM231231	KM231409	EU860073	HQ897820	KM231702	KM232253	HQ897767	JF740696	EU860019
<i>Nalanthamala psidii</i>	CBS 116952T; AR 4095	<i>Psidium guajava</i>	Taiwan	KM231073	KM231245	KM231423	KM231576	AY864836	AY864837	KM232268	KM232401	KM231972	AY864838
<i>N. vermoesonii</i>	CBS 110893T; MUCL 9504	<i>Areca</i> sp.	-	KM231072	KM231244	KM231422	KM231575	AY554214	AY554246	KM232267	KM232400	KM231971	AY554233
<i>Nectria balansae</i>	CBS 123351; AR 4446	<i>Coronila</i> sp.	France	KM231079	GQ505977	KM231429	KM231582	HM484552	GQ505996	GQ506026	KM232407	HM484525	HM484607
	CBS 129349; AR 4635	Twigs	China	KM231077	JF832485	KM231427	KM231580	JF832653	JF832711	JF832790	KM232405	JF832522	JF832908
<i>N. cinnabarina</i>	CBS 125165T; AR 4477; CLL 7152	<i>Aesculus</i> sp.	France	KM231074	HM484503	KM231424	KM231577	HM484548	HM484562	HM484577	KM232402	HM484527	HM484606

Table S2 Continued

Species	Isolate	Substrate	Locality	GenBank Accession No.									
				<i>acl1</i>	<i>act</i>	<i>cmdA</i>	<i>his3</i>	<i>ITS</i>	<i>LSU</i>	<i>rpb1</i>	<i>rpb2</i>	<i>tef1</i>	<i>tub2</i>
<i>N. mariae</i>	CBS 125294T; CLL 7187	<i>Buxus sempervirens</i>	France	KM231076	JF832499	KM231426	KM231579	JF832629	JF832684	JF832789	KM232404	JF832542	JF832899
<i>N. nigrescens</i>	CBS 125148T; AR 4211	Wood	USA	KM231075	HM484618	KM231425	KM231578	HM484707	HM484720	HM484781	KM232403	HM484672	HM484806
<i>Neocosmospora ambrosia</i>	CBS 571.94; BBA 65390	<i>Camellia sinensis</i>	India	KM231003	KM231198	KM231373	-	KM231801	KM231668	KM232220	KM232368	KM231929	KM232063
<i>N. pisi</i>	CBS 123669; NRRL 45880	potato field	USA	KM230998	KM231193	KM231368	KM231520	KM231796	KM231663	KM232215	KM232364	KM231925	KM232058
<i>N. illudens</i>	CBS 126406; GJS 85-67	Bark	New Zealand	KM231009	JF832443	KM231378	KM231529	JF832660	JF832762	JF832837	KM232373	KM231934	JF832841
<i>N. phaseoli</i>	CBS 102429; HJS 0332	Bark	Australia	KM231011	KM231204	KM231381	KM231532	KM231808	KM231675	KM232227	KM232376	KM231936	KM232069
<i>N. lichenicola</i>	CBS 509.63T; IMUR 410; MUCL 8050	Air	Brazil	KM231004	KM231199	KM231374	KM231525	KM231802	KM231669	KM232221	KM232369	KM231930	KM232064
<i>N. solani</i>	CBS 101018T	<i>Rubus idaeus</i>	Italy	KM231002	KM231197	KM231372	KM231524	KM231800	KM231667	KM232219	KM232367	KM231928	KM232062
<i>N. vasinfecta</i>	CBS 325.54; ATCC 16238; IFO 7591	Soil	South Africa	KM231005	KM231200	KM231375	KM231526	KM231803	KM231670	KM232222	KM232370	KM231931	KM232065
<i>Paracremonium contagium</i>	CBS 110348T; UAMH 10141	<i>Homo sapiens</i>	Canada	KM231067	KM231240	KM231417	KM231570	KM231831	HQ232118	KM232262	KM232396	KM231966	KM232103
<i>P. inflatum</i>	CBS 485.77T; CDC 77-043179	<i>Homo sapiens</i>	India	KM231065	KM231238	KM231415	KM231568	KM231829	HQ232113	KM232260	KM232394	KM231964	KM232101
<i>Rectifusarium robinianum</i>	CBS 830.85; BBA 64246; NRRL 13953	<i>Solanum tuberosum</i>	Germany	KM230992	-	KM231359	KM231511	KM231793	KM231656	-	JX171575	KM231922	KM232052
<i>Stylonectria applanata</i>	CBS 125489; TG 2008-24	<i>Betula</i> sp.	Canada	-	KM231218	-	KM231547	HQ897805	KM231689	KM232239	HQ897739	KM231944	KM232083
<i>S. wegeliniana</i>	CBS 125490; TG 2009-03	<i>Hapalycystis bicaudata</i>	Austria	HQ897890	KM231219	KM231396	KM231548	KM231817	KM231690	KM232240	HQ897754	KM231945	KM232084

Table S2 Continued

Species	Isolate	Substrate	Locality	GenBank Accession No.									
				<i>acl1</i>	<i>act</i>	<i>cmdA</i>	<i>his3</i>	<i>ITS</i>	<i>LSU</i>	<i>rpb1</i>	<i>rpb2</i>	<i>tef1</i>	<i>tub2</i>
<i>S. corniculata</i>	CBS 125491; TG 2007-21	Unknown Ascomycete	Germany	HQ897915	KM231220	KM231397	KM231549	HQ897829	KM231691	KM232241	HQ897779	KM231946	KM232085
<i>Xenoacremonium falcatum</i>	CBS 400.85T	<i>Pinus radiata</i>	New Zealand	KM231068	-	KM231418	KM231571	KM231832	HQ232025	KM232263	-	KM231967	KM232104
<i>X. recifei</i>	CBS 137.35T; IHEM 4405; MUCL 9696	<i>Homo sapiens</i>	Brazil	KM231069	KM231241	KM231419	KM231572	KM231833	HQ232106	KM232264	KM232397	KM231968	KM232105

Table S3 Nucleotides differences among genus *Bisifusarium*, calculated on the alignment dataset of 5134 nucleotides.

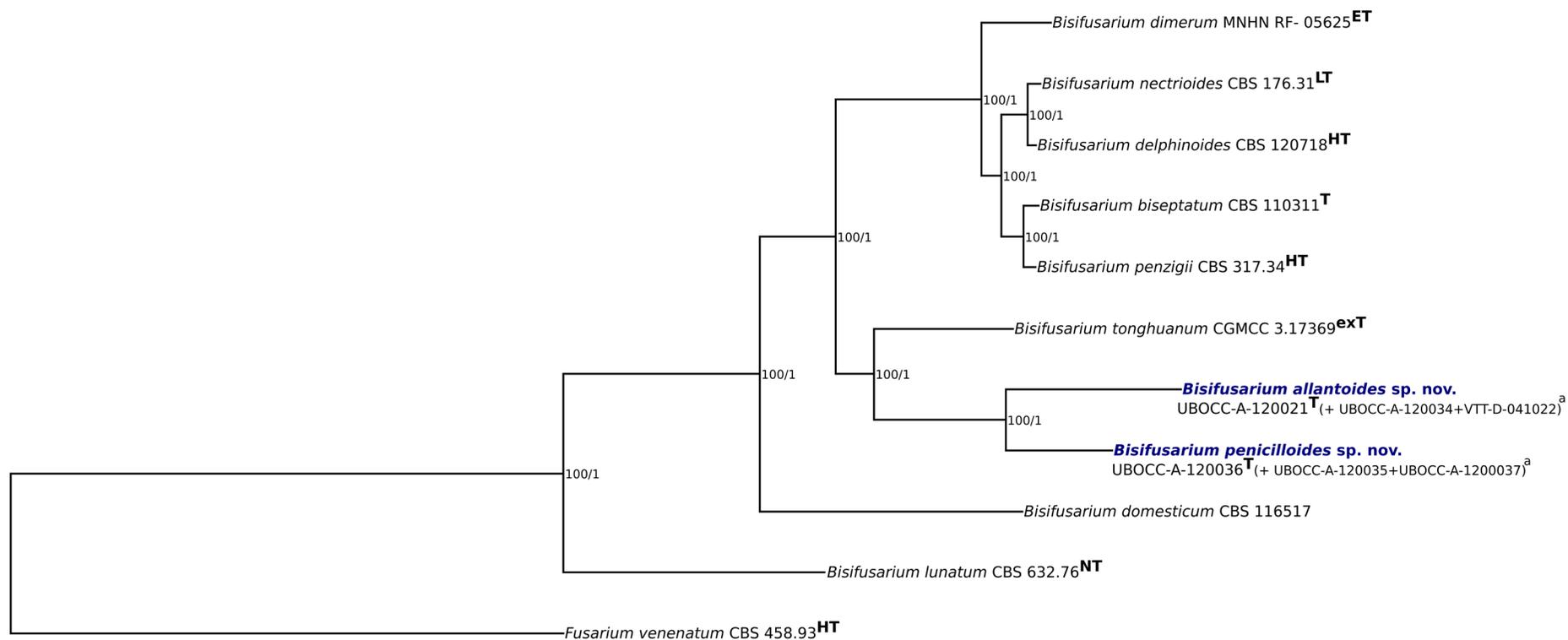
	<i>B. lunatum</i> (CBS 632.76 ^T)	<i>B. penzigii</i> (CBS 317.34 ^T)	<i>B. biseptatum</i> (CBS 110311 ^T)	<i>B. delphinoides</i> (CBS 120718 ^T)	<i>B. nectrioides</i> (CBS 176.31 ^T)	<i>B. dimerum</i> (MNHN-RF-05625 ^T)	<i>B. penicilloides</i> (UBOCC-A-120021 ^T)	<i>B. allantoides</i> (UBOCC-A-120036 ^T)	<i>B. domesticum</i> (CBS 116517)
<i>B. lunatum</i> (CBS 632.76 ^T)		625 (87.3%)	640 (87.0 %)	507 (88.0%)	628 (87.3%)	651 (86.8%)	676 (86.3%)	648 (86.8%)	700 (85.6%)
<i>B. penzigii</i> (CBS 317.34 ^T)	625 (87.3%)		73 (98.5%)	131 (96.9%)	165 (96.6%)	259 (94.8%)	573 (88.4%)	591 (88.0%)	659 (86.5%)
<i>B. biseptatum</i> (CBS 110311 ^T)	640 (87.0 %)	73 (98.5%)		154 (96.3%)	179 (96.4%)	254 (94.8%)	566 (88.5%)	571 (88.4 %)	671 (86.2%)
<i>B. delphinoides</i> (CBS 120718 ^T)	507 (88.0%)	131 (96.9%)	154 (96.3%)		61 (98.5%)	221 (94.8%)	466 (88.9%)	487 (88.3%)	496 (86.2%)
<i>B. nectrioides</i> (CBS 176.31 ^T)	628 (87.3%)	165 (96.6%)	179 (96.4%)	61 (98.5%)		258 (94.8%)	580 (88.3%)	590 (88.0%)	656 (86.5%)
<i>B. dimerum</i> (MNHN-RF-05625 ^T)	651 (86.8%)	259 (94.8%)	254 (94.8%)	221 (94.8%)	258 (94.8%)		592 (88.0%)	598 (87.8%)	681 (86.0%)
<i>B. penicilloides</i> (UBOCC-A-120021 ^T)	676 (86.3%)	573 (88.4%)	566 (88.5%)	466 (88.9%)	580 (88.3%)	592 (88.0%)		358 (92.7%)	657 (86.5 %)
<i>B. allantoides</i> (UBOCC-A-120036 ^T)	648 (86.8%)	591 (88.0%)	571 (88.4 %)	487 (88.3%)	590 (88.0%)	598 (87.8%)	358 (92.7%)		680 (85.9%)
<i>B. domesticum</i> (CBS 116517)	700 (85.6%)	659 (86.5%)	671 (86.2%)	496 (86.2%)	656 (86.5%)	681 (86.0%)	657 (86.5 %)	680 (85.9%)	

Bisifusarium tonghuanum was not included in this analysis due to missing data. The nucleotides differences of *B. delphinoides* were calculated with one missing locus. In parenthesis are represented the common identity between two species, in percent.

Table S4 Nucleotides differences between species of closest genera to genus *Longinectria*.

		<i>Fusarium</i>	<i>Stylonectria</i>	<i>Bisifusarium</i>	<i>Longinectria</i>	<i>Neocosmospora</i>	<i>Albonectria</i>	<i>Geejayessia</i>	<i>Cyanonectria</i>
<i>Fusarium</i>	min		1036	933	774	707	752	788	722
	max		1059	1040	829	876	768	830	783
<i>Stylonectria</i>	min	1036		995	901	857	924	903	929
	max	1059		1091	978	967	924	940	993
<i>Bisifusarium</i>	min	933	995		856	827	876	859	909
	max	1040	1091		909	963	925	939	975
<i>Longinectria</i>	min	774	901	856		566	570	583	588
	max	829	978	909		754	643	694	653
<i>Neocosmospora</i>	min	707	857	827	566		539	560	554
	max	876	967	963	754		649	716	712
<i>Albonectria</i>	min	752	924	876	570	539		579	589
	max	768	924	925	643	649		610	604
<i>Geejayessia</i>	min	788	903	859	583	560	579		622
	max	830	940	939	694	716	610		649
<i>Cyanonectria</i>	min	722	929	909	588	554	589	622	
	max	783	993	975	653	712	604	649	

The nucleotides differences (minimal and maximal difference) were calculated on the alignment dataset of 5134 nucleotides.



– 0.01

Figure S1 – Maximum-likelihood phylogenetic consensus tree of *Bisifusarium* genus inferred from the combined six gene sequences subset (*ITS*, *LSU*, *rpb1*, *rpb2*, *tef1* and *tub2*). Maximum-likelihood bootstrap supports and Bayesian posterior probabilities are represented at nodes (respectively right and left). The tree is rooted with *F. venenatum* CBS 458.93^T. “ET”, “LT”, “HT”, “T”, “exT”, “NT” respectively mean epitype, lectotype, holotype, type, ex-type and neotype. The two new species within the genus *Bisifusarium* are written in blue and bold.

“a”: Only the sequences of the type strain of each proposed species were used in the phylogenetic analysis given the very low nucleotide divergence between strains within the considered species.

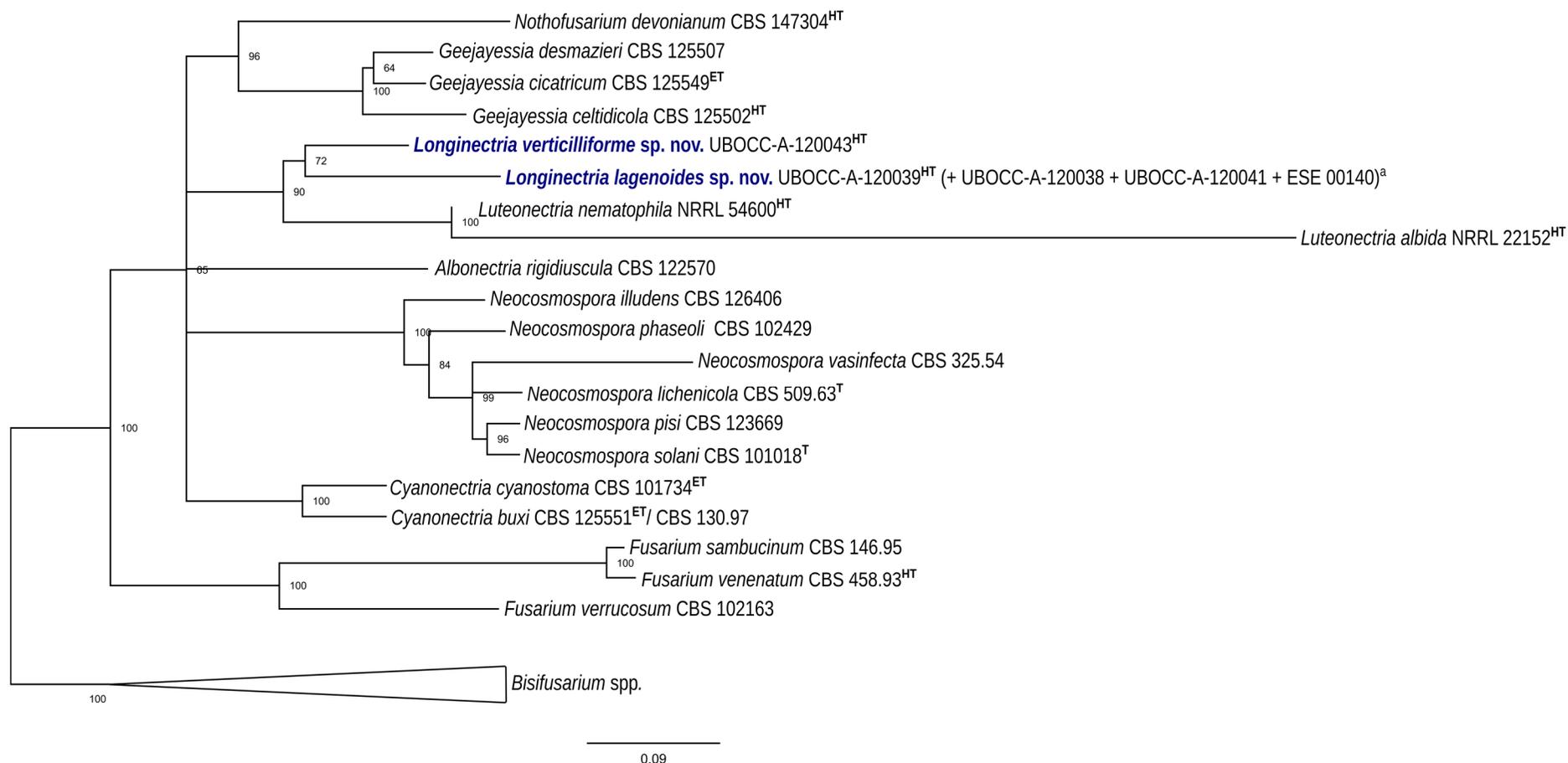


Figure S2 – Maximum-likelihood phylogenetic consensus tree of closest genera to *Longinectria* genus inferred from the combined seven gene sequences subset (*ac11*, *cmdA*, *ITS*, *LSU*, *rpb2*, *tef1* and *tub2*). Maximum-likelihood bootstrap supports are represented at nodes. The tree is rooted with *Bisifusarium* spp (*B. allantoides* UBOCC-A-120036, *B. biseptatum* CBS 110311, *B. dimerum* MNRN-RF-05625, *B. domesticum* CBS 116517, *B. lunatum* CBS 632.76, *B. nectrioides* CBS 176.31, *B. penicilloides* UBOCC-A-120021 and *B. penzigii* CBS 317.34). “ET”, “LT”, “HT”, “T”, “NT” respectively mean epitype, lectotype, holotype, type and neotype. The new species within the genera *Bisifusarium* and *Longinectria* are written in blue and bold.

“a”: Only the sequences of the type strain of each proposed species were used in the phylogenetic analysis given the very low nucleotide divergence between strains within the considered species.

III. Analyse des groupes de gènes orthologues des nouvelles espèces de *Nectriaceae* associées au fromage

III.1. Contexte et objectifs

Afin d'approfondir l'étude de ces espèces nouvellement décrites par nos soins (i.e. *B. allantoides*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* et *L. verticilliforme*), les génomes des souches néotypes des quatre nouvelles espèces ainsi que de *B. domesticum* (n=4) ont pu être obtenus grâce à une collaboration avec le Dr. Jeanne Ropars au cours de laquelle j'ai eu l'opportunité d'effectuer une mobilité dans son laboratoire afin de réaliser une étude préliminaire de génomique comparative des *Nectriaceae*. Ainsi, après une extraction d'ADN, le séquençage des génomes par un prestataire de service (Genoscope, Evry), l'assemblage et l'annotation des génomes ont été effectués par l'équipe ESE. La présente étude avait pour but, entre autres, de comparer les génomes des espèces isolées de fromages aux génomes d'espèces isolées d'autres environnements, afin de *i)* reconstruire une phylogénie sur la base des gènes orthologues simple copie pour la confronter à celle précédemment effectuée avec dix gènes (i.e. *acl1*, *act*, *cmdA*, *his3*, *LSU*, *ITS*, *rpb1*, *rpb2*, *tef1* et *tub2*) et présentée dans la **publication n°1** (Savary et al., 2021a), et *ii)* mettre éventuellement en évidence des gènes spécifiques à une ou à plusieurs espèces et/ou isolats de *Nectriaceae* associés au fromage, et qui pourraient être impliqués dans l'éventuelle adaptation de ces espèces à l'environnement fromager.

III.2. Approche expérimentale

III.2.1. Sélection des isolats *Nectriaceae* de l'étude

Sur la base de l'étude de Savary et al., (2021a), toutes les espèces présentes dans l'étude phylogénétique et dont un génome était disponible dans les bases de données ont été sélectionnées. D'autre part, les génomes des souches néotypes de *B. allantoides*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* et *L. verticilliforme*, ainsi que d'un second isolat de *L. lagenoides*, quatre isolats de *B. domesticum*, un isolat de *F. culmorum* et *F. solani s.l.*, tous isolés des fromages, ont été séquencés, portant ainsi le nombre de génomes étudiés à 40 (**Tableau 4**).

III.2.2. Extraction d'ADN et séquençage des génomes

L'ADN génomique des isolats *B. allantoides* UBOCC-A-120036, *B. domesticum* UBOCC-A-120004, *B. penicilloides* UBOCC-A-120021, *L. lagenoides* UBOCC-A-120039 et *L. verticilliforme* UBOCC-

A-120043 a été extrait à partir de 400 milligrammes de mycélium d'une culture monospore de 10–14 jours effectuée à 25°C sur milieu M2Lev surmonté d'un feuillet de cellophane (Hutchinson, La Châlette-sur-Loing, France). Pour cela, le kit d'extraction d'ADN NucleoSpin Soil (Macherey-Nagel, Allemagne) a été utilisé en suivant les instructions du fournisseur, avec le « buffer SL2 », sans ajout du « enhancer SX » et une lyse effectuée au broyeur vibrant (Retsch MM400) par trois passages à 30 Hz pendant 30 secondes. Enfin, l'ADN a été élué avec 60–100 µL d'éluant. La quantité et la qualité de l'ADN extrait ont été assurées respectivement par un dosage au spectrophotomètre Nanodrop (Labtech, France) puis au fluoromètre Qubit et la réalisation d'un gel d'électrophorèse. Chaque extrait a été stocké à -20°C jusqu'à son envoi. Le séquençage a été effectué avec la technologie Illumina NovaSeq (paired-end, 2 x 150 bp).

III.2.3. Assemblage et annotation des génomes

Les lectures courtes (*short reads*) générées par la technologie Illumina NovaSeq (Genoscope, Evry) ont été nettoyées avec Trimmomatic (Bolger et al., 2014) version 0.36 (PE -threads 4 -phred 33 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:25 MINLEN:36) puis assemblées avec SPAdes (Bankevich et al., 2012) version 3.11.1 (paramètre --careful, utilisation des fichiers non paillés). L'annotation structurale des génomes a été réalisée avec BRAKER (Hoff et al., 2019).

III.2.4. Reconstruction phylogénétique

Les groupes d'orthologues ont été obtenus sur la base d'alignements de séquences protéiques effectués pour chaque génome comparativement à tous les autres génomes de l'étude avec l'outil Diamond v0.9.36.137 (Buchfink et al., 2015). A partir du fichier résultats des blastp ("output"), une analyse "*Markov Clustering*" a été réalisée en utilisant l'outil "*orthAgogue*" (Ekseth et al., 2014). Ensuite, seules les séquences protéiques des gènes simple copie ont été conservées (n=2724) et alignées indépendamment en utilisant MUSCLE avec les paramètres par défaut (Edgar, 2004) puis concaténées. Enfin, un alignement avec les régions codantes correspondantes grâce aux annotations "coding sequences" (CDS) a été effectué par MACSE v2.03, Ranwez et al. (2018) et une analyse phylogénétique par maximum de vraisemblance (ML) a été réalisée en utilisant IQ-TREE2 version 2.1.1 (Minh et al., 2020; disponible sur <http://www.iqtree.org/>) avec un fichier de partition par gènes (permettant ainsi pour chaque partition d'avoir son propre modèle de substitution et de taux d'évolution) et les options -B 1000 (bootstrap) et -alrt 1000 (aLRT).

III.2.5. Recherche de protéines communes entre espèces associées aux fromages

A partir des groupes d'orthologues, les protéines spécifiques d'un isolat mais aussi communes à différents isolats fromagers ont été recherchées. D'autre part, à partir de l'ensemble des séquences nucléotidiques des génomes, des analyses blastn ont été effectués entre les isolats fromagers, puis la présence de régions communes, faisant plus de 1 000 bp avec 98 % d'identité entre deux génomes d'espèces associées aux fromages, a été recherchée. Enfin, les séquences protéiques d'intérêt ont été soumises au programme en ligne "HMMER" (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/phmmer>) afin d'identifier la fonction putative des gènes de ces régions.

III.3. Résultats

La comparaison génomique des 40 génomes de *Nectriaceae* a mis en évidence 30 611 groupes d'orthologues, dont 2724 correspondent à des gènes simple copie. L'arbre phylogénétique obtenu (**Figure 18**) a permis de conforter la précédente phylogénie effectuée par nos soins sur dix gènes, et notamment d'assurer le positionnement du genre nouvellement décrit *Longinectria* par rapport au genre *Luteonectria* décrit par Crous et al. (2020) en deux clusters génétiques distincts (voir Figure 1 de la publication n°1). D'autre part, une analyse complémentaire des groupes d'orthologues a permis de mettre en évidence, *i*) des séquences spécifiques à chaque isolat (**Tableau 5**) et *ii*) des protéines spécifiquement partagées entre certains isolats (**Tableau 6**) tels qu'entre les cinq isolats de *B. domesticum* (n=213 protéines), mais aussi entre des isolats de différentes espèces telles que *B. allantoides* et *B. penicilloides* (n=67), tandis qu'aucune protéine n'était strictement uniquement partagée par les cinq espèces associées au fromage. Parmi les protéines correspondant aux différents orthogroupes et gènes spécifiques, confrontées à la base de données "HMMER", certaines ont pu être identifiées quand d'autres correspondent à des protéines non caractérisées (~40 à 75 % des protéines) (**Tableaux 5 et 6**). Par ailleurs, parmi les identifications proposées par "HMMER", il a pu être observé qu'elles étaient fréquemment associées à des espèces *Fusarium*. De plus, sur la base des protéines prédites mises en évidence, parmi les protéines spécifiques de *B. domesticum* ont été identifiées certaines qui semblent importantes pour l'adaptation au milieu fromager, tels que "Carboxylic ester hydrolase" qui pourrait être impliqué dans la production de composés volatils et potentiellement aromatiques, tandis que les "Sodium transport ATPase", "Siderophore iron transporter", "Sugar transporter" pourraient quant à eux apporter un avantage pour accéder aux nutriments, à savoir prélever le fer dans le fromage dans lequel il n'est que faiblement disponible (Bonham et al., 2017; Monnet et al., 2010) ou encore limiter la toxicité liée au sodium (Bois et al., 2006) .

Une seconde investigation a été effectuée sur l'ensemble du génome des espèces associées au fromage via la recherche d'identité nucléotidique entre deux isolats (**Tableau 7**). Pour cela, ont été recherchées les régions d'une taille supérieure à 1 000 bp et d'une identité nucléotidique supérieure à 98% entre deux isolats de l'environnement fromager (qui ont en moyenne une identité nucléotidique de 80% sur l'ensemble du génome) et qui sont par ailleurs absentes des espèces proches phylogénétiquement mais non associées au fromage. En effet, ces régions peuvent avoir été acquises récemment par transfert horizontal et peuvent jouer un rôle dans l'adaptation de ces espèces à la matrice fromagère. La présence de séquences nucléiques supérieures à 1 000 bp communes entre certains isolats d'espèces différentes (e.g. *B. penicilloides* et *B. domesticum* -les cinq isolats-) a été mise en évidence mais aussi certaines supérieures à 4 000 bp dont l'identité nucléotidique est supérieure à 98% et absentes d'autres espèces non associées aux fromages et plus proches phylogénétiquement. Ce dernier point a été observé entre les isolats de *B. domesticum* ESE00042 et ESE00064 et *B. allantoides* UBOCC-A-120036 avec une région de ~5 000 bp mais correspondant à une région non codante, et entre les isolats de *L. lagenoides* et *B. domesticum* (4 393 bp) incluant une région non codante ainsi qu'une protéine à la fonction non connue dans la base de données "HMMER". D'autre part, des séquences nucléiques supérieures à 5 000 bp ont été observées entre les isolats *B. allantoides* UBOCC-A-120036 et *B. penicilloides* UBOCC-A-120021 (5 620, 9 722, 10 025 bp) correspondant à des protéines sans liens évidents avec le contexte fromager ainsi que des séquences non codantes. De façon plus intéressante, une région encore plus grande (~ 54 kb) a été mise en évidence et correspondant à la fois à des séquences non codantes et également à dix protéines dont trois non caractérisées, et d'autres identifiées notamment en tant que transporteurs de chromate, phosphate et potassium. Ainsi, cette partie de l'étude, non prévue initialement et qui reste largement à compléter, révèle des pistes très intéressantes à explorer au niveau génomique dans le but notamment de mettre en évidence des gènes spécifiques qui pourraient être impliqués dans l'adaptation à l'environnement fromager de ces espèces.

Tableau 4. Liste et informations des génomes de *Nectriaceae* utilisés dans cette étude. Certains génomes étaient fragmentés tels que *17 736 contigs < 500 bp, **2 666 contigs < 500 bp, ***50% des contigs < 500 bp. Les souches dont le séquençage du génome a été effectué dans le cadre de cette étude sont mises en évidence en gras.

Species	Isolate	Origin	GenBank Accession	Genome/assembly id	Sequencing technology	Size (Mb)	Contigs numbers
<i>Albonectria rigidiuscula</i>	NRRL 13412	Coffee	JAAGWO000000000	GCA_013266205.1	Illumina MiSeq	53,69	3482
<i>Bisfusarium allantoides</i>	UBOCC-A-120036	Soft cheese type	-	-	Illumina NovaSeq	31,64	2297
<i>B. dimerum</i>	NRRL 20691	Soap	JABGLY000000000	GCA_013623525.1	Illumina MiSeq	37,61	2223
<i>B. domesticum</i>	NRRL 29976	Swiss Raclette cheese	JABFEV000000000	GCA_013618395.1	Illumina MiSeq	32,58	3048
	ESE00042	Cheese (Eguia)	à déposer	-	Illumina NovaSeq	34,56	3038
	ESE00064	Cheese (Bethmale, tomme pyrénées)	à déposer	-	Illumina NovaSeq	34,63	3466
	LMA587	Cheese	à déposer	-	Illumina NovaSeq	33,79	2559
	UBOCC-A-120004	Commercial adjunct culture	à déposer	-	Illumina NovaSeq	34,08	5228
<i>B. penicilloides</i>	UBOCC-A-120021	Cheese (Mont d'Or)	à déposer	-	Illumina NovaSeq	32,10	2276
<i>B. penzigii</i>	NRRL 20711	Human eye infection	JABFFC000000000	GCA_013623535.1	Illumina MiSeq	36,31	1247
<i>Cyanonectria buxi</i>	NRRL 36148	Buxus	JAAVUK000000000	GCA_014899095.1	Illumina MiSeq	35,24	1868
<i>C. cyanostoma</i>	NRRL 53998	-	JABCKW000000000	GCA_014824385.1	Illumina MiSeq	38,35	2002
<i>Fusarium babinda</i>	NRRL 25539	Soil	JABCKA000000000	JABCKA01.1	Illumina MiSeq	42,85	2053
<i>F. babinda</i>	NRRL 25533	Insect (<i>Lymantria dispar</i>)	JAALXL000000000	JAALXL01.1	Illumina MiSeq	43,78	1090
<i>F. circinatum</i>	NRRL 25331	Plant (<i>Pinus radiata</i>)	JAAQPE000000000	JAAQPE01.1	Illumina MiSeq	43,60	387
<i>F. culmorum</i>	[9F]	Cheese (Reblochon)	à déposer	-	Illumina NovaSeq	37,50	458
<i>F. graminearum</i>	NRRL 31084	-	GCA_900044135.1	GCA_900044135.1	-	38,05	6
<i>F. graminearum</i>	CBS 104.09	-	JADPMY000000000	JADPMY01.1	Illumina HiSeq	36,49	20
<i>F. oxysporum</i>	NRRL 32931	-	AFML000000000*	AFML01.1	Illumina	47,21	545
<i>F. sambucinum</i>	NRRL 13708	<i>Solanum tuberosum</i>	JAAVUG000000000	JAAVUG01.1	Illumina MiSeq	37,50	515
<i>F. solani s.l.</i>	ESE00026	Cheese (La Toudeille)	à déposer	-	Illumina NovaSeq	51,35	8411
<i>F. venenatum</i>	NRRL 66329	Wheat haulm	JABFFH000000000	JABFFH01.1	Illumina MiSeq	37,96	616
<i>F. verrucosum/concolor</i>	NRRL 13459	Plant debris in soim	JABCJY000000000	GCA_013184415.1	Illumina MiSeq	49,60	3171
<i>F. verrucosum</i>	NRRL 22566	Bamboo culm	JABFFJ000000000	GCA_013623715.1	Illumina MiSeq	34,17	767
<i>Longinectria lagenoides</i>	ESE00140	Cheese (Tilsit)	à déposer	-	Illumina NovaSeq	62,86	21476*
	UBOCC-A-120039	Cheese (Vacherin Fribourgeois)	à déposer	-	Illumina NovaSeq	62,37	16077**
<i>L. verticilliforme</i>	UBOCC-A-120043	Cheese (Alpeggio)	à déposer	-	Illumina NovaSeq	48,89	5614
<i>Neocosmospora ambrosia</i>	NRRL 62606	Boxelder tree with <i>Euwallacea interjectus</i>	NKCL000000000	GCA_003947005.1	Illumina MiSeq	47,43	1719
<i>N. ambrosia</i>	NRRL 20438	<i>Xyleborus fornicatus</i>	NIZV000000000	GCA_003947045.1	Illumina MiSeq	49,04	1366
<i>N. pisi</i>	NRRL 45880	-	ACJF000000000	GCA_000151355.1	Sanger	51,29	209
<i>N. illudens</i>	NRRL 22090	Beilschmiedia tawa	JABFEX000000000	GCA_013623515.1	Illumina MiSeq	40,32	3457
<i>N. phaseoli/haematococca</i>	NRRL 22396	-	JABEEL000000000	JABEEL01.1	Illumina MiSeq	46,09	1483
<i>N. phaseoli</i>	NRRL 31156	Soil	MAEB000000000.1	MAEB01.1	Illumina HiSeq	50,53	16072***
<i>N. solani</i>	LQ1	Pea	WXYL000000000	WXYL01.1	Illumina PE150	51,88	1305
	S2_018_00R2	hospital sink	SCGO000000000	SCGO01.1	Illumina HiSeq	44,93	2622
<i>N. vasinfecta</i>	NRRL 22166	soil (<i>Heterodera glycines</i>)	SSHRO000000000	GCA_006518225.1	Illumina MiSeq	54,04	5494
<i>Rectifusarium robinianum</i>	NRRL 25729	tree (<i>Robinia pseudoacacia</i>)	JABFFI000000000	GCA_013623725.1	Illumina MiSeq	36,53	1717
<i>X. recifei</i>	IHEM 4405	mycetoma	WOFQ000000000.1	WOFQ01.1	Illumina HiSeq	41,61	583
<i>Luteonectria albida</i>	NRRL 22152	woody stem bark	JABFEP000000000	GCA_013618265.1	Illumina MiSeq	36,88	5413
<i>L. nematophila</i>	NRRL 54600	-	JABFFA000000000	GCA_013623595.1	Illumina MiSeq	52,52	5027

Tableau 5. Mise en évidence de gènes spécifiques des *Nectriaceae* associés au fromages. Parmi les gènes spécifiques identifiés, certains exemples de fonctions putatives sont inscrits, selon HMMER.

Species	Isolates	nombre de gènes spécifiques	Exemples de fonctions putatives de certains gènes associés à ces régions
<i>B. allantoides</i>	UBOCC-A-120036	650	Amino acid permease, Phosphoinositide phospholipase, Methyltransferase, Ferulic acid decarboxylase, Beta-glucosidase, Amine oxidase, Major facilitator superfamily transporter
<i>B. domesticum</i>	ESE00042	73	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase, Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, Carboxypeptidase, Acetyl-CoA hydrolase
<i>B. domesticum</i>	ESE00064	120	Peptidase, Cu ²⁺ -exporting ATPase, Amino acid transporter, Succinate dehydrogenase, Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
<i>B. domesticum</i>	LMA 587	43	Aspartokinase, Flavin-containing monooxygenase, Glutamine-rich protein 2
<i>B. domesticum</i>	NRRL 29976	167	Beta-galactosidase, Acid phosphatase, Beta-glucuronidase, Tyrosinase, Amine oxidase
<i>B. domesticum</i>	UBOCC-A-120004	177	Sodium transport ATPase, Proline dehydrogenase, Glucanase, Magnesium transport protein CorA, Beta-glucosidase, Glycosyl group 1 family protein
<i>B. penicilloides</i>	UBOCC-A-120021	750	Alcohol dehydrogenase, D-3-phosphoglycerate dehydrogenase, Amino acid adenylation, Phospholipid-transporting ATPase, Fatty acid hydroxylase, Sugar transporter, Aldehyde dehydrogenase, Peptidase, Calcium-transporting ATPase
<i>L. lagenoides</i>	ESE00140	328	Alcohol dehydrogenase, Alpha/beta-hydrolase, Ammonium transporter, MFS domain-containing protein, Beta-glucosidase, Methyltransferase
<i>L. lagenoides</i>	UBOCC-A-120039	404	Aldehyde dehydrogenase, amino acid transport system protein, Tyrosinase, Calcium-transporting ATPase, Peroxidase, Calcium-transporting ATPase, Beta-galactosidase, Phosphoinositide phospholipase, Cytochrome P450 oxidoreductase
<i>L. verticilliforme</i>	UBOCC-A-120043	916	Peptidase, Amidase, Fatty acid-binding protein, Glycoside hydrolase, Tryptophan synthase, Trehalase, Lactose permease, Fatty acid hydroxylase, Tyrosine-protein kinase, Geranylgeranyl pyrophosphate synthetase, Calcium-independent phospholipase

Tableau 6. Mise en évidence de protéines uniquement présentes entre certaines souches isolées de fromage.

Isolates	Nombre de séquences orthologues	Exemples de fonctions putatives de certains gènes associés à ces régions
<i>B. domesticum</i> ESE00042, ESE00064, LMA587, NRRL 29976, UBOCC-A-120004	213	Carboxylic ester hydrolase, Catalase-peroxidase, Glycos_transf_1 domain-containing protein, Glyco_hydro_114 domain-containing protein, MFS domain-containing protein, Sodium transport ATPase, Siderophore iron transporter Stress protein-like protein, Sugar transporter, Sugar transporter stl1
<i>L. lagenoides</i> ESE00140 et UBOCC-A-120039	1543	Amino acid permease, Maltose permease, Sugar porter, Sulfatase domain, Alcohol oxidase, HEME_HALOPEROXIDASE domain, High-affinity glucose transporter, Vanillin dehydrogenase, Siderochrome-iron transporter, Ca ²⁺ regulator and membrane fusion, Amino acid permease, Stress response regulator, Sugar transporter
<i>B. allantoides</i> UBOCC-A-120036 et <i>B. penicilloides</i> UBOCC-A-120021	67	Phospholipase, NAD(P)-binding protein, Zn(2)-C6 fungal-type domain-containing protein, WD_REPEATS_REGION domain-containing protein
<i>L. lagenoides</i> ESE00140 et UBOCC-A-120039 et <i>L. verticilliforme</i> UBOCC-A-120043	76	Amino acid adenylation domain, D-amino-acid oxidase, Glucose transporter rco-like protein, Glycoside hydrolase, Haloacid dehalogenase, Ricin B-type lectin domain, MFS general substrate transporter
<i>B. domesticum</i> (n=5), <i>B. allantoides</i>, <i>B. penicilloides</i>, <i>B. dimerum</i>, <i>B. penzigii</i>	41	Amino acid permease, Glutamine amidotransferase, Sulfatase domain, Nicotinamide-nucleotide adenylyltransferase

Tableau 7. Matrice représentant l'identité nucléotidique moyenne entre deux espèces de *Nectriaceae* associées au fromage.

Species	Isolates	<i>B. allantoides</i>	<i>B. domesticum</i>				<i>B. penicilloides</i>		<i>L. lagenoides</i>	
		UBOCC-A-120036	ESE00042	ESE00064	LMA 587	NRRL 29976	UBOCC-A-120004	UBOCC-A-120021	UBOCC-A-120039	ESE00140
<i>B. domesticum</i>	ESE00042	78,6								
	ESE00064	78,6	93,5							
	LMA 587	78,7	93,6	93,9						
	NRRL 29976	78,6	98,9	98,4	98,9					
	UBOCC-A-120004	78,5	95,8	96,9	96,1	99,1				
<i>B. penicilloides</i>	UBOCC-A-120021	79,8	78,7	78,7	78,6	78,7	78,7			
<i>L. lagenoides</i>	UBOCC-A-120039	75,8	75,9	75,9	76,2	75,7	76,2	75,4		
	ESE00140	75,5	75,9	75,9	76,1	76,3	76,0	75,4	88,5	
<i>L. verticilliforme</i>	UBOCC-A-120043	75,2	75,3	75,3	75,3	75,2	75,2	74,8	79,0	79,0

Les valeurs indiquées correspondent aux pourcentages d'identité nucléotidique obtenus entre deux génomes par une analyse "blastn" sur la totalité dudit génome. Les cases grisées représentent l'absence de régions communes (>98 % d'identité) qui soient supérieures à 1 000 bp tandis que les trois dégradés de bleu indiquent du plus clair au foncé, la présence de régions > 1 000 bp, > 4 000 bp et > 5 000 bp, respectivement.

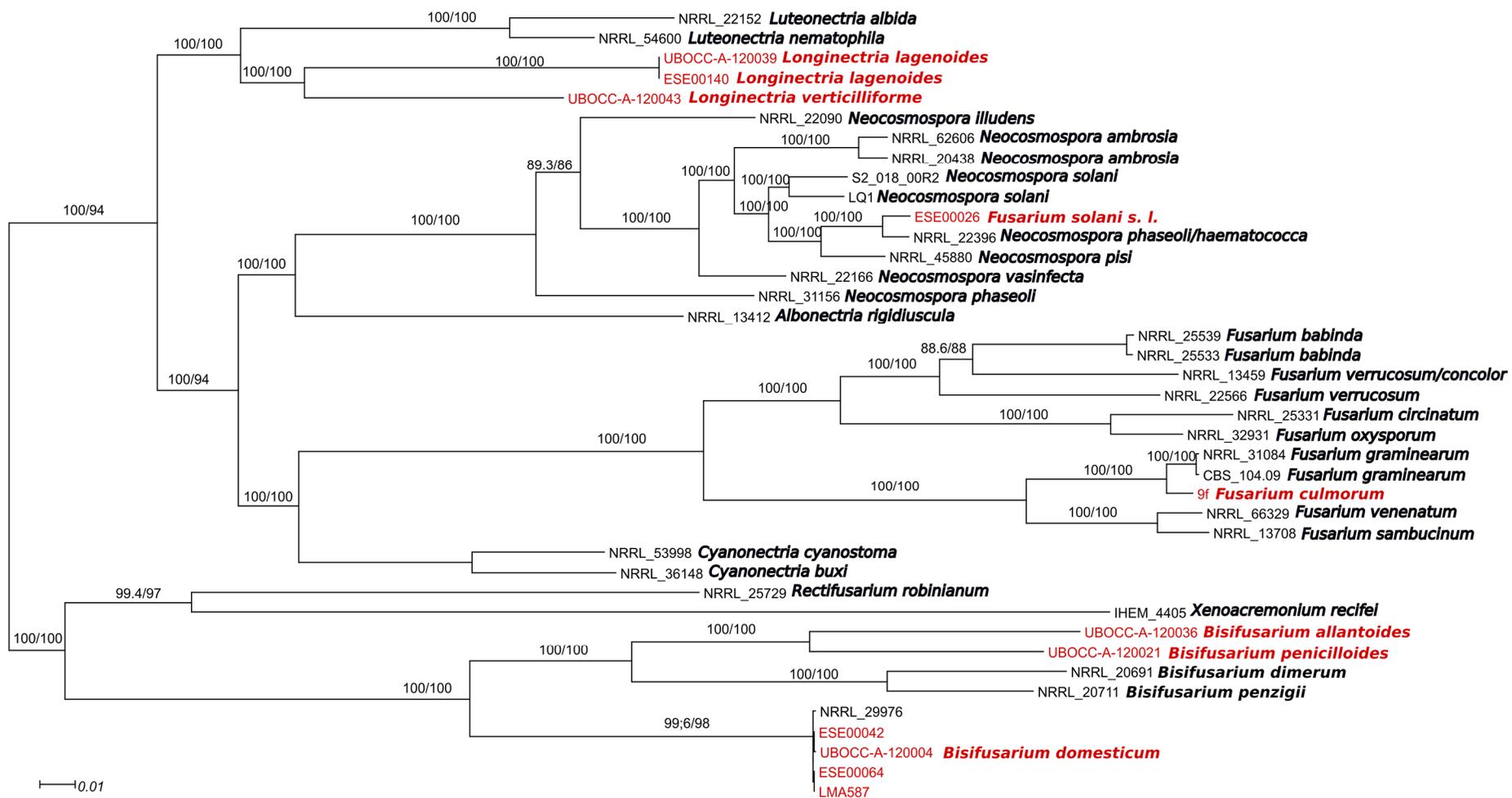


Figure 18 : Arbre phylogénétique (analyse par maximum de vraisemblance) des espèces de *Nectriaceae* basé sur 2724 groupes de gènes orthologues simple copie et 40 génomes

Les valeurs de bootstraps et d'aLRT sont représentées à chaque nœuds (respectivement à gauche et à droite). Les souches dont les génomes ont été séquencés dans le cadre de cette étude sont en rouge.

IV. Diversité intraspécifique de *B. domesticum*

IV.1. Contexte et approche expérimentale

Afin d'évaluer la diversité génétique au sein de l'espèce *B. domesticum*, plusieurs approches ont été envisagées telles que l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD), l'étude de régions microsatellites ou encore l'analyse de SNPs détectés sur l'ensemble des génomes de *B. domesticum* étudiés. Au début de cette thèse, trois génomes de *B. domesticum* (obtenus à partir d'isolats de fromages) ont été séquencés par l'équipe de recherche du laboratoire ESE. Cependant, une étude préliminaire comparative sur la base des SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) n'a montré que peu de variations (~ 100 SNPs sur 34 Mb). Ceci pouvait s'expliquer *i)* par l'existence d'une très faible diversité au sein de cette espèce, en ce cas, potentiellement d'origine clonale ou *ii)* par le fait que les trois isolats testés correspondaient en réalité à la même souche liée à l'utilisation du même ferment commercial pour ces trois fromages.

Afin de mettre en évidence ou réfuter l'existence d'une diversité intraspécifique au sein de la collection constituée de 25 isolats de *B. domesticum*, des profils génétiques ont été générés par RAPD. Pour cela, neuf amorces ont été testées avec une optimisation du programme d'amplification afin d'obtenir des profils distincts. Une seule amorce a présenté une capacité discriminante suffisante (ari1 ; 5'CTGCTTGGCACAGTTGGCTTC3' ; Geisen et al., 2001) (**Figure 19**). La préparation du mélange réactionnel et le programme d'amplification sont présentés dans la publication n°2 du chapitre suivant et sont rappelés ci-après (**partie IV.3**).

Sur la base des résultats RAPD, un isolat de *B. domesticum*, montrant un profil clairement différent de ceux dont les génomes avaient déjà été séquencés, a été sélectionné dans le cadre de la série de séquençage précédemment évoquée et une nouvelle analyse des SNPs a pu être réalisée.

IV.2. Résultats

Sur la base des résultats RAPD avec l'amorce ari1, il a tout d'abord été observé que deux des trois isolats dont les génomes ont été séquencés en amont, présentaient effectivement le même profil (le 3^{ème} isolat n'a pas pu être testé car non accessible) ce qui renforce que l'hypothèse du séquençage d'une même souche est plausible. D'autre part, cinq isolats semblent présenter des profils distincts ce qui laisse supposer qu'il existerait bien une diversité au sein de l'espèce, même si elle serait faible. De plus, malgré une standardisation, en amont, de la concentration des extraits d'ADN, afin d'éviter tout artefact possible, la distinction de ces profils a également été assurée par des RAPD supplémentaires

en réalisant, au préalable, des dilutions des ADN à 20 et 8 ng/μL. Ces cinq isolats (**Figure 20**), qui sont par ailleurs représentés par les trois ferments industriels, la souche néotype et un isolat issu de fromage ont ensuite été utilisés pour toutes les études intraspécifiques de cette thèse. D'autre part, cette RAPD a permis de sélectionner le profil le plus différent de ceux des isolats dont le génome avait été séquencé afin d'effectuer le séquençage d'un quatrième génome de *B. domesticum* (isolat UBOCC-A-120004). Enfin, l'analyse des SNPs réalisée sur ces quatre génomes séquencés dans les mêmes conditions, a permis de révéler la présence de 8 386 bp SNPs sur les 34 MB de génomes analysés entre UBOCC-A-120004 et les autres isolats. Cette dernière observation conforte ainsi le fait que même si celle-ci est très faible, il existe bien une diversité génétique au sein de l'espèce *B. domesticum* avec l'existence d'*a minima* deux profils génétiques.

IV.3. Annexe. Procédure RAPD – ari1

Préparation du mix :

		Volumes/réaction (μL)	Concentration /réaction
Eau	-	8,0	-
Tampon	5 (X)	5,0	1 X
MgCl₂	25 (mM)	1,5	1,5 mM
Primer 1	10 μM	8,75	3,5 μM
dNTP	10 mM	0,5	0,2 mM
Taq	5 U/μL	0,250	0,05 U/μL
ADN	40 ng/μL	1	1,6 ng/μL

Conditions d'amplifications :

Cycle	T°C	Temps
1	94	3 min
30	94	30 sec
	48	30 sec
	72	2 min
1	72	10 min

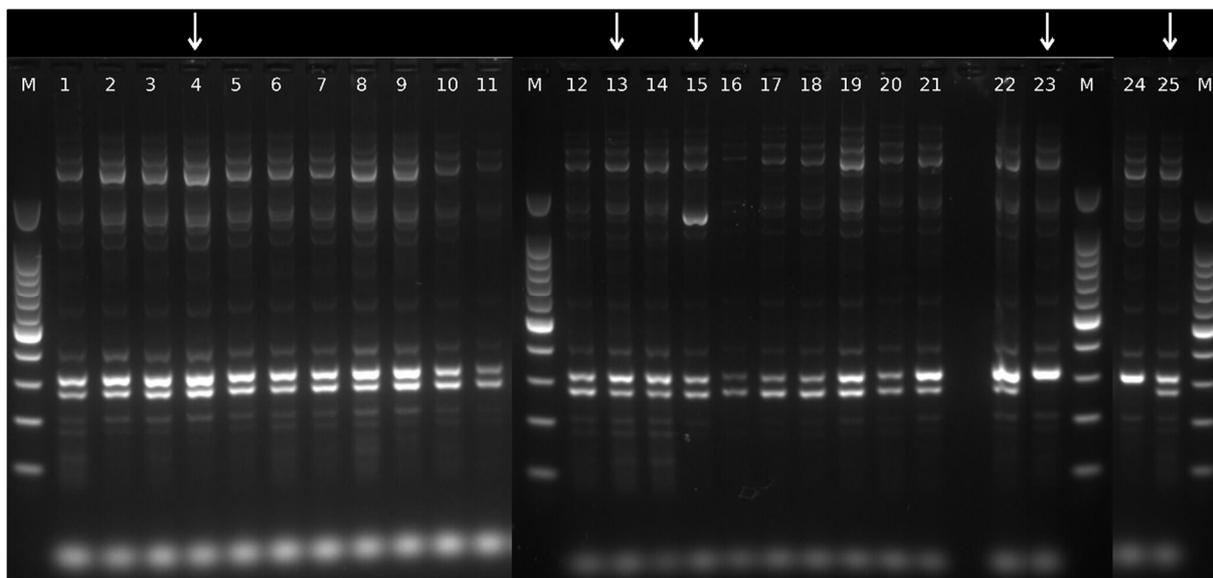


Figure 19 : Profils obtenus par RAPD avec l'amorce ari1 sur les isolats de *B. domesticum* sur gel d'électrophorèse (2 % agarose, migration à 90 V pendant 2h).

Les colonnes 1 à 25 correspondent aux isolats respectivement : 1: UBOCC-A-117075, 2: UBOCC-A-109095, 3: MNHN RF-03342, 4: MNHN RF-05627, 5: MNHN RF-05628, 6: MUCL 38934, 7: MUCL 39198, 8: MUCL 38933, 9: UBOCC-A-120005, 10: UBOCC-A-120006, 11: UBOCC-A-120007, 12: NRRL 37582, 13: UBOCC-A-120002, 14: UBOCC-A-120008, 15: UBOCC-A-120003, 16: UBOCC-A-120009, 17: UBOCC-A-120010, 18: UBOCC-A-120011, 19: UBOCC-A-120012, 20: UBOCC-A-120013, 21: ESE-00042, 22: ESE-00064, 23: UBOCC-A-120004, 24: UBOCC-A-113010, 25: UBOCC-A-120001. La colonne M correspond au marqueur de taille (100 bp ladder, Promega). Les isolats mis en évidence par une flèche ont été sélectionnés pour les études intraspécifiques de cette thèse.

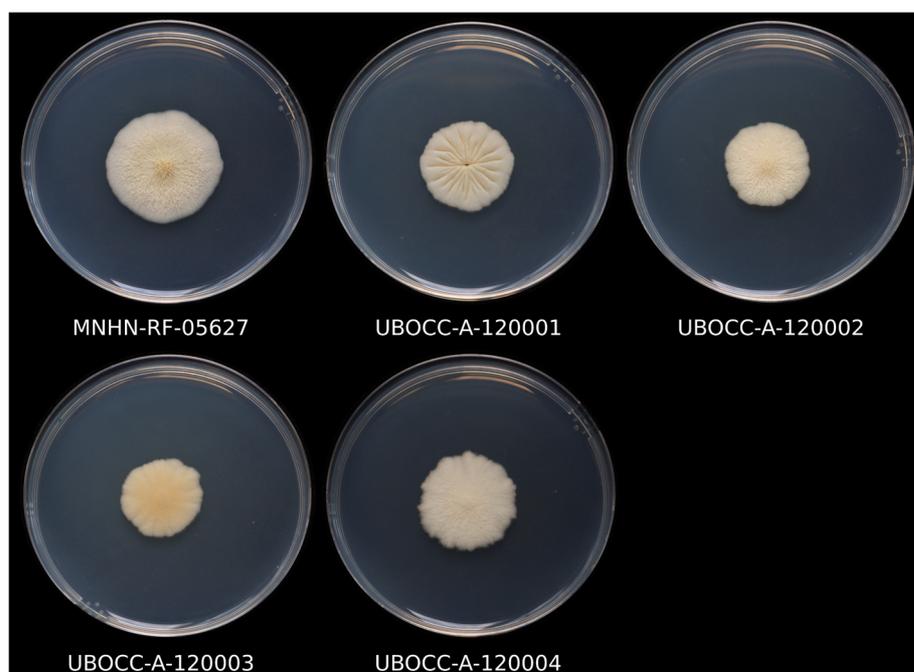


Figure 20 : Observations macroscopiques des cinq isolats de *B. domesticum* retenus pour les études intraspécifiques. Les cultures ont été effectuées sur PDA (inoculum 5 μ L à 10⁶ spores/mL) et incubées pendant quatorze jours à 25°C.

V. Résultats majeurs du chapitre I

Sur ce premier chapitre, on peut résumer les résultats majeurs comme suit :

- **Identification et description de quatre nouvelles espèces fongiques**, dont deux appartenant à un nouveau genre, nommées *Bisifusarium allantoides*, *B. penicilloides*, *Longinectria lagenoides* et *L. verticilliforme*, témoignant d'une **diversité inattendue** des *Nectriaceae* associées au fromages
- **Phylogénie des *Bisifusarium spp.* et *Longinectria spp.*** au sein des clades IX–XII de la famille *Nectriaceae* **confirmée par l'analyse phylogénomique des orthogroupes**
- **Suggestion d'innocuité des nouvelles espèces** avec aucune production de mycotoxines connues observée
- **Obtention de neuf génomes complets** de cinq espèces de *Nectriaceae* **associées au fromages** constituant un **réservoir d'études complémentaires** et indiquant déjà la présence de gènes qui pourraient être impliqués dans l'**adaptation** de *B. domesticum* à l'environnement fromager
- En termes de diversité intraspécifique, **peu de diversité génétique** au sein de la collection de *B. domesticum* (analyses RAPD et SNPs) mais a minima deux profils génétiques confirmés par analyse SNPs (8 386 nucléotides sur 34 MB)

Chapitre II : Etude physiologique

I. Introduction et stratégie expérimentale

Au sein de la famille *Nectriaceae*, seule *B. domesticum* et, potentiellement, les espèces nouvellement décrites, *B. allantoides*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* et *L. verticilliforme* sont associées à la matrice fromagère. A l'inverse, les autres espèces du genre *Bisifusarium*, ou plus largement des *Nectriaceae*, sont associées à divers environnements naturels (sol, bois en décomposition, plantes) et certains seraient phytopathogènes et/ou pathogènes opportunistes chez l'Homme. C'est pourquoi l'existence d'habitats spécifiques soulève des questions en termes d'adaptation. Dans ce contexte, il peut être rappelé que les espèces *P. camemberti* et *P. roqueforti* ont subi une domestication (adaptation sous pression humaine) et sont apparues lors de processus de divergences adaptatives (Dumas et al., 2020; Ropars et al., 2020). Les génomes des espèces domestiquées portent des traces d'une sélection accélérée et dirigée par l'homme : sélection positive accrue de certains gènes impliqués dans la production et relâchement de celle-ci sur d'autres parties des génomes, des expansions de familles de gènes améliorant la tolérance à des stress associés aux process, ou l'exploitation de substrats reliés aux produits alimentaires, mais aussi une présence de larges régions transférées horizontalement et favorables dans le contexte alimentaire etc. Même lorsque la domestication n'est pas avérée comme chez *Mucor fuscus* et *M. lanceolatus* qui sont naturellement présents dans les fromagères, les génomes de ces espèces diffèrent de ceux d'espèces non associées à la production agroalimentaire avec par exemple un répertoire de CAZYmes ("Carbohydrate-active enzyme") appauvri et certainement plus spécialisé (Lebreton et al., 2020). Ces empreintes de domestication ou *a minima* d'adaptation évolutive sont ainsi le résultat d'évènements génomiques individuels (mutations ponctuelles, duplication, transferts de gènes horizontaux, etc.) résultant en une valeur sélective supérieure dans le contexte de production des produits alimentaires. Grâce aux avantages compétitifs et sélectifs associés à ces évènements, la "fixation" de ces empreintes au sein de la population résulte *in fine* à une "fitness de population" augmentée dans les conditions de production alimentaire. Cette population peut être alors considérée comme adaptée, et cette adaptation peut se mesurer en termes de métabolisme ou de physiologie. C'est le cas de *P. camemberti* et *P. roqueforti* ou même de *M. lanceolatus* et *M. fuscus* dans les fromages. Ropars et al. (2020) ont montré une colonisation plus rapide des fromages à pâte molle de *P. camemberti* par rapport à *P. fuscoglaucom* dont il diverge, Morin-Sardin et al. (2016) ont observé une meilleure croissance sur Tomme de la part de *M. fuscus* et *M. lanceolatus* par rapport aux autres espèces de *Mucor*.

Ainsi, on peut effectivement s'interroger si *B. domesticum* et les quatre nouvelles espèces ont un développement optimal sur fromage ou si elles possèdent, dans cette condition, un avantage physiologique par rapport notamment aux *Bisifusarium* spp. non associées au fromage. Ainsi, le présent chapitre vise à répondre à la question suivante : **Existe-t-il une adaptation de *B. domesticum*, et *B. allantoides*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* et *L. verticilliforme*, aux matrices fromagères ?** Cet aspect a par ailleurs été brièvement évoqué dans l'étude précédente dans laquelle certains gènes mis en évidence au sein des génomes de ces espèces pourraient être impliqués dans l'adaptation à cet habitat. Afin d'évaluer cette possible adaptation, nous avons employé une approche physiologique reposant sur deux approches, *i*) une étude physiologique décrivant les effets de différents facteurs abiotiques sur la croissance de ces espèces et *ii*) la croissance sur des "milieux fromagers".

Classiquement, les études de croissance sont effectuées par des suivis de croissances radiales du thalle sur milieu gélosé. Cependant, une méthode "haut-débit" par néphélométrie laser, en microplaque 96 puits, jusqu'alors majoritairement utilisée pour les bactéries, a été décrite par Joubert et al. (2010) comme pouvant être également appliquée aux suivis de croissances fongiques. Cette méthode a l'avantage de permettre des mesures de croissances rapides et à grande échelle avec des suivis de croissances standardisées, un temps de lecture de trois minutes seulement par plaque de 96 puits et des suivis plus courts que ceux effectués en boîtes de Petri (e.g. quatre contre environ vingt jours pour des modélisations de croissance de *B. domesticum* à 25°C). Cette approche de la néphélométrie laser a été utilisée pour évaluer l'impact de trois facteurs abiotiques (température, pH, NaCl) sur les vitesses de croissance fongiques et estimer les valeurs cardinales associées. Puis afin de se rapprocher de la réalité biologique (croissance sur surface solide et milieu fromager), une méthode de mesure de croissance radiale a été employée afin d'évaluer la capacité de croissance sur matrice fromagère via un milieu mimant le fromage « cheese agar » et la Raclette de Savoie (à 15°C et 25°C). Ces études ont été effectuées pour les espèces *Bisifusarium* et *Longinectria* associées au fromage (n=5), comparativement aux espèces *Bisifusarium* "non associées au fromage" (n=6, *B. tonghuanum* n'étant pas accessible) avec un volet inter- et intraspécifique. L'ensemble de cette étude a fait l'objet d'une publication (**publication n°2**) soumise à l'International Journal of Food Microbiology et présentée dans la **partie II.** du présent chapitre et dont les points saillants sont présentés dans la **partie III.** et discutés dans la **discussion générale** de ce manuscrit.

Dans une logique d'optimisation du nombre de mesures pouvant être obtenues en parallèle mais également de vérification de la qualité des données obtenues, une étude préliminaire a été réalisée. Elle visait à montrer, que si classiquement le suivi néphélométrique se fait en continu à une

température déterminée, une approche en discontinu avec incubation des microplaques dans un incubateur externe et des mesures ponctuelles était possible. Pour ce faire, deux plaques identiques ont été suivies (comprenant les souches types de *B. biseptatum*, *B. delphinoides*, *B. dimerum*, *B. domesticum*, *B. lunatum*, *B. nectrioides* et *B. penzigii*), l'une avec une incubation en continu dans l'incubateur du néphélomètre et une mesure toutes les dix minutes tandis que la seconde a été incubée dans un incubateur externe avec une mesure deux fois par jour (discontinu). Une bonne répétabilité a été observée entre les différents réplicats et aucune différence entre les deux modes de lecture/incubation, comme en témoigne la superposition des points "discontinus" sur ceux obtenus en "continu" (**Figure 21**). Ce type d'incubation permet ainsi d'effectuer des suivis de plusieurs microplaques en parallèle et avec une plus large gamme de températures testées, c'est pourquoi nous avons opté pour cette dernière mise en oeuvre, optimisée par un nombre de lecture effectuées trois fois par jours jusqu'à saturation du signal.

D'autre part, une seconde étude préliminaire a permis d'évaluer l'impact de l'agitation, une étape classiquement effectuée avant lecture du néphélomètre, sur les données recueillies. Pour cela, deux plaques jumelles ont également été suivies, l'une avec des mesures précédées d'une agitation et la seconde sans agitation. Les résultats obtenus ont indiqué qu'aucune différence de mesure n'était observée (**Figure 22**). De plus, des observations microscopiques ont révélé que le mycélium des sept espèces testées dans cette étude (*B. biseptatum*, *B. delphinoides*, *B. dimerum*, *B. domesticum*, *B. lunatum*, *B. nectrioides* et *B. penzigii*), qui devient visible après la phase de latence, était très dense et bien attaché au fond du puits. L'agitation permet ainsi une homogénéisation du milieu mais ne fragmente pas le mycélium. De plus, nous avons appliqué ici une agitation plus douce que les conditions utilisées dans l'article de Joubert et al. (2010) (i.e. 500 rpm pendant 20 secondes avant les mesures effectuées trois fois par jour vs. 175 rpm pendant 5 minutes toutes les 10 minutes dans notre étude).

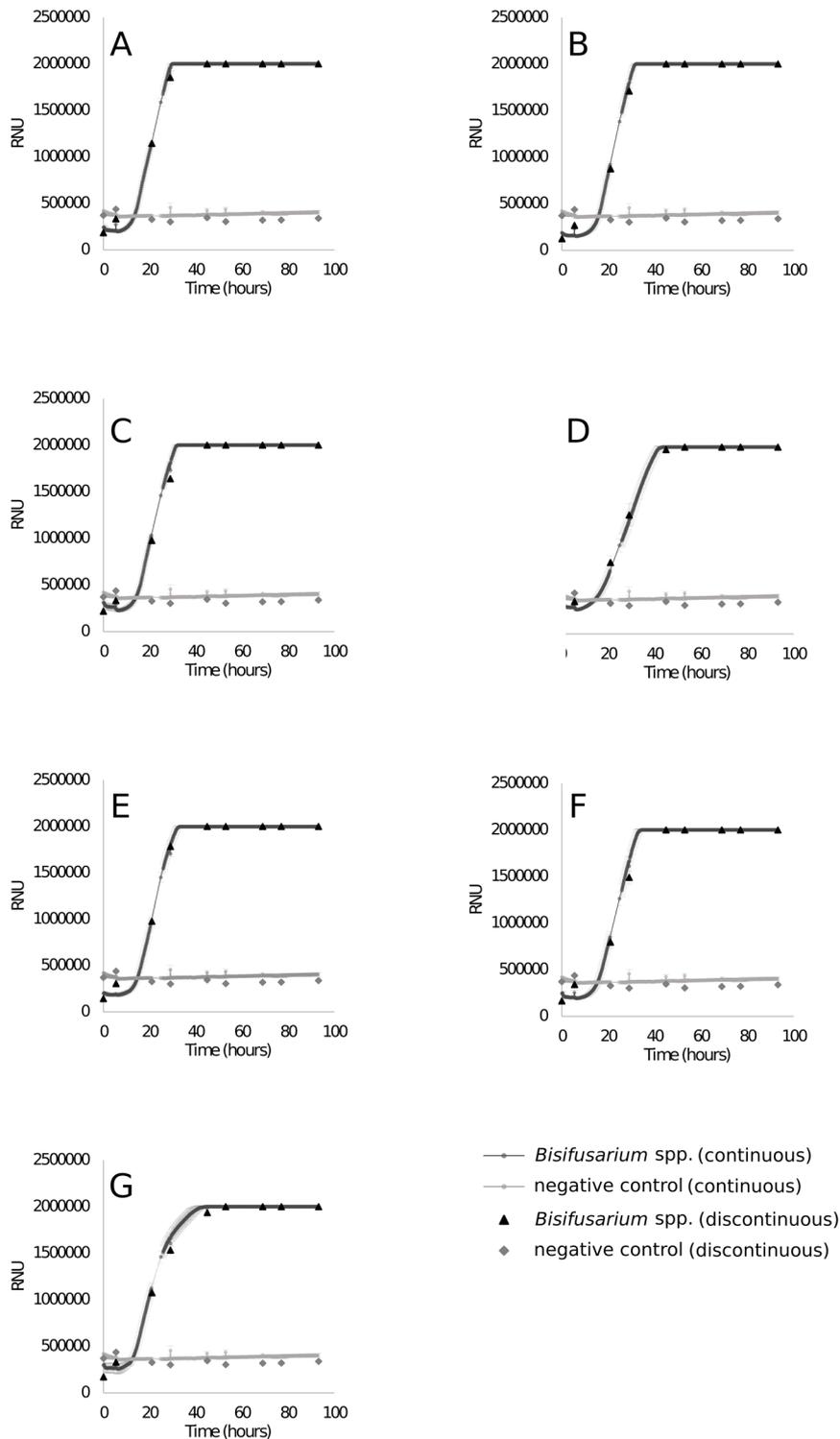


Figure 21 : Comparaison des suivis de croissances de *Bisifusarium* spp., effectués en « continu » et « discontinu ». Les points représentés correspondent à la moyenne des mesures (en une unité arbitraire du néphélomètre laser « Relative Nephelometric Unit », RNU) des cinq réplicats techniques effectuées toutes les dix minutes ou deux fois par jour respectivement pour la condition “continue” (ronds) et « discontinue » (triangle). Chaque graphique correspond à une souche type, à savoir A: *B. biseptatum*, B: *B. delphinoïdes*, C: *B. dimerum*, D: *B. domesticum*, E: *B. lunatum*, F: *B. nectrioides* and G: *B. penzigii*.

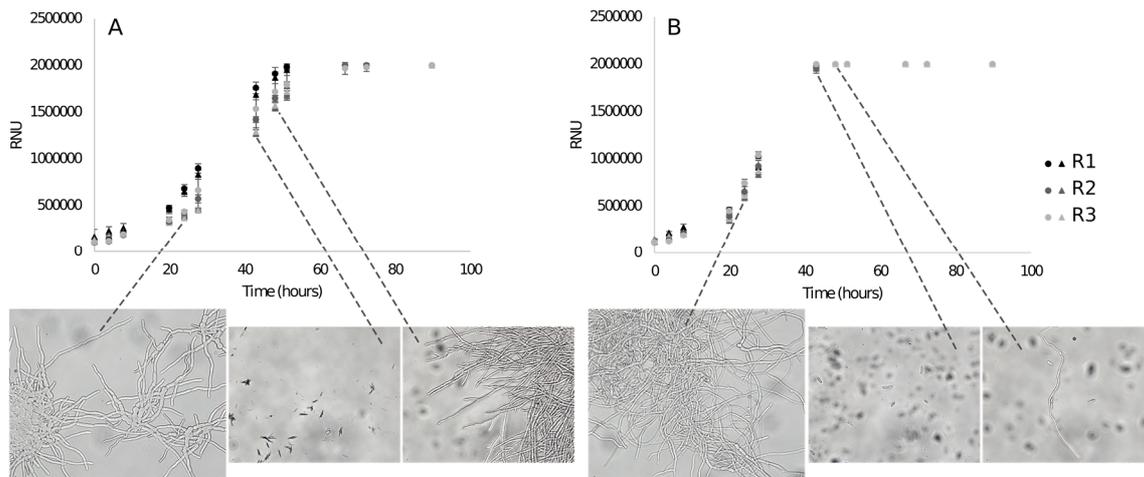


Figure 22 : Exemple de cinétiques de croissances avec et sans agitation de *B. domesticum* (A) et *B. dimerum* (B). Le signal néphélométrique est exprimé en RNU. R1, R2 et R3 représentent la moyenne des mesures de quatre réplicats techniques pour chacun des trois réplicats biologiques. Les mesures obtenues pour la microplaque avec et sans agitation sont respectivement représentées par un rond et un triangle. Les observations microscopiques ont été effectuées à partir de la microplaque sous agitation.

II. Article publié au journal International Journal of Food Microbiology

Savary O., Coton M., Jany J-L., Coroller L., Coton E., 2022. Effect of abiotic factors and culture media on the growth of cheese-associated *Nectriaceae* species. *International Journal of Food Microbiology*. 364, 109509. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109509>

Le journal "*International Journal of Food Microbiology*" a un "impact factor" de 5,277.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicroEffect of abiotic factors and culture media on the growth of cheese-associated *Nectriaceae* species

Océane Savary, Monika Coton, Jean-Luc Jany, Louis Coroller, Emmanuel Coton*

Univ Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne, F-29280 Plouzané, France

ARTICLE INFO

Keywords:

*Bisfusarium**Longinetria*

Modeling

Predictive mycology

Cardinal values

Laser nephelometry

ABSTRACT

Nectriaceae species have been described in various natural environments or as plant or human pathogens. Within this family, the *Bisfusarium domesticum* species is of particular interest for food mycologists as it is used for technological functions in various cheese productions. Moreover, it has only been isolated from the cheese environment so far and, until recently, was the only *Nectriaceae* species described in this food product. Recently, four novel cheese-associated *Nectriaceae* species have been described, including two associated to the *Bisfusarium* genus and two to a new genus, *Longinetria* gen. nov.. These observations raise questions concerning the potential adaptation of these species to the cheese environment. In this context, this study first focused on determining the impact of abiotic factors on the growth of isolates belonging to the five cheese-associated species (i.e. *B. allantoides* sp. nov., *B. domesticum*, *B. penicilloides* sp. nov., *L. lagenoides* gen. nov. sp. nov. and *L. verticilliforme* gen. nov. sp. nov.) but also included phylogenetically close species. To do so, fungal growth kinetics in liquid medium (Potato Dextrose Broth) were determined by laser nephelometry at different temperatures, pH and water activities using NaCl as a depressor. Growth modeling was then performed to estimate cardinal values for each abiotic factor. Secondly, fungal growth was also evaluated on Potato Dextrose Agar (synthetic medium), cheese agar (cheese-mimicking medium) and Raclette de Savoie cheese (actual cheese). Our results clearly highlighted physiological differences in growth characteristics between the studied cheese-associated *Nectriaceae* spp. and the “non-cheese” species which could suggest, for the former, an adaptation to this food matrix. Indeed, regarding the impact of the tested abiotic factors, statistical analyses confirmed this dichotomy, with for example the lowest optimal temperatures estimated for the cheese-associated species (T_{opt} 19.1–23.1 °C) while the other *Bisfusarium* species exhibited the highest optimal temperatures (T_{opt} 26.1–36.2 °C). As for the impact of growth media, radial growth measurements highlighted that *B. domesticum* was the least affected species for growth on Raclette de Savoie and even grew faster on cheese agar than on synthetic medium confirming its strong adaptation to the cheese environment.

1. Introduction

The *Nectriaceae* family encompasses a vast number of species including numerous important plant and human pathogens but also technologically relevant species. Among the latter, *Bisfusarium domesticum* is used by cheesemakers as an adjunct culture during semi-soft, washed rind cheese productions (e.g. Saint-Nectaire, Reblochon) (Ropars et al., 2012) as well as for its ability to prevent surface stickiness (hence its “*Anticollanti*” denomination) of some smear-ripened cheeses (e.g. Raclette, Gruyère, Appenzeller) (Bachmann et al., 2003, 2005). Noteworthy, the mechanisms associated with this “*Anticollanti*” property are still unknown and some questions remain unanswered regarding this

species tolerance to washed rind cheese conditions (cheese rind regularly washed with brine during ripening, ripening cellar temperature ~ 8–15 °C) that are usually unsuitable for filamentous fungal growth.

In 2015, Lombard et al., introduced a new nomenclature for the *Nectriaceae* family, resulting in the inclusion of six new genera based on morphological observations and a ten-gene phylogeny. For example, this led to the reclassification of the *Fusarium dimerum* species complex into the *Bisfusarium* genus. Since then, the nomenclature of the *Nectriaceae* family, and more particularly of the *Fusarium* genus, has been highly debated (Geiser et al., 2021; O'Donnell et al., 2020 vs. Crous et al., 2021; Lombard et al., 2015). Regardless of the nomenclature debate, the *Bisfusarium* genus (i.e. *Fusarium dimerum* species complex sensu Geiser

* Corresponding author.

E-mail address: emmanuel.coton@univ-brest.fr (E. Coton).<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109509>

Received 9 July 2021; Received in revised form 2 December 2021; Accepted 19 December 2021

Available online 27 December 2021

0168-1605/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

et al., 2021) includes to date eight species (Lombard et al., 2015; Schroers et al., 2009; Sun et al., 2017). They correspond to *B. biseptatum* (Schroers, Summerbell & O'Donnell) L. Lombard & Crous, 2015, *B. delphinoides* (Schroers, Summerbell, O'Donnell & Lampr.) L. Lombard & Crous, 2015, *B. dimerum* (Penz.) L. Lombard & Crous, 2015, *B. domesticum* (Fr.) L. Lombard & Crous, 2015, *B. lunatum* (Ellis & Everh.) L. Lombard & Crous 2015, *B. nectrioides* (Wollenw.) L. Lombard & Crous, 2015, *B. penzigii* (Schroers, Summerbell & O'Donnell) L. Lombard & Crous, 2015 (Lombard et al., 2015) and *B. tonghuanum* (Sun et al., 2017). The latter was described as a new member of the genus *Bisifusarium* based on its phylogenetic positioning using four target sequences (ITS, LSU, *tef1* and *tub2*) and thus using Lombard et al. (2015) nomenclature (Sun et al., 2017). More recently, based on a ten-gene phylogeny, two novel *Bisifusarium* spp. associated with cheese were also described (Savary et al., 2021), namely *B. allantoides* (O. Savary, M. Coton, E. Coton and J-L. Jany) and *B. penicilloides* (O. Savary, M. Coton, E. Coton and J-L. Jany). Therefore, this genus now gathers ten species which are cosmopolitan saprotrophs as the different species have been observed in various habitats with highly contrasted intrinsic and extrinsic characteristics (soil, plants, human samples and cheese), some having been described as plant and/or human pathogens (Lombard et al., 2015; Schroers et al., 2009; Sun et al., 2017). More precisely, *B. biseptatum*, *B. nectrioides* and *B. penzigii* have been found to be associated with natural environments (soil) (Schroers et al., 2009) while *B. tonghuanum* was isolated from *Atriplex centralasiatica* and *Suaeda salsa* plants (Sun et al., 2017). As for *B. lunatum*, it has mainly been isolated from *Opuntia* or *Gymnocycium* cacti (Schroers et al., 2009) and is considered to be a plant pathogen (Flores-Flores et al., 2013; Gryzenhout et al., 2017; Mongiardino Koch et al., 2015). *B. delphinoides* is also considered to be a plant pathogen, isolated from stem lesions of *Hoodia gordonii* and found in soil and plant materials (Kulkarni et al., 2011; Schroers et al., 2009). However, *B. penzigii* and *B. lunatum* are also considered as potential human pathogens. They were previously isolated from a corneal ulcer and human sinus, respectively (do Carmo et al., 2016; Schroers et al., 2009). *B. delphinoides* was reported in human eye or skin infections (Collado et al., 2013; Hassan et al., 2016; Park et al., 2019; Salah et al., 2015; Schroers et al., 2009). As for *B. dimerum*, even if it was first isolated from a citron (*Citrus medica* L.) (Schroers et al., 2009), it is considered as a human pathogen causing several human mycoses as keratitis, keratomycosis, onychomycosis and endogenous endophthalmitis (Hassan et al., 2016; Ray et al., 2016; Salah et al., 2015; Schroers et al., 2009; Simon et al., 2018). Finally, as previously mentioned, *B. domesticum* is particularly of interest for food mycologists as this species is used in the dairy industry for cheese production and has, so far, only been found on cheese surfaces (Bachmann et al., 2003, 2005; Lombard et al., 2015; Ropars et al., 2012; Schroers et al., 2009). Until recently, it was the only *Nectriaceae* member clearly associated with the cheese environment. However, as previously stated, we recently isolated several fungal isolates from different cheeses that we proposed as four new *Nectriaceae* species based on the ten-gene phylogeny used by Lombard et al. (2015) and morphological traits (Savary et al., 2021). Beyond the mentioned *B. allantoides* and *B. penicilloides* species, two others were proposed to pertain to a new genus *Longinectria* gen. nov. (*L. lagenoides* O. Savary, M. Coton, E. Coton and J-L. Jany and *L. verticilliforme* O. Savary, M. Coton, E. Coton and J-L. Jany) (Savary et al., 2021).

The existence of cheese-associated *Nectriaceae* and closely related species living in habitats with contrasted environmental conditions raises questions concerning their adaptation to their respective environment.

In the context of this study, we used a two-step approach to evaluate the potential physiological adaptation of the cheese-associated *Nectriaceae* spp. to this matrix by monitoring the impact, firstly, of abiotic factors (using laser nephelometry) and, secondly, of growth media (Potato dextrose agar, cheese agar and Raclette de Savoie) on fungal growth and comparing it to that of closely related species.

2. Materials and methods

2.1. Nectriaceae isolates

Type strains of the cheese-associated *Nectriaceae* species (i.e. *B. allantoides*, *B. domesticum*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* and *L. verticilliforme*) and of the “non-cheese” *Bisifusarium* species (i.e. *B. biseptatum*, *B. delphinoides*, *B. dimerum*, *B. lunatum*, *B. nectrioides* and *B. penzigii*) were used for interspecific comparison. Additionally, supplementary isolates of *B. allantoides* ($n = 2$), *B. domesticum* ($n = 4$) *B. penicilloides* ($n = 2$) and *L. lagenoides* ($n = 3$), as well as *B. dimerum* ($n = 4$, only for laser nephelometry), were analyzed for intraspecific variability evaluation. The different isolates were obtained from various culture collections as listed in Table 1. Monospore cultures were

Table 1
Nectriaceae spp. strains used for the inter- and intra-specific studies.

Species	Strain code	Substrate/Origin
<i>Bisifusarium allantoides</i>	UBOCC-A-120035	Cheese (Manchego, Spain)
	UBOCC-A-120036 ^{HT}	Soft cheese type (France)
	UBOCC-A-120037	Soft cheese type (France)
<i>Bisifusarium biseptatum</i>	CBS 110311 ^T	Soil (South-Africa)
<i>Bisifusarium delphinoides</i>	CBS 120718 ^{HT}	Stem lesions on succulent plant (<i>Hoodia gordonii</i>) (South-Africa)
<i>Bisifusarium dimerum</i>	IHEM-10066	Human aortic valve (Unknown)
<i>Bisifusarium domesticum</i>	IHEM-14513	Human blood (Belgium)
	IHEM-2314	Dwelling environment, bathroom (Belgium)
	MNHN RF-05625 ^{ET}	Blood from patient with acute myeloid leukemia (Netherlands)
	UBOCC-A-110149	Soft drink (France)
	MNHN RF-05627 ^{NT}	Food (Belgium)
<i>Bisifusarium lunatum</i>	UBOCC-A-120001	Commercial adjunct culture (France)
	UBOCC-A-120002	Commercial adjunct culture (France)
	UBOCC-A-120003	Cheese (Raclette d'alpage, Switzerland)
	UBOCC-A-120004	Commercial adjunct culture (France)
<i>Bisifusarium nectrioides</i>	CBS 632.76 ^{NT}	Dark spots on cactus epidermis (<i>Gymnocalcium damii</i>) (Germany)
<i>Bisifusarium penicilloides</i>	CBS 176.31 ^{LT}	Banana plantation humus (Honduras)
<i>Bisifusarium penzigii</i>	UBOCC-A-120021 ^{HT}	Cheese (Mont d'Or, France)
	UBOCC-A-120034	Cheese (Mont d'Or, France)
	VTT-D-041022	Surface of sandstone building, Arbroath Abbey (Scotland)
<i>Longinectria lagenoides</i>	CBS 317.34 ^{HT}	European beech decayed wood (<i>Fagus sylvatica</i>) (England)
	ESE 00140	Cheese (Tilsit, France)
<i>Longinectria verticilliforme</i>	UBOCC-A-120038	Cheese (Raclette d'alpage, Switzerland)
	UBOCC-A-120039 ^{HT}	Cheese (Vacherin Fribourgeois, Switzerland)
	UBOCC-A-120041	Raw cow's milk cheese (Switzerland)
	UBOCC-A-120043 ^{HT}	Cheese (Alpeggio, Italy)

CBS: CBS-KNAW culture collection, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands; IHEM: Institute of Hygiene and Epidemiology Mycology Laboratory, Belgium; MNHN: Muséum National d'Histoire Naturelle, France; UBOCC: Université de Bretagne Occidentale Culture Collection, France.
^T type, ^{HT}holotype, ^{ET}epitype, ^{NT}neotype, ^{LT}lectotype strains.

obtained in all cases prior to experimental use.

2.2. Isolate selection

For intraspecific variability analyses, isolate selection was done either based on isolation origins (*B. allantoides*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* and *B. dimerum*) or based on Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) profiles (*B. domesticum*, Fig. S1). For *B. domesticum* RAPD profiling, 25 isolates (Table S1, identifications first confirmed with alpha elongation factor gene sequencing, data not shown) were subjected to amplification using the ari1 primer (5'CTGCTTGGCA-CAGTTGGCTTC3') (Geisen et al., 2001). The PCR mixture contained molecular biology grade water, PCR buffer (1×), 1.5 mM MgCl₂, 3.5 μM ari1 primer, 0.2 mM dNTPs, 0.05 U/μL GoTaq polymerase (Promega) and 40 ng of DNA. Amplifications were performed using the following program: initial denaturation at 94 °C for three minutes, 30 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 48 °C for 30 s and extension at 72 °C for two minutes with a final extension at 72 °C during ten minutes. Amplicons were analyzed on a 2% (w/v) agarose gel with a migration of ten μL of each PCR-product at 90 V during two hours in 1× Tris-acetate-EDTA buffer (molecular biology grade, Promega).

2.3. Conidia production

For conidia production, each fungal isolate was pre-cultured for ten days at 25 °C on Potato dextrose agar (PDA, Difco, Fisher Scientific) then two mL of Tween 80 (0.015%, v/v) were added on the surface of each culture to collect a conidia suspension. Conidia were counted in Malassez cells and, for each isolate, the suspension concentration was adjusted to 10⁶ conidia/mL in Tween 80.

2.4. Growth media

Potato dextrose broth (PDB, Difco, Fisher Scientific) was used for the nephelometric method with the following conditions. Temperature effect (5–45 °C) was directly evaluated with PDB while for pH, PDB was adjusted with hydrochloric acid or sodium hydroxide to obtain the target pH values in pH 2–14 (± 0.1) range. For water activity (a_w), NaCl (Sigma-Aldrich, Germany) was used with concentrations ranging from 2.9 to 21% (corresponding to theoretical values ±0.05 a_w 0.98–0.83). Except for pH modified media, which were filtered at 0.22 μm, all other preparations were sterilized at 121 °C for 15 min and stored at 4 °C until use.

For radial growth, synthetic PDA medium (pH 5.8 ± 0.0), a cheese-mimicking medium, cheese agar, (pH 4.0 ± 0.0; Morin-Sardin et al., 2016) and Raclette de Savoie cheese (pH 5.4 ± 0.2) were used. For Raclette de Savoie cheese, only the internal sections below the rind were used. To do so, a ten mm thick rind and cheese sample was removed using a sterile knife, then five mm thick slices were vertically cut using a sterile lyre and standardized to 70 mm diameter pieces which were then transferred into sterile Petri dishes. Finally, cheese slices were exposed to UV light for 15 min and conserved at 4 °C until use.

2.5. Impact of abiotic factors on fungal growth determined by laser nephelometry

The tested liquid culture media (190 μL, except for the negative control, 200 μL), were distributed into sterile 96 well microplates (Thermo Scientific). Then 10 μL of inoculum at 10⁶ conidia/mL were added to each well. In parallel, fungal suspensions were inoculated onto PDA to insure growth and purity. Microplates were placed in plastic containers with sterile distilled water placed at the bottom to regulate

humidity before incubation in darkness, in an external incubator (BF 240, Binder GmbH, Germany) at 25.0 °C for pH and a_w conditions or at the studied temperature (incubators BF 240 and KB 240 Binder GmbH, Germany; INB500, IPP110 and IPP500, Memmert GmbH, Germany; MIR-253 and MIR-154, Sanyo, Japan). The measurements were performed using a laser-based microplate nephelometer (NEPHELOstar^{plus}, BMG Labtech) equipped with a laser diode at 635 nm. Before each measurement, a 20 s 500 rpm double-orbital agitation step was performed by the nephelometer microplate reader. All microplates were monitored two to three times daily until signal saturation (or up to one month when no signal increase was observed). Two or three biological replicates and a minimum of two technical replicates per biological replicate were systematically performed for each studied isolate.

2.6. Impact of media on fungal growth using radial measurements

The impact of fungal growth kinetics on synthetic PDA media in comparison to cheese agar and Raclette de Savoie was assessed for multiple cheese related isolates, *B. domesticum* (n = 5 isolates), *B. allantoides* (n = 3), *B. penicilloides* (n = 3), *L. lagenoides* (n = 4) and *L. verticilliforme* (n = 1), and “non-cheese” (*B. bisseptatum*, *B. delphinoides*, *B. dimerum*, *B. lunatum*, *B. nectrioides* and *B. penzigii*) type strains (Table 1). To do so, five μL of conidia suspensions (10⁶ conidia/mL) were inoculated onto the center of each medium with at least two biological and two technical replicates. All media were incubated in darkness at 15.0 °C and 25.0 °C, then radial growth was monitored in two perpendicular directions, for 30 to 40 days or 15 to 28 days, respectively.

2.7. Data analysis and modeling

2.7.1. Primary modeling

At the end of each experiment, growth kinetics obtained either by nephelometry or radial growth measurements (expressed as Relative Nephelometric Units -RNU- and diameters in millimeters, respectively) were obtained as a function of time. The obtained data was assembled with Microsoft Excel (after export from the Nephelostar Galaxy software for nephelometry).

Each kinetic (RNU or diameters in mm, times) was fitted by the modified Gompertz equation (Eq. (1)) (Zwietering et al., 1990):

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

where y is the RNU or diameter observed at the time t , a corresponds to maximal amplitude of signal or growth, μm is the maximal growth rate (RNU/h or mm/day) and λ the lag time (hours or day), corresponding to the time before detectable fungal growth.

For the nephelometry method, as a signal was measurable in wells containing only culture medium, negative controls were performed in each microplate to check for potential well contamination, and to standardize the kinetics modeling between analyses. Each negative control kinetic was also fitted, then the fitted values were subtracted from the corresponding growth kinetics data obtained with the inoculated well in the same conditions.

2.7.2. Secondary modeling

The maximal growth rates were fitted by the cardinal model (Eqs. 2 & 3) (Rosso et al., 1993) which is used to study the impact of abiotic factors on microbial growth (Dagnas and Membre, 2013):

$$\mu m = \mu_{opt} \times CMn(X) \quad (2)$$

$$CMn(X) = \begin{cases} 0 & X \leq X_{min} \\ \frac{(X - X_{max}) \cdot (X - X_{min})^n}{(X_{opt} - X_{min})^{n-1} \cdot \{(X_{opt} - X_{min}) \cdot (X - X_{opt}) - (X_{opt} - X_{max}) \cdot [(n-1) \cdot X_{opt} + X_{min} - n \cdot X]\}} & X_{min} < X < X_{max} \\ 0 & X > X_{max} \end{cases} \quad (3)$$

where μ_{opt} corresponds to the optimal growth rate (RNU/h or mm/day), X represents the studied parameter (temperature, pH or a_w) and X_{min} , X_{max} and X_{opt} are respectively the minimum, maximum and optimal parameter values for which growth is possible. According to the literature, $n = 2$ for temperature and a_w and $n = 1$ for pH (Pinon et al., 2004; Rosso et al., 1995). Moreover, for a_w modeling, the a_w max was fixed at 1 as done by Pinon et al. (2004) and a_w opt at 0.99 (highest observed value).

As for radial growth measurements, for each solid medium, the optimal growth rate was estimated fitting the maximal growth rates using the cardinal model with the cardinal values estimated during laser nephelometry assays (T_{min} , T_{opt} and T_{max}).

The primary and secondary models were fitted with these equations by minimizing the sum of squared error (*nlinfit* function, MATLAB R2018b software, Natick, Massachusetts: The MathWorks Inc.). Five percent confidence intervals were computed using the Jacobian matrix (*nlparci* function, MATLAB R2018b software, Natick, Massachusetts: The MathWorks Inc.). As the sum of the squared error (SSE), the Root Mean Square Error (RMSE) were computed as fitting criterions.

2.7.3. Statistical analyses

A principal component analysis (PCA) was performed based on the estimated cardinal values to identify the main trends among the 26 isolates belonging to the eleven studied species. Then, a one-way analysis of variance (ANOVA) and a multiple comparison test were performed to compare the cardinal values between the two identified groups.

An additional ANOVA (p value < 0.05) was also done in order to compare the growth rates obtained among *Nectriaceae* isolates. All statistical analyses were done using the MATLAB software.

To specifically compare some cardinal values, the likelihood ratio test was also applied as done by Trunet et al. (2015) and Morin-Sardin et al. (2016). To do so, the secondary modeling was fitted with one parameter value fixed for all the isolates (constrained model, C), then the obtained SSE were compared to those obtained with the previous conditions (unconstrained model, U) applying Eq. (4).

$$S_L = n \cdot \ln n \text{ SSE}_C - n \cdot \ln n \text{ SSE}_U \quad (4)$$

where n corresponds to the number of data, SSE_C and SSE_U to the Sum of the Squared Error for the constrained and unconstrained model, respectively. When n tends to infinity, the limiting distribution of S_L is a Chi square test (Chi2) distributed with a degree of freedom defined as $p_U - p_C$, where p_U and p_C are the number of parameters in unconstrained and constrained models. If S_L is lower than χ^2 ($\alpha = 0.05$), the difference was considered as not significant, that is to say that the fixed parameter is equal to the determined parameter.

3. Results

3.1. Impact of abiotic factors on fungal growth

3.1.1. Preliminary studies

For *B. domesticum* RAPD profiling, the obtained results (Fig. S1) showed low genetic diversity among the 25 tested isolates but allowed selecting five representative strains with the most diverse profiles.

For growth studies, using nephelometry measurements, we also ensured that discontinuous measurements, for high throughput parallel assays, and microplate agitation before measurements did not impact growth kinetics (data not shown). Noteworthy, the μ_m estimated between technical replicates highlighted standard error inferior to 10.0% (3.0 to 8.4%) at a temperature close to the optimal (30.0 °C).

3.1.2. Interspecific comparative study

The interspecific study using laser nephelometry was performed on the eleven type strains of *Bisifusarium* spp. and *Longinectria* spp.. For temperature, different growth behaviors were observed among *Nectriaceae* spp. (Fig. 1, Fig. 2 and Table 2). *B. allantoides*, *B. domesticum*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* and *L. verticilliforme* (cheese-associated species) but also *B. bisepatum*, *B. lunatum*, and *B. penzigii* ("non-cheese" species), type strains developed slowly at 5.0 °C while no growth was observed for *B. delphinoides*, *B. dimerum* and *B. nectrioides* ("non-cheese" species). Interestingly, for the cheese-associated species included in this study, no growth was observed at 37.0 °C for *B. allantoides*, *B. domesticum*, *L. lagenoides* and *L. verticilliforme* and even at 30.0 °C for *B. penicilloides*. Conversely, for "non-cheese" species, growth was observed up to 38.0 °C, and even 40.0 °C for *B. dimerum*. Based on the estimated cardinal values via secondary modeling (Table 2), the lowest optimal and maximal temperature values were observed for cheese-associated *Nectriaceae* spp. (i.e. T_{opt} estimated 22.3 ± 0.4 °C, 22.4 ± 0.2 °C, 20.1 ± 0.6 °C, 21.8 ± 0.2 °C and 19.1 ± 0.5 °C for *B. allantoides*, *B. domesticum*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* and *L. verticilliforme*, respectively) while all the other *Bisifusarium* species had significantly higher optimal (between 26.1 °C and 36.2 °C) and maximal (between 38.0 °C and 41.2 °C) temperature values (Fig. 1, Fig. 2 and Table 2).

Concerning pH impact, variations between pH 5.0 and 10.0 only had a slight impact on fungal growth, i.e. on both lag phase and growth rate (data not shown) for all type strains belonging to the eleven species. No growth was observed at pH 2.0 and pH 14.0, and even pH 3.0, for the five cheese-associated species. Based on the estimated cardinal values (Table 2), the highest minimum pH values were obtained for cheese-associated species with a $pH_{min} = 3.7 \pm 0.1$ for *B. domesticum* (Table 2) or $pH_{min} = 3.9 \pm 0.2$ for *B. penicilloides* (Table 2). For the other "non-cheese" species, this value was close to pH 2.9 (Table 2). However, it should be noted that this condition was really drastic for some *Bisifusarium* spp. (e.g. *B. delphinoides*, *B. nectrioides* and *B. lunatum*) as a significant decrease in growth rate between pH 4 and pH 3 was observed (p value < 0.001 for all species except *B. dimerum* p value = 0.004).

Concerning sodium chloride used as an a_w depressor, as expected, growth rates decreased with decreased a_w and several growth profiles were identified. The highest halotolerance was observed for

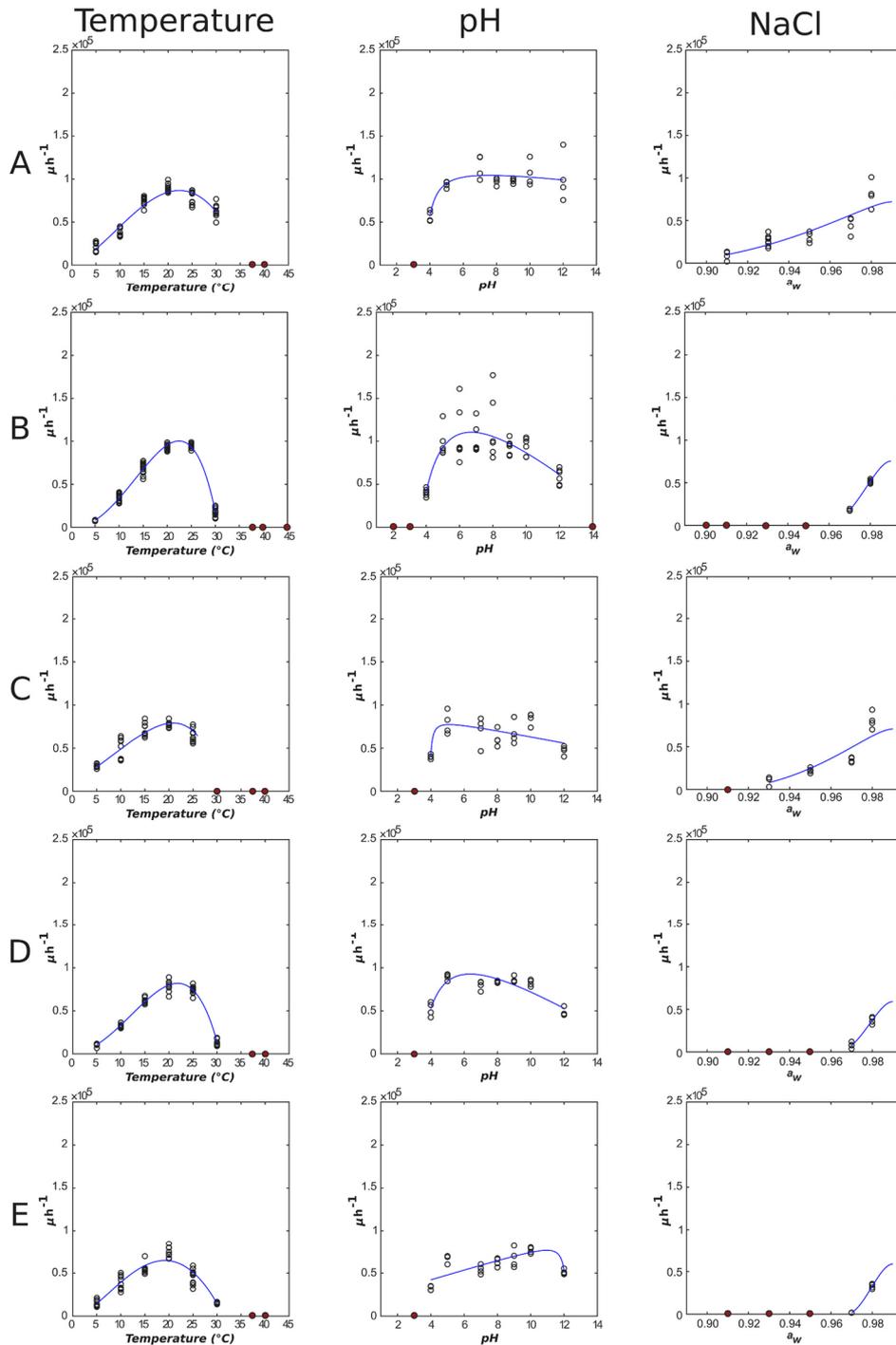


Fig. 1. Secondary growth models obtained for the cheese-associated *Nectriaceae* species type strains for temperature, pH and a_w (using NaCl as depressor) in PDB medium. Lines A to E respectively correspond to *Bisifusarium allantoides* UBOCC-A-120036^{NT}, *Bisifusarium domesticum* MNRN-RF-05627^{NT}, *Bisifusarium penicilloides* UBOCC-A-120021^{NT}, *Longinectria lagenoides* UBOCC-A-120039^{NT} and *Longinectria verticilliforme* UBOCC-A-120043^{NT}. Dots correspond to no observable growth in the tested conditions.

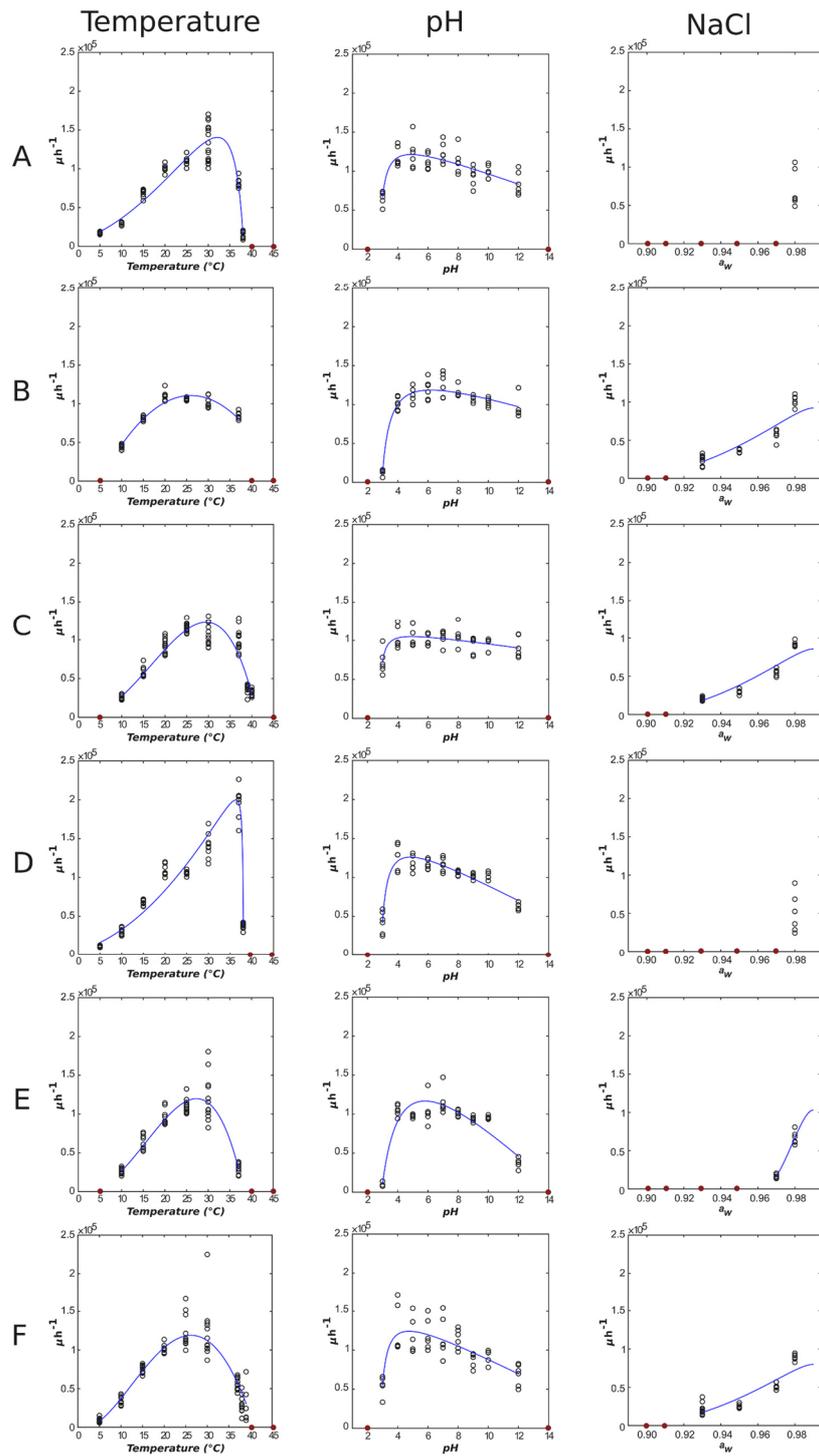


Fig. 2. Secondary growth models obtained for the “non-cheese” *Nectriaceae* species type strains for temperature, pH and a_w (using NaCl as depressor) in PDB medium. Lines A to E respectively correspond to *B. bisepatum* CBS 110311^T, *B. delphinoides* CBS 120718^{HT}, *B. dimerum* MNHN-RF-05625^{ET}, *Bipalium lunatum* CBS 632.76^{NT}, *B. nectrioides* CBS 176.31^{LT} and *B. penzigii* CBS 317.34^{HT}. Dots correspond to no observable growth in the tested conditions.

Table 2
Estimated cardinal values for temperature, pH and a_w of the eleven studied *Nectriaceae* spp..

Abiotic factor	Species	X_{min}	$\pm SD$	X_{opt}	$\pm SD$	X_{max}	$\pm SD$	μ_{opt}	$\pm SD$	SSE	RMSE	Measurable growth limits	
Temperature (°C)	<i>B. allantoides</i> ^C UBOCC-A-120036 ^{NT}	-1.8	1.1	22.3	0.4	36.0	1.1	8.68 × 10 ⁴	2.24 × 10 ³	14,392	15	5–30	
	<i>B. domesticum</i> ^C MNHN-RF-05627 ^{NT}	0.7	0.2	22.4	0.2	30.6	0.1	1.00 × 10 ⁵	1.30 × 10 ³	9822	11	5–30	
	<i>B. penicilloides</i> ^C UBOCC-A-120021 ^{NT}	-7.9	2.9	20.1	0.6	29.8	1.9	7.83 × 10 ⁴	2.83 × 10 ³	11,832	15	5–25	
	<i>L. lagenoides</i> ^C UBOCC-A-120039 ^{NT}	-0.6	0.4	21.8	0.2	30.6	0.1	8.20 × 10 ⁴	1.17 × 10 ³	5195	9	5–30	
	<i>L. verticilliforme</i> ^C UBOCC-A-120043 ^{NT}	-0.2	1.1	19.1	0.5	31.4	0.3	6.46 × 10 ⁴	1.94 × 10 ³	18,087	18	5–30	
	<i>B. bisseptatum</i> ^{NC} CBS 110311 ^T	-7.6	1.0	32.1	0.3	38.2	0.0	1.41 × 10 ⁵	3.32 × 10 ³	40,092	22	5–38	
	<i>B. delphinooides</i> ^{NC} CBS 120718 ^{HT}	4.9	ND	26.1	0.3	47.3	-0.9	1.11 × 10 ⁵	1.79 × 10 ³	5745	10	10–38	
	<i>B. dimerum</i> ^{NC} MNHN-RF-05625 ^{ET}	0.4	1.1	29.4	0.4	41.2	0.2	1.23 × 10 ⁵	3.06 × 10 ³	55,271	24	10–40	
	<i>Bipalium lunatum</i> ^{NC} CBS 632.76 ^{NT}	-6.7	1	36.2	0.4	38.0	0.0	2.00 × 10 ⁵	5.36 × 10 ³	42,355	24	5–38	
	<i>B. nectrioides</i> ^{NC} CBS 176.31 ^{LT}	1.6	1.1	27.3	0.5	38.2	0.2	1.20 × 10 ⁵	3.06 × 10 ³	35,883	22	10–37	
	<i>B. pensigii</i> ^{NC} CBS 317.34 ^{HT}	1.5	1.2	26.2	0.9	40.9	0.6	1.19 × 10 ⁵	6.63 × 10 ³	300,725	54	5–39	
	pH	<i>B. allantoides</i> ^C UBOCC-A-120036 ^{NT}	3.7	0.3	7.5	1.2	ND	-	1.04 × 10 ⁵	4.34 × 10 ³	10,595	19	4–12
		<i>B. domesticum</i> ^C MNHN-RF-05627 ^{NT}	3.7	0.1	6.7	0.4	ND	-	1.11 × 10 ⁵	4.34 × 10 ³	40,426	29	4–12
<i>B. penicilloides</i> ^C UBOCC-A-120021 ^{NT}		3.9	0.2	5.1	2.0	ND	-	7.73 × 10 ⁴	6.94 × 10 ³	17,628	25	4–12	
<i>L. lagenoides</i> ^C UBOCC-A-120039 ^{NT}		3.4	0.2	6.4	0.4	ND	-	9.28 × 10 ⁴	3.14 × 10 ³	6418	15	4–12	
<i>L. verticilliforme</i> ^C UBOCC-A-120043 ^{NT}		ND	-	11.0	2.8	12.1	0.9	7.64 × 10 ⁴	1.96 × 10 ⁴	12,201	21	4–12	
<i>B. bisseptatum</i> ^{NC} CBS 110311 ^T		2.8	0.2	4.9	0.5	ND	-	1.21 × 10 ⁵	3.06 × 10 ³	21,564	20	3–12	
<i>B. delphinooides</i> ^{NC} CBS 120718 ^{HT}		3.0	0.0	6.2	0.3	ND	-	1.19 × 10 ⁵	2.30 × 10 ³	13,540	16	3–12	
<i>B. dimerum</i> ^{NC} MNHN-RF-05625 ^{ET}		2.8	0.3	4.9	1.0	ND	-	1.05 × 10 ⁵	2.63 × 10 ³	17,544	18	3–12	
<i>Bipalium lunatum</i> ^{NC} CBS 632.76 ^{NT}		2.9	0.1	4.8	0.3	ND	-	1.26 × 10 ⁵	3.06 × 10 ³	17,921	18	3–12	
<i>B. nectrioides</i> ^{NC} CBS 176.31 ^{LT}		2.9	0.0	5.8	0.2	ND	-	1.17 × 10 ⁵	3.06 × 10 ³	26,464	23	3–12	
<i>B. pensigii</i> ^{NC} CBS 317.34 ^{HT}		2.9	0.1	4.8	0.5	ND	-	1.24 × 10 ⁵	4.59 × 10 ³	39,464	27	3–12	
a_w (NaCl)		<i>B. allantoides</i> ^C UBOCC-A-120036 ^{NT}	0.87	0.01	-	-	-	-	7.20 × 10 ⁴	6.62 × 10 ³	20,284	29	0.91–0.98
		<i>B. domesticum</i> ^C MNHN-RF-05627 ^{NT}	0.96	0.00	-	-	-	-	7.54 × 10 ⁴	1.53 × 10 ³	156	4	0.97–0.98
	<i>B. penicilloides</i> ^C UBOCC-A-120021 ^{NT}	0.90	0.01	-	-	-	-	7.06 × 10 ⁴	7.96 × 10 ³	14,487	30	0.93–0.98	
	<i>L. lagenoides</i> ^C UBOCC-A-120039 ^{NT}	0.96	0.00	-	-	-	-	5.91 × 10 ⁴	7.28 × 10 ³	1556	14	0.97–0.98	
	<i>L. verticilliforme</i> ^C UBOCC-A-120043 ^{NT}	0.97	0.00	-	-	-	-	5.89 × 10 ⁴	3.49 × 10 ³	184	6	0.97–0.98	
	<i>B. bisseptatum</i> ^{NC} CBS 110311 ^T	0.97	-	-	-	-	-	(1.53 × 10 ⁵)	ND	9683	40	0.98	
	<i>B. delphinooides</i> ^{NC} CBS 120718 ^{HT}	0.88	0.01	-	-	-	-	9.23 × 10 ⁴	5.62 × 10 ³	18,989	25	0.93–0.98	
	<i>B. dimerum</i> ^{NC} MNHN-RF-05625 ^{ET}	0.89	0.00	-	-	-	-	8.56 × 10 ⁴	4.14 × 10 ³	11,140	19	0.93–0.98	
	<i>Bipalium lunatum</i> ^{NC} CBS 632.76 ^{NT}	0.97	-	-	-	-	-	(1.14 × 10 ⁵)	ND	15,676	51	0.98	
	<i>B. nectrioides</i> ^{NC} CBS 176.31 ^{LT}	0.96	0.00	-	-	-	-	1.03 × 10 ⁵	6.00 × 10 ³	1804	12	0.97–0.98	
	<i>B. pensigii</i> ^{NC} CBS 317.34 ^{HT}	0.89	0.01	-	-	-	-	7.99 × 10 ⁴	5.64 × 10 ³	22,086	27	0.93–0.98	

Minimal (X_{min}), optimal (X_{opt}) and maximal (X_{max}) values and optimal growth rates (μ_{opt} , expressed in Relative Nephelometric Unit/h) for fungal growth are represented for each tested abiotic factor. Standard deviation (SD) was calculated from confidence interval values. ND corresponds to values that could not be estimated by the model. SSE (Sum of the Squared Error) and RMSE (Root Mean Square Error) were estimated during secondary modeling. The measurable growth limits are the minimum and maximum values for which growth was detected in the tested conditions. C: cheese-associated, NC: "non-cheese".

B. allantoïdes type strain which grew in presence of ~13.0% NaCl with an estimated a_{wmin} 0.87 (corresponding to ~17.0% NaCl). Then, *B. dimerum*, *B. delphinoides*, *B. penicilloïdes* and *B. penzigii* type strains grew in the presence of approximately 11.0% of salt, corresponding to a_w 0.93, and their estimated a_{wmin} was between 0.90 and 0.88 (14.5–16.0% NaCl). On the other hand, *B. domesticum*, *B. nectrioides*, *L. lagenoides* and *L. verticilliforme* type strains only grew at 6.0% NaCl (a_w 0.97) (a_{wmin} = 0.96–0.97) while *B. lunatum* and *B. biseptatum* type strains only grew at NaCl concentrations \leq 3.0% (a_w 0.98) (a_{wmin} = 0.97) (Fig. 1, Fig. 2 and Table 2).

3.1.3. Intraspecific comparative study

Intraspecific growth behavior variability was evaluated among different isolates belonging to four cheese-associated species (excluding *L. verticilliforme* as only one isolate is currently available) and five *B. dimerum* isolates as a "non-cheese" representative species. Isolates were selected according to their isolation origins, except the five *B. domesticum* isolates which were selected, as previously stated, according to their different RAPD profiles (§ 3.1.1, Fig. S1). This was done to avoid a representativity bias as some *B. domesticum* isolates are commonly used as commercial adjunct cultures in cheese production. Distinct profiles between cheese-associated isolates and the selected "non-cheese" strains could be noted (Table 3 and Fig. 3). As for cheese-associated species, *B. allantoïdes*, *B. domesticum* and *L. lagenoides* isolates, fungal growth was observed in the 5.0–30.0 °C temperature range, and even 5.0–25.0 °C for *B. penicilloïdes*, with T_{opt} estimated at 22.7 ± 0.4 °C; 20.9 ± 0.9 °C; 21.4 ± 1.2 °C; and 21.9 ± 0.7 °C respectively. Among these species, one *L. lagenoides* isolate (UBOCC-A-120038) grew only up to 25.0 °C and for one *B. domesticum* isolate (UBOCC-A-120004), growth was observed in the 10.0–25.0 °C temperature range. In addition, for *B. domesticum* MNHN-RF-05627^{NT}, faster growth than for the other *B. domesticum* isolates was observed between 20.0 and 25.0 °C (Table 3 and Fig. 3). For pH, no notable differences could be observed within each species and, as already observed for the type strains, no major impact on fungal growth between pH 5.0 and pH 10.0 and no growth at pH 3.0 were observed for all tested cheese-associated isolates. However, for *B. domesticum*, significantly slower growth was observed for one isolate (UBOCC-A-120001) at pH 4.0 (p value < 0.05) and pH 5.0 (p value < 0.01). Regarding NaCl impact, while for *B. allantoïdes* and *B. penicilloïdes*, similar results within a considered species were observed, few differences could be noted for *B. domesticum* and *L. lagenoides*. For the latter, UBOCC-A-120038 grew up to a_w 0.98 vs. 0.97 for the other isolates. As for *B. domesticum*, the most tolerant isolate (UBOCC-A-120001) grew up to 10% NaCl (estimated a_{wmin} 0.93) while the most sensitive isolate (UBOCC-A-120004) could only grow up to 3% NaCl (a_{wmin} 0.97). The three other tested isolates exhibited intermediary behaviors (growth up to 9% NaCl - a_{wmin} 0.96- for MNHN RF-05627^{NT} and 6% NaCl - a_{wmin} 0.96- for UBOCC-A-120002 and UBOCC-A-120003) (Table 3 and Fig. 3). As for the selected "non-cheese" species, *B. dimerum* isolates grew faster than cheese-associated species (e.g. on average with temperature impact modeling, 1.04×10^5 RNU/h vs. 6.14×10^4 RNU/h for *B. domesticum* isolates, p value < 0.001) and different growth characteristics than those of cheese-associated species were noted. *B. dimerum* isolates could not grow at 10 °C in these experimental conditions but grew up to 40.0 °C with T_{max} estimated at 41.1 ± 0.4 °C and T_{opt} at 30.1 ± 1.1 °C for the five tested isolates. Finally, for pH impact, similar curve profiles were observed with no notable differences between the tested isolates. The same observation was done for NaCl impact, with growth still observed at 13.0% NaCl (a_w 0.91) and a_{wmin} values estimated to range from 0.86–0.88. Overall, for each species, similar profiles to those obtained during the interspecific study

(performed on type strains) were observed with little variations within each species.

3.1.4. Principal component analysis

The principal component analysis performed on all studied isolates, confirmed the previous inter- and intra-specific observations separating the isolates into two clusters corresponding, on one hand, to the cheese-associated species and, on the other, to "non-cheese" ones (Fig. 4). Moreover, it was observed that the "cheese" cluster exhibited significantly lower optimal growth rates (for temperature, pH and a_w) than the "non-cheese" cluster (p values \leq 0.001), but also a significantly lower T_{max} and T_{opt} (p values \leq 0.001) while pH_{min} and pH_{opt} were lower for the "non-cheese" cluster (p values \leq 0.01).

3.2. Impact of media on fungal growth

Growth of the cheese-associated *Bisifusarium* and *Longinectria* spp. (i. e. *B. allantoïdes* - n = 3-, *B. domesticum* - n = 5-, *B. penicilloïdes* - n = 3-, *L. lagenoides* - n = 4- and *L. verticilliforme* - n = 1-), as well as of the "non-cheese" *Bisifusarium* species type strains (i. e. *B. biseptatum*, *B. delphinoides*, *B. dimerum*, *B. lunatum*, *B. nectrioides* and *B. penzigii*), was monitored, at 15.0 °C and 25.0 °C, using synthetic media (PDA) and cheese matrices (cheese agar and Raquette de Savoie cheese). Noteworthy, growth was observed for all twenty-two studied isolates in all tested conditions and the secondary modeling accurately fit (low RMSE values ranged from 0.02 to 0.33 mm/day) the maximal growth rates estimated by the primary modeling at both temperatures for each media. Different growth characteristics were highlighted depending on the considered isolate, temperature and medium (Table 4, Figs. 5 and 6). Regarding *B. allantoïdes*, *L. lagenoides* and *L. verticilliforme* growth on cheese agar compared to PDA, optimal growth rates slightly decreased between 15.6 and 18.8%, 8.6–18.4% and 8.8% respectively. Among *L. lagenoides* isolates, it could be noted that one isolate (UBOCC-A-120038) appeared as less impacted (-8.6%). For *B. penicilloïdes*, intraspecific variability was also noted. Indeed, for one *B. penicilloïdes* isolate, μ_{opt} decreased by 18.5% (UBOCC-A-120034) while for the two other isolates, it was unchanged or even increased (UBOCC-A-120021^{NT} and VTT-D-041022 - +16.1% - respectively). Interestingly, for *B. domesticum* isolates, their μ_{opt} were actually higher on cheese agar than on PDA for the five tested isolates with high or moderate increase depending on the considered isolate. Indeed, for UBOCC-A-120002, UBOCC-A-120004 and MNHN-RF-05627^{NT}, μ_{opt} increased by 3.8–9.7%, while for UBOCC-A-120001 and UBOCC-A-120003 the increase was more substantial (28.6% and 25.0%, respectively). As for Raquette de Savoie, *B. allantoïdes* growth was notably slower than on PDA (on average, decreasing by $43.6 \pm 1.9\%$) but *B. penicilloïdes*, *L. lagenoides* and *L. verticilliforme* μ_{opt} were negatively affected (between 25.8 and 55.6%; 22.9–39.5% and 35.3%, respectively). Moreover, among *B. penicilloïdes* isolates, it could be noted that UBOCC-A-120034 growth was more affected than the other ones (-55.6% vs. -25.8% and -31.4%). As for *B. domesticum*, UBOCC-A-120001 and UBOCC-A-120003 isolates could be considered as little or not impacted by growth on Raquette de Savoie compared to PDA as a very slight μ_{opt} decrease was noted (4.8% and 10.0%). For UBOCC-A-120002 and MNHN-RF-05627^{NT}, μ_{opt} decreased by 19.2% and 19.4%, while for UBOCC-A-120004 the decrease reached 40.0%.

Comparing the cheese-associated species to the "non-cheese" species, it could be noted that the latter grew faster (except *B. nectrioides*) on the three media (e.g. μ_{opt} = 12.8 ± 0.3 mm/day for *B. biseptatum* CBS 110311 vs 3.1 ± 0.1 mm/day for *B. domesticum* MNHN-RF-05627 on PDA) (Table 4, Figs. 5 and 6). However, on cheese agar, compared to synthetic medium, important μ_{opt} decreases for *B. delphinoides*, *B. penzigii*

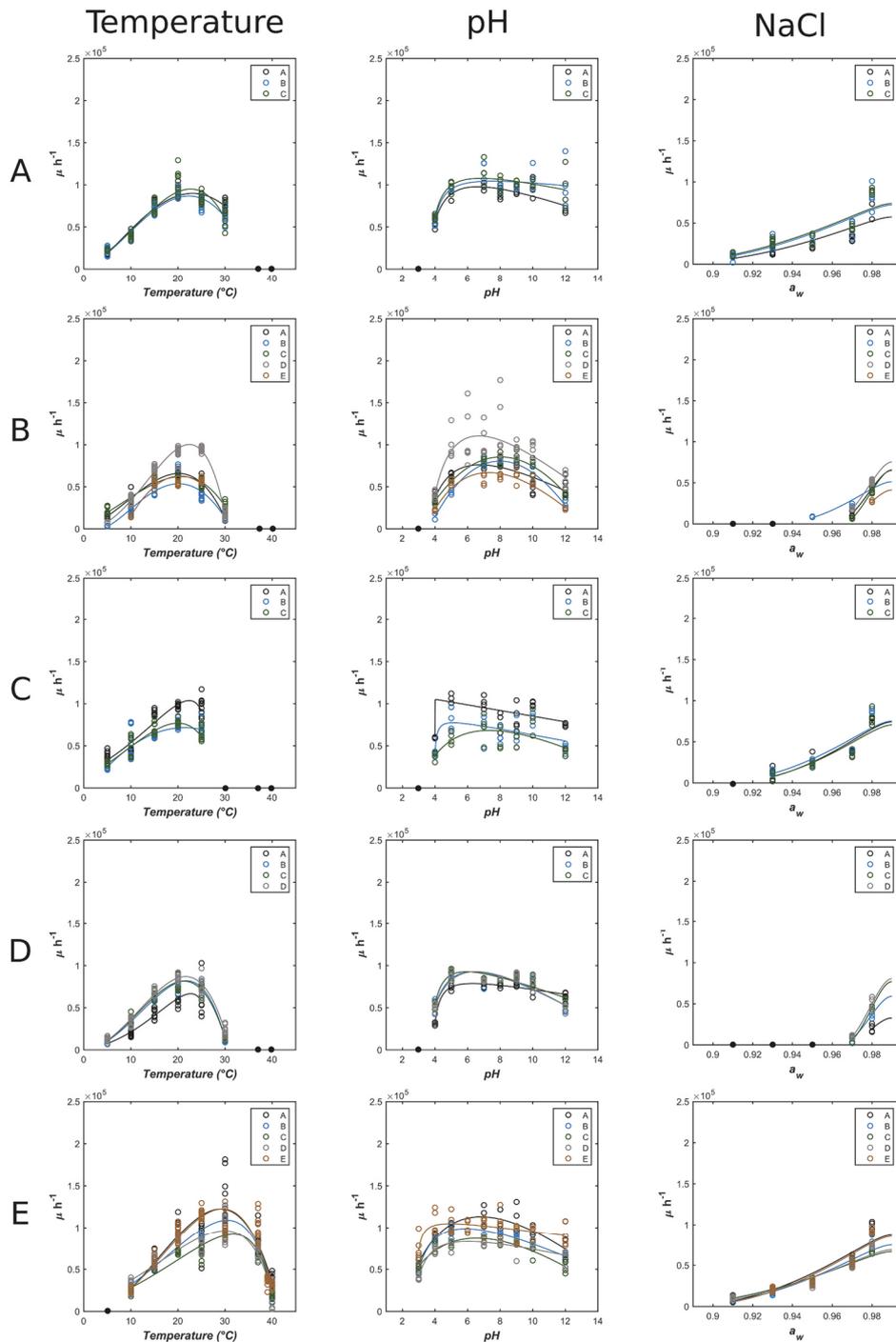


Fig. 3. Secondary models (obtained for various isolates of the four *Nectriaceae* cheese-associated species and *Bisifusarium dimerum* (“non-cheese”) for temperature, pH and a_w (using NaCl as depressor) on PDB medium. Lines A to E respectively correspond to *B. allantoides* (curves A: UBOCC-A-120035, B: UBOCC-A-120036^{NT}, C: UBOCC-A-120037), *B. domesticum* (curves A: UBOCC-A-120002, B: UBOCC-A-120001, C: UBOCC-A-120003, D: MNHN-RF-05627^{NT}, E: UBOCC-A-120004), *B. penicilloides* (curves A: VTT-D-041022, B: UBOCC-A-120034, C: UBOCC-A-120021^{NT}), *L. lagenoides* (curves A: UBOCC-A-120038, B: UBOCC-A-120039^{NT}, C: UBOCC-A-120041, D: ESE-00140) and *B. dimerum* (curves A: IHEM-2314, B: IHEM-10066, C: IHEM-14513, D: UBOCC-A-110149, E: MNHN-RF-05625^{ET}). Dots correspond to no observable growth in the tested conditions.

Table 3

Estimated cardinal values for temperature, pH and a_w of *B. allantoïdes*, *B. domesticum*, *B. penicilloïdes*, *L. lagenoides*, *L. verticilliforme* and *B. dimerum* ("non-cheese") isolates.

Abiotic factor	Species	X_{min}	$\pm SD$	X_{opt}	$\pm SD$	X_{max}	$\pm SD$	μ_{opt}	$\pm SD$	SSE	RMSE	Measurable growth limits	
Temperature (°C)	<i>B. allantoïdes</i> ^C UBOCC-A-120035	-0.9	1.0	23.1	0.4	39.4	1.6	8.99 × 10 ⁴	1.96 × 10 ³	10,118	13	5–30	
	<i>B. allantoïdes</i> ^C UBOCC-A-120036 ^{NT}	-1.8	1.1	22.3	0.4	36.0	1.1	8.68 × 10 ⁴	2.24 × 10 ³	14,392	15	5–30	
	<i>B. allantoïdes</i> ^C UBOCC-A-120037	-3.2	1.4	22.7	0.5	34.0	0.9	9.51 × 10 ⁴	3.04 × 10 ³	21,372	19	5–30	
	<i>B. domesticum</i> ^C MNHN-RF-05627 ^{NT}	0.7	0.2	22.4	0.2	30.6	0.1	1.00 × 10 ⁵	1.30 × 10 ³	9822	11	5–30	
	<i>B. domesticum</i> ^C UBOCC-A-120002	-1.9	1.2	20.1	0.5	31.0	0.2	6.58 × 10 ⁴	2.02 × 10 ³	12,822	17	5–30	
	<i>B. domesticum</i> ^C UBOCC-A-120001	3.0	0.4	20.1	0.4	31.4	0.3	5.36 × 10 ⁴	1.84 × 10 ³	11,355	16	5–30	
	<i>B. domesticum</i> ^C UBOCC-A-120003	-4.8	1.7	20.7	0.6	32.6	0.5	6.22 × 10 ⁴	1.71 × 10 ³	9197	14	5–30	
	<i>B. domesticum</i> ^C UBOCC-A-120004	8.3	ND	21.0	0.5	33.7	2.3	6.27 × 10 ⁴	2.47 × 10 ³	5051	13	10–25	
	<i>B. penicilloïdes</i> ^C UBOCC-A-120021 ^{NT}	-7.9	2.9	20.1	0.6	29.8	1.9	7.83 × 10 ⁴	2.83 × 10 ³	11,832	15	5–25	
	<i>B. penicilloïdes</i> ^C UBOCC-A-120034	1.2	ND	21.5	1.8	41.8	6.5	7.27 × 10 ⁴	2.47 × 10 ³	18,737	19	5–25	
	<i>B. penicilloïdes</i> ^C VTT-D-041022	-12.1	3.5	22.5	0.7	27.6	3.0	1.05 × 10 ⁵	7.47 × 10 ³	17,608	19	5–25	
	<i>L. lagenoides</i> ^C ESE 00140	-0.3	0.5	21.6	0.3	31.1	0.1	8.70 × 10 ⁴	1.89 × 10 ³	12,530	14	5–30	
	<i>L. lagenoides</i> ^C UBOCC-A-120038	-2.1	2.4	22.9	0.6	27.3	3.4	6.85 × 10 ⁴	8.04 × 10 ³	20,553	22	5–25	
	<i>L. lagenoides</i> ^C UBOCC-A-120039 ^{NT}	-0.6	0.4	21.8	0.2	30.6	0.1	8.20 × 10 ⁴	1.17 × 10 ³	5195	9	5–30	
	<i>L. lagenoides</i> ^C UBOCC-A-120041	-0.3	0.4	21.3	0.3	30.7	0.1	8.15 × 10 ⁴	1.40 × 10 ³	7412	11	5–30	
	Temperature (°C)	<i>B. dimerum</i> ^{NC} IHEM-2314	1.0	2.1	29.1	0.9	41.7	0.5	1.22 × 10 ⁵	5.36 × 10 ³	60,025	33	10–40
<i>B. dimerum</i> ^{NC} IHEM-10066		-4.8	1.8	30.4	0.5	40.9	0.2	1.09 × 10 ⁵	3.06 × 10 ³	19,025	19	10–40	
<i>B. dimerum</i> ^{NC} IHEM-14513		-8.5	2.1	31.8	0.5	40.6	0.1	9.19 × 10 ⁴	2.47 × 10 ³	15,914	17	10–40	
<i>B. dimerum</i> ^{NC} MNHN-RF-05625 ^{ET}		0.4	1.1	29.4	0.4	41.2	0.2	1.23 × 10 ⁵	3.06 × 10 ³	55,271	24	10–40	
<i>B. dimerum</i> ^{NC} UBOCC-A-110149		-9.7	4.5	30.0	0.9	40.9	0.3	9.64 × 10 ⁴	4.41 × 10 ³	50,517	31	10–40	
pH		<i>B. allantoïdes</i> ^C UBOCC-A-120035	3.5	0.2	6.6	0.4	ND	-	9.78 × 10 ⁴	2.73 × 10 ³	4994	13	4–12
		<i>B. allantoïdes</i> ^C UBOCC-A-120036 ^{NT}	3.7	0.3	7.5	1.2	ND	-	1.04 × 10 ⁵	4.34 × 10 ³	10,595	19	4–12
		<i>B. allantoïdes</i> ^C UBOCC-A-120037	3.6	0.3	6.8	0.6	ND	-	1.08 × 10 ⁵	3.83 × 10 ³	7867	17	4–12
		<i>B. domesticum</i> ^C MNHN-RF-05627 ^{NT}	3.7	0.1	6.7	0.4	ND	-	1.11 × 10 ⁵	4.34 × 10 ³	40,426	29	4–12
		<i>B. domesticum</i> ^C UBOCC-A-120002	3.5	0.3	6.7	0.5	ND	-	7.61 × 10 ⁴	3.47 × 10 ³	10,424	19	4–12
		<i>B. domesticum</i> ^C UBOCC-A-120001	3.6	0.1	8.0	0.2	13.0	0.2	8.06 × 10 ⁴	1.81 × 10 ³	2964	11	4–12
		<i>B. domesticum</i> ^C UBOCC-A-120003	2.9	0.2	8.0	0.2	13.7	0.3	8.55 × 10 ⁴	1.79 × 10 ³	2902	10	4–12
		<i>B. domesticum</i> ^C UBOCC-A-120004	3.4	0.2	7.3	0.3	13.5	0.3	6.69 × 10 ⁴	2.17 × 10 ³	5166	14	4–12
		<i>B. penicilloïdes</i> ^C UBOCC-A-120021 ^{NT}	3.9	0.2	5.1	2.0	ND	-	7.73 × 10 ⁴	6.94 × 10 ³	17,628	25	4–12
		<i>B. penicilloïdes</i> ^C UBOCC-A-120034	3.0	0.9	7.3	0.9	ND	-	6.82 × 10 ⁴	4.21 × 10 ³	18,293	26	4–12
pH		<i>B. penicilloïdes</i> ^C VTT-D-041022	4.0	0.2	ND	-	ND	-	1.05 × 10 ⁵	ND	8828	18	4–12
	<i>L. lagenoides</i> ^C ESE 00140	3.4	0.2	6.5	0.3	ND	-	9.28 × 10 ⁴	2.68 × 10 ³	4755	13	4–12	

(continued on next page)

Table 3 (continued)

Abiotic factor	Species	X_{min}	$\pm SD$	X_{opt}	$\pm SD$	X_{max}	$\pm SD$	μ_{opt}	$\pm SD$	SSE	RMSE	Measurable growth limits	
a_w (NaCl)	<i>L. lagenoides</i> ^C UBOCC-A-120038	3.9	0.1	6.3	0.3	ND	–	7.88×10^4	1.35×10^3	1253	7	4–12	
	<i>L. lagenoides</i> ^C UBOCC-A-120039 ^{NT}	3.4	0.2	6.4	0.4	ND	–	9.28×10^4	3.14×10^3	6418	15	4–12	
	<i>L. lagenoides</i> ^C UBOCC-A-120041	3.7	0.2	5.9	0.4	ND	–	9.27×10^4	2.45×10^3	3547	11	4–12	
	<i>B. dimerum</i> ^{NC} IHEM-2314	1.9	0.3	6.8	0.3	ND	–	1.13×10^5	3.06×10^3	7297	15	3–12	
	<i>B. dimerum</i> ^{NC} IHEM-10066	2.5	0.1	5.9	0.2	ND	–	9.89×10^4	1.63×10^3	2587	9	3–12	
	<i>B. dimerum</i> ^{NC} IHEM-14513	1.5	0.4	6.6	0.3	ND	–	8.71×10^4	1.76×10^3	3259	10	3–12	
	<i>B. dimerum</i> ^{NC} MNHN-RF-05625 ^{ET}	2.8	0.3	4.9	1.0	ND	–	1.05×10^5	2.63×10^3	17,544	18	3–12	
	<i>B. dimerum</i> ^{NC} UBOCC-A-110149	2.7	0.1	6.0	0.4	ND	–	8.31×10^4	2.27×10^3	4260	12	3–12	
	<i>B. allantoides</i> ^C UBOCC-A-120035	0.87	0.01	–	–	–	–	5.73×10^4	6.05×10^3	21,272	30	0.91–0.98	
	<i>B. allantoides</i> ^C UBOCC-A-120036 ^{NT}	0.87	0.01	–	–	–	–	7.20×10^4	6.62×10^3	20,284	29	0.91–0.98	
	<i>B. allantoides</i> ^C UBOCC-A-120037	0.86	0.01	–	–	–	–	7.38×10^4	5.80×10^3	15,176	25	0.91–0.98	
	<i>B. domesticum</i> ^C MNHN-RF-05627 ^{NT}	0.96	0.00	–	–	–	–	7.54×10^4	1.53×10^3	156	4	0.97–0.98	
	<i>B. domesticum</i> ^C UBOCC-A-120002	0.96	0.00	–	–	–	–	6.53×10^4	8.11×10^3	1703	15	0.97–0.98	
	<i>B. domesticum</i> ^C UBOCC-A-120001	0.93	0.00	–	–	–	–	5.13×10^4	4.84×10^3	3579	17	0.95–0.98	
	a_w (NaCl)	<i>B. domesticum</i> ^C UBOCC-A-120003	0.96	0.00	–	–	–	–	6.58×10^4	3.20×10^3	273	6	0.97–0.98
		<i>B. domesticum</i> ^C UBOCC-A-120004	0.97	–	–	–	–	–	(5.14×10^4)	–	39	3	0.98
		<i>B. penicilloides</i> ^C UBOCC-A-120021 ^{NT}	0.90	0.01	–	–	–	–	7.06×10^4	7.96×10^3	14,487	30	0.93–0.98
<i>B. penicilloides</i> ^C UBOCC-A-120034		0.90	0.01	–	–	–	–	7.52×10^4	6.33×10^3	12,088	25	0.93–0.98	
<i>B. penicilloides</i> ^C VTT-D-041022		0.91	0.01	–	–	–	–	7.43×10^4	7.21×10^3	14,787	28	0.93–0.98	
<i>L. lagenoides</i> ^C ESE 00140		0.96	0.00	–	–	–	–	8.05×10^4	7.01×10^3	1063	12	0.97–0.98	
<i>L. lagenoides</i> ^C UBOCC-A-120038		0.96	–	–	–	–	–	(3.28×10^4)	–	867	15	0.98	
<i>L. lagenoides</i> ^C UBOCC-A-120039 ^{NT}		0.96	0.00	–	–	–	–	5.91×10^4	7.28×10^3	1556	14	0.97–0.98	
<i>L. lagenoides</i> ^C UBOCC-A-120041		0.97	0.00	–	–	–	–	7.70×10^4	1.13×10^4	2934	19	0.97–0.98	
<i>B. dimerum</i> ^{NC} IHEM-2314		0.88	0.00	–	–	–	–	8.72×10^4	5.55×10^3	11,813	22	0.91–0.98	
<i>B. dimerum</i> ^{NC} IHEM-10066		0.88	0.00	–	–	–	–	7.50×10^4	3.68×10^3	6022	16	0.91–0.98	
<i>B. dimerum</i> ^{NC} IHEM-14513		0.86	0.00	–	–	–	–	6.67×10^4	2.17×10^3	2341	10	0.91–0.98	
<i>B. dimerum</i> ^{NC} MNHN-RF-05625 ^{ET}		0.89	0.00	–	–	–	–	8.56×10^4	4.14×10^3	11,140	19	0.93–0.98	
<i>B. dimerum</i> ^{NC} UBOCC-A-110149		0.87	0.00	–	–	–	–	6.91×10^4	3.58×10^3	6168	16	0.91–0.98	

Minimal (X_{min}), optimal (X_{opt}) and maximal (X_{max}) values and optimal growth rates (μ_{opt} , expressed in Relative Nephelometric Unit/h) for fungal growth are represented for each tested abiotic factor. Standard deviation (SD) was calculated from confidence interval values. ND corresponds to values that could not be estimated by the model. SSE (Sum of the Squared Error) and RMSE (Root Mean Square Error) were estimated during secondary modeling. The measurable growth limits are the minimum and maximum values for which growth was detected in the tested conditions. C: cheese-associated, NC: “non-cheese”.

(22.1 and 31.7%, respectively) and a slight one for *B. bisseptatum*, *B. dimerum* and *B. lunatum* (16.4%; 19.6% and 5.1% respectively) were observed. Conversely, for *B. nectrioides*, the μ_{opt} increased by 31.4% (4.6 mm/day on cheese agar vs. 3.5 mm/day on PDA). As for Raclette de Savoie cheese, compared to PDA medium, growth rates of *B. bisseptatum*, *B. delphinoides*, *B. lunatum* and *B. penzigii* showed a 48.8 to 54.5% decrease while they were 39.1% and 22.9%, for *B. dimerum* and

B. nectrioides, respectively.

4. Discussion

Species pertaining to the *Nectriaceae* family are associated with a wide variety of biotopes. Indeed, while some species have been reported to be associated to natural environment (e.g. soil, plants), others are

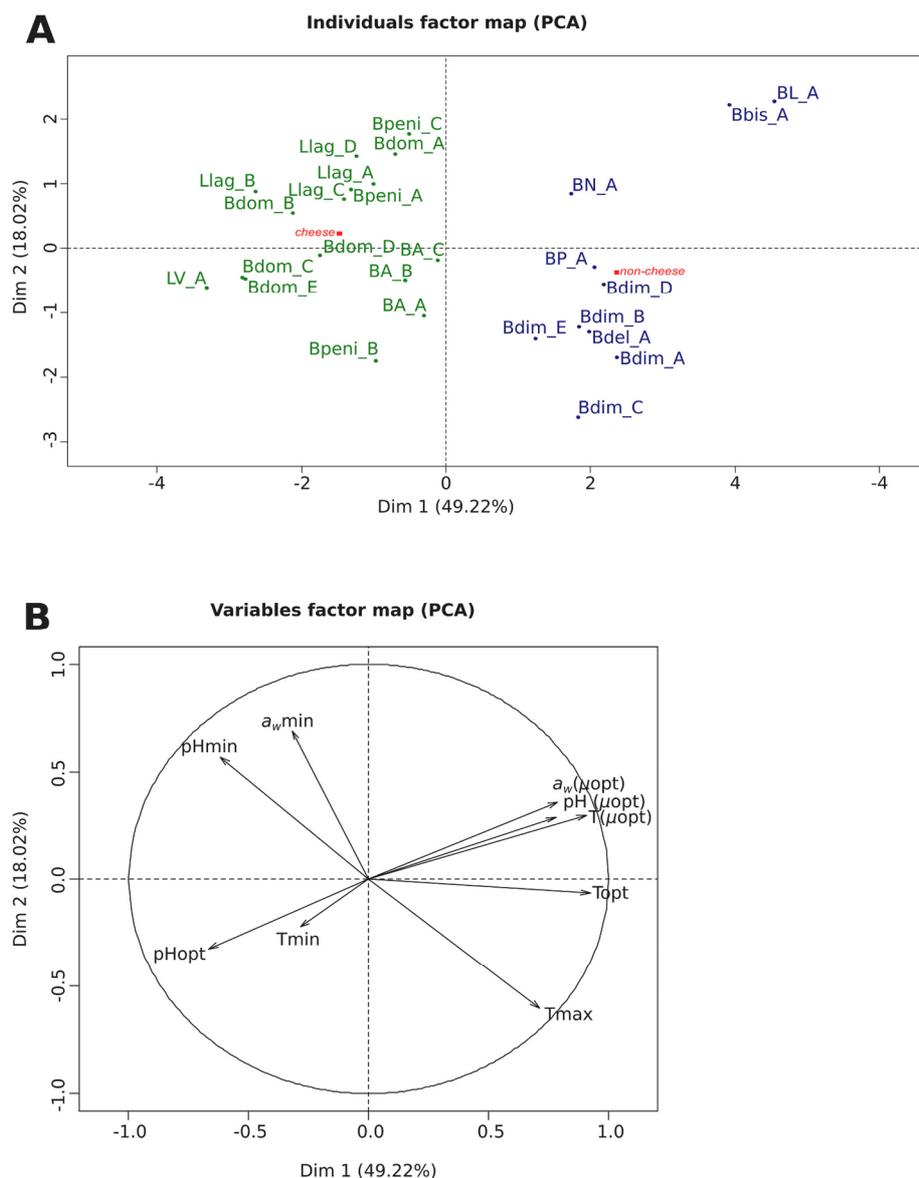
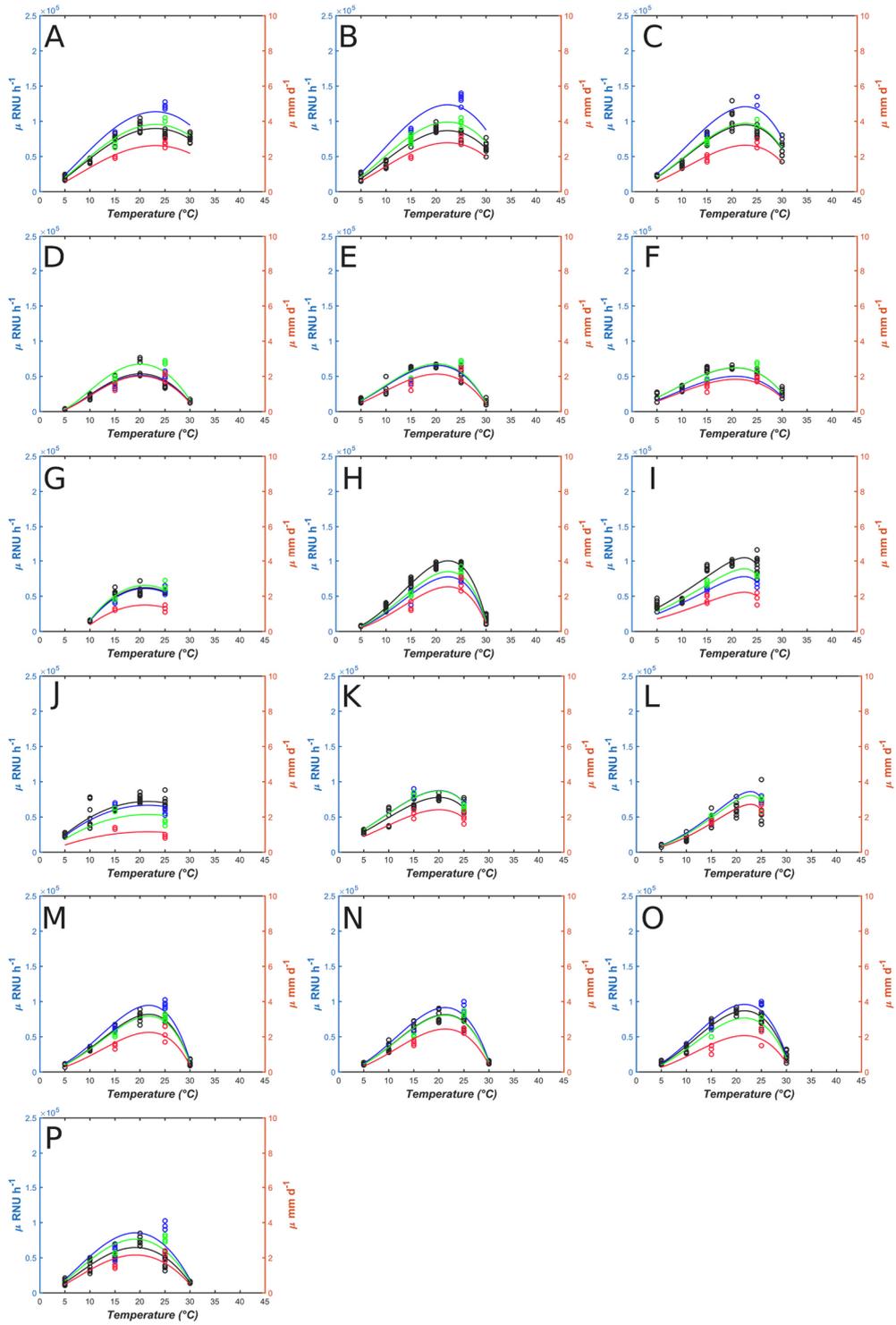


Fig. 4. Principal component analysis on nine estimated parameters (i.e. T_{min} , T_{max} , $T_{(\mu opt)}$, pH_{min} , pH_{opt} , $pH_{(\mu opt)}$, $a_w min$, $a_w (\mu opt)$) for the 26 studied *Nectriaceae* isolates. Individuals factor map (A) and Variables factor map (B) are represented, and the colors correspond to the cheese-associated species (green) and “non-cheese” species (blue). Samples are noted with the following abbreviations “Bbis_A”, “Bdel_A”, “BL_A”, “BN_A”, “BP_A” corresponding to *B. bisepatum* CBS 110311, *B. delphinoides* CBS 120718, *Bipalium lunatum* CBS 632.76, *B. nectrioides* CBS 176.31 and *B. penzigii* CBS 317.34. “Bdim_A”, “Bdim_B”, “Bdim_C”, “Bdim_D”, “Bdim_E” corresponding to *B. dimerum* IHEM-2314, IHEM-10066, IHEM-14513, MNHN-RF-05625, UBOCC-A-110149 respectively, “Bdom_A”, “Bdom_B”, “Bdom_C”, “Bdom_D”, “Bdom_E” corresponding to *B. domesticum* MNHN-RF-05627, UBOCC-A-120001, UBOCC-A-120002, UBOCC-A-120003, UBOCC-A-120004 respectively. “BA_A”, “BA_B”, “BA_C” corresponding to *B. allantoides* UBOCC-A-120035, UBOCC-A-120036, UBOCC-A-120037, “Bpeni_A”, “Bpeni_B”, “Bpeni_C” corresponding to *B. penicilloides* UBOCC-A-120021, UBOCC-A-120034, VTT-D-041022, “Llag_A”, “Llag_B”, “Llag_C”, “Llag_D” corresponding to *L. lagenoides* ESE00140, UBOCC-A-120038, UBOCC-A-120039 and “LV_A” corresponding to *L. verticilliforme* UBOCC-A-120043. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

emerging or invasive species causing infections in immunocompromised patients but also immunocompetent humans, and are mainly associated with eye infections (Schroers et al., 2009). However, a small number of species have also been associated with the cheese environment (Savary et al., 2021). Among the latter, *B. domesticum* has been used for decades for daily productions of some washed-rind cheeses due to its

“anticollanti” ability that prevents cheese rind stickiness. Yet, despite its industrial use, information on this species is scarce. Other species, namely *B. allantoides* sp. nov., *B. penicilloides* sp. nov., *L. lagenoides* gen. nov. sp. nov. and *L. verticilliforme* gen. nov. sp. nov., were recently isolated from diverse cheeses (Savary et al., 2021) although their potential origin and role have not yet been elucidated. As these five species have



(caption on next page)

Fig. 5. Secondary growth models obtained for the studied cheese-associated *Nectriaceae* isolates for temperature on PDA, cheese agar medium and Raclette de Savoie. Maximal growth rates estimated at 15 and 25 °C on PDA (blue), cheese agar (green) and Raclette de Savoie (red) were fitted applying the estimated cardinal values on the nephelometric data (black). Models A to P respectively corresponds to *B. allantoides* UBOCC-A-120035, *B. allantoides* UBOCC-A-120036^{NT}, *B. allantoides* UBOCC-A-120037, *B. domesticum* UBOCC-A-120001, *B. domesticum* UBOCC-A-120002, *B. domesticum* UBOCC-A-120003, *B. domesticum* UBOCC-A-120004, *B. domesticum* MNHN-RF-05627^{NT}, *B. penicilloides* VTT-D-041022, *B. penicilloides* UBOCC-A-120034, *B. penicilloides* UBOCC-A-120021^{NT}, *L. lagenoides* UBOCC-A-120038, *L. lagenoides* UBOCC-A-120039^{NT}, *L. lagenoides* UBOCC-A-120041, *L. lagenoides* ESE-00140 and *L. verticilliforme* UBOCC-A-120043^{NT}. Dots correspond to no observable growth in the tested conditions. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

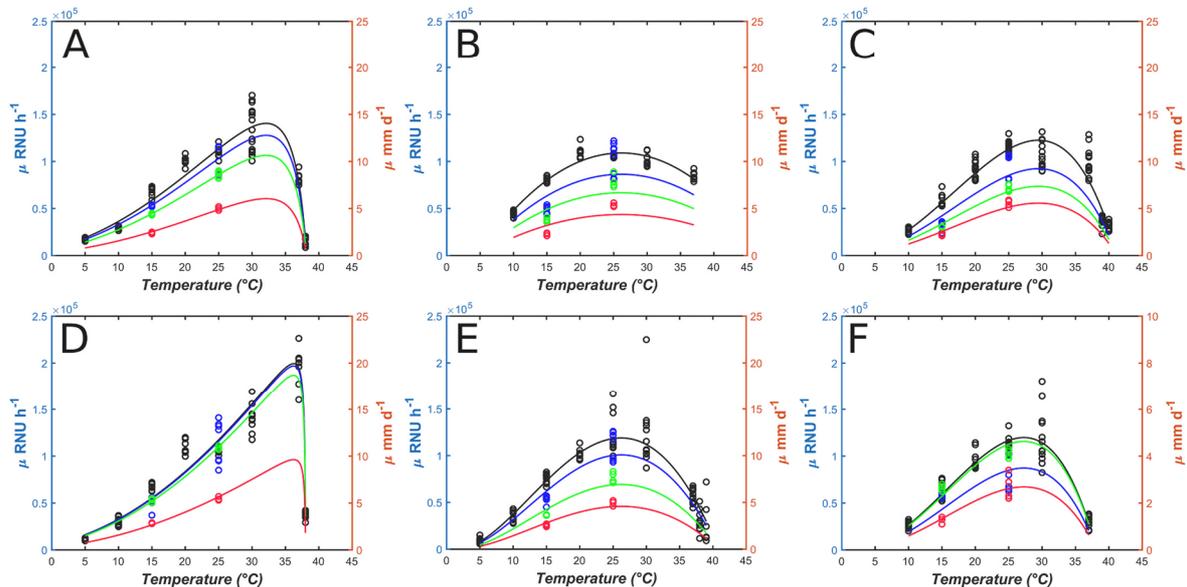


Fig. 6. Secondary growth models obtained for “non-cheese” *Bisifusarium* spp. type strains for temperature on PDA, cheese agar medium and Raclette de Savoie. Maximal growth rates estimated at 15.0 and 25.0 °C on PDA (blue), cheese agar (green) and Raclette de Savoie (red) were fitted applying the cardinal values estimated on the nephelometric data (black); Models A to F respectively corresponds to *B. biseptatum* CBS 110311^T, *B. delphinoides* CBS 120718^{HT}, *B. dimerum* MNHN-RF-05625^{ET}, *Bipalium lunatum* CBS 632.76^{NT}, *B. penzigii* CBS 317.34^{HT}, *B. nectrioides* CBS 176.31^{LT}. The dots correspond to a growth not observed in the tested conditions. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

solely been isolated from cheeses to date, questions concerning their potential adaptation to this environment arise.

In this context, this study aimed at determining the impact of cheese-relevant abiotic factors and diverse media on fungal growth of these cheese-associated species. We also compared them to “non-cheese” but phylogenetically close species. Growth kinetics for nine *Bisifusarium* and two *Longinectria* species were thus determined.

Acquiring physiological data for fungal growth modeling can be done using different methods ranging from classical radial growth measurements on solid media, to more high throughput methods (Aunsbjerg et al., 2015; Joubert et al., 2010; Medina et al., 2012; Sardella et al., 2018). In the context of this study, we first applied a high throughput discontinued microplate laser nephelometry method, which has already been successfully used to monitor fungal growth (Joubert et al., 2010; Lecomte et al., 2012), to investigate the impact of cheese relevant abiotic factors corresponding also to those classically used to describe microbial growth, namely temperature, pH and a_w (using NaCl as a depressor as notable concentrations are added for cheese production). Preliminary studies were performed to ensure that the nephelometric method could be applied under these experimental conditions to efficiently monitor fungal growth over time using discontinuous measurements (data not shown), thus allowing for simultaneous monitoring of a much larger number of fungal strains in multiple conditions (data not shown). It should be noted that, while this method is much faster and more sensitive than classical radial growth measurements, it does have

some limits. Laser nephelometry uses an arbitrary unit that could be considered difficult to link to radial growth, which is considered as the most biologically relevant criterion. Nevertheless, a linear relationship between conidiogenesis and the nephelometric signal was already described (Joubert et al., 2010) and it can be argued that the systematic use of the optimal growth rate as the reference parameter should preclude any bias. Moreover, it can be difficult or even not possible to use the substrate (or a mimicking-medium) from which a specimen was isolated as this method requires the use of a culture medium enabling light scattering measurements. This explains why in the framework of this study, in a second time, radial growth measurements were also used to compare growth on cheese matrices, namely a cheese-mimicking medium (cheese agar) and Raclette de Savoie core (a cheese in which *B. domesticum* is commonly used as a rind adjunct culture) in comparison to PDA medium.

For primary modeling, several models are frequently applied to model bacterial or fungal growth. They include the logistic function, asymmetric model, Baranyi model and modified Gompertz equation (Dagnas and Membré, 2013; Kosegarten et al., 2017; Tjørve and Tjørve, 2017). The latter has already been shown to be more robust (Declercq et al., 2001) than the others and, after a preliminary model comparison using our data, the modified Gompertz equation had the best fitting (data not shown) and was therefore applied.

Concerning the impact of abiotic factors on fungal growth, the obtained results revealed common intraspecific growth patterns and

Table 4
Optimal growth rate (μ_{opt}) estimated on PDA, Cheese agar and Raclette de Savoie for the studied *Nectriaceae* isolates.

Species	Isolates	Media	μ_{opt}	\pm SD	RMSE	%
<i>B. allantoides</i> ^C	UBOCC-A-120035	PDA	4.5	0.2	0.1	
		Cheese agar	3.8	0.2	0.1	-15.6
		Raclette	2.6	0.1	0.1	-42.2
<i>B. allantoides</i> ^C	UBOCC-A-120036 ^T	PDA	4.9	0.2	0.1	
		Cheese agar	4.0	0.1	0.1	-18.4
		Raclette	2.8	0.2	0.1	-42.9
<i>B. allantoides</i> ^C	UBOCC-A-120037	PDA	4.8	0.3	0.2	
		Cheese agar	3.9	0.1	0.1	-18.8
		Raclette	2.6	0.1	0.1	-45.8
<i>B. domesticum</i> ^C	MNHN-RF-05627 ^{NT}	PDA	3.1	0.1	0.1	
		Cheese agar	3.4	0.1	0.1	+9.7
		Raclette	2.5	0.3	0.2	-19.4
<i>B. domesticum</i> ^C	UBOCC-A-120001	PDA	2.1	0.2	0.1	
		Cheese agar	2.7	0.2	0.1	+28.6
		Raclette	2.0	0.2	0.2	-4.8
<i>B. domesticum</i> ^C	UBOCC-A-120002	PDA	2.6	0.3	0.2	
		Cheese agar	2.7	0.3	0.2	+3.8
		Raclette	2.1	0.2	0.2	-19.2
<i>B. domesticum</i> ^C	UBOCC-A-120003	PDA	2.0	0.0	0.0	
		Cheese agar	2.5	0.2	0.1	+25.0
		Raclette	1.8	0.1	0.1	-10.0
<i>B. domesticum</i> ^C	UBOCC-A-120004	PDA	2.5	0.1	0.1	
		Cheese agar	2.6	0.1	0.1	+4.0
		Raclette	1.5	0.1	0.1	-40.0
<i>B. penicilloides</i> ^C	UBOCC-A-120021 ^T	PDA	3.5	0.1	0.1	
		Cheese agar	3.5	0.1	0.1	0.0
		Raclette	2.4	0.1	0.1	-31.4
<i>B. penicilloides</i> ^C	UBOCC-A-120034	PDA	2.7	0.2	0.1	
		Cheese agar	2.2	0.2	0.2	-18.5
		Raclette	1.2	0.1	0.1	-55.6
<i>B. penicilloides</i> ^C	VTT-D-041022	PDA	3.1	0.1	0.1	
		Cheese agar	3.6	0.1	0.0	+16.1
		Raclette	2.3	0.2	0.1	-25.8
<i>L. lagenoides</i> ^C	ESE 00140	PDA	3.8	0.3	0.1	
		Cheese agar	3.1	0.2	0.1	-18.4
		Raclette	2.1	0.2	0.2	-44.7
<i>L. lagenoides</i> ^C	UBOCC-A-120038	PDA	3.5	0.1	0.0	
		Cheese agar	3.2	0.1	0.1	-8.6
		Raclette	2.7	0.1	0.1	-22.9
<i>L. lagenoides</i> ^C	UBOCC-A-120039 ^T	PDA	3.8	0.1	0.1	
		Cheese agar	3.2	0.1	0.1	-15.8
		Raclette	2.3	0.2	0.1	-39.5
<i>L. lagenoides</i> ^C	UBOCC-A-120041	PDA	3.7	0.3	0.2	
		Cheese agar	3.2	0.3	0.1	-13.5
		Raclette	2.4	0.2	0.1	-35.1
<i>L. verticilliforme</i> ^C	UBOCC-A-120043 ^T	PDA	3.4	0.3	0.3	
		Cheese agar	3.1	0.2	0.2	-8.8
		Raclette	2.2	0.3	0.2	-35.3

Species	Isolates	Media	μ_{opt}	\pm SD	RMSE	%
<i>B. bisseptatum</i> ^{NC}	CBS 110311 ^T	PDA	12.8	0.3	0.2	
		Cheese agar	10.7	0.1	0.0	-16.4
		Raclette	6.1	0.1	0.0	-52.3
<i>B. delphinooides</i> ^{NC}	CBS 120718 ^{HT}	PDA	8.6	0.5	0.3	
		Cheese agar	6.7	0.5	0.3	-22.1
		Raclette	4.4	0.5	0.3	-48.8
<i>B. dimerum</i> ^{NC}	MNHN-RF-05625 ^{ET}	PDA	9.2	0.5	0.3	
		Cheese agar	7.4	0.2	0.1	-19.6
		Raclette	5.6	0.3	0.1	-39.1
<i>B. lunatum</i> ^{NC}	CBS 632.76 ^{NT}	PDA	19.7	0.8	0.2	
		Cheese agar	18.7	0.2	0.0	-5.1
		Raclette	9.6	0.2	0.0	-51.3
<i>B. nectrioides</i> ^{NC}	CBS 176.31 ^{LT}	PDA	3.5	0.2	0.2	
		Cheese agar	4.6	0.2	0.1	+31.4
		Raclette	2.7	0.2	0.1	-22.9
<i>B. penzigii</i> ^{NC}	CBS 317.34 ^{HT}	PDA	10.1	0.4	0.2	
		Cheese agar	6.9	0.3	0.2	-31.7
		Raclette	4.6	0.2	0.1	-54.5

Optimal growth rates (μ_{opt}) (expressed in mm/days) for fungal growth are represented for each tested medium. The standard deviation (SD) was calculated from confidence interval values. RMSE (Root Mean Square Error) were estimated during secondary modeling. The impact on the μ_{opt} of cheese agar or Raclette vs PDA were calculated and highlighted in the column " μ_{opt} " in purple, red, orange, yellow for a reduction $\geq 40.0\%$, between 40.0% and 20.0% , between 20.0% and 10.0% , between 10.0% and 0.0% , respectively and green for no impact or increase. C: cheese-associated, NC: non-cheese.

interspecific differences among *Bisifusarium* spp. and *Longinectria* spp. The most contrasted behaviors were related to temperature. Indeed, *B. allantoides*, *B. domesticum*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* and *L. verticilliforme*, that are to this date the only known *Nectriaceae* species associated to cheese, were better adapted to low temperatures than the six "non-cheese" *Bisifusarium* spp.. Indeed, *B. domesticum* MNHN-RF-05627^{NT} had the significantly lowest T_{opt} (22.4 ± 0.2 °C) and T_{max} (30.6 ± 0.1 °C) among the *Bisifusarium* genus and the same observation was done on the four other isolates. Regarding the other eleven isolates of cheese-associated *Nectriaceae* spp. nov., similar T_{opt} were observed, in the 19.1–23.1 °C range. Moreover, the performed statistical analyses highlighted that the T_{opt} and T_{max} of cheese-associated *Nectriaceae* spp. were highly significantly lower than those of "non-cheese" *Bisifusarium* spp. (p value ≤ 0.001), this can be linked to their better adaptation to a cheese environment. Interestingly, *B. allantoides*, *B. domesticum*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* and *L. verticilliforme* (all isolates studied) were the only species for which no growth was observed in the tested conditions at temperatures higher than 30.0 °C and no growth was even observed at this temperature for all *B. penicilloides* isolates and *L. lagenoides* UBOCC-A-120038. This is of particular interest as the observed values are compatible with temperatures used during cheese making and ripening. On the other hand, *B. bisseptatum*, *B. delphinooides*, *B. lunatum*, *B. nectrioides* and *B. penzigii* (type strains) grew at 37.0 °C (with a slightly higher estimated T_{max} between 38.0 °C and 40.9 °C, Table 2) and the five *B. dimerum* isolates even grew at 40.0 °C (e.g. T_{max} 41.9 ± 0.5 °C for MNHN-RF-05625^{ET}). This thermotolerance is compatible with a higher potential to colonize the human body and can explain why these species are observed to be human opportunistic pathogens. Interestingly, the obtained data were highly concordant with those described by Schroers et al. (2009) based on radial growth measurements on malt extract agar media. Indeed, T_{opt} between 21.0 °C and 24.0 °C were estimated for *B. domesticum*, and between 24.0 °C and 30.0 °C for *B. nectrioides* while it was between 27.0 °C and 30.0 °C for all other *Bisifusarium* spp.. The only discordance between the two studies concerns *B. lunatum* CBS 632.76 for

which, our data led to a higher estimated optimum value (36.2 ± 0.4 °C on PDB vs. 27.0–30.0 °C on malt extract agar). Similarly, the impact of temperature on *B. dimerum* growth was also investigated in another previous study using optical density and the optimal temperature was determined to be between 35.0 °C and 37.0 °C using minimal medium (Steinberg et al., 2015). Moreover, observed growth limits for *B. allantoides*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* and *L. verticilliforme* (Table 2, Table 3) were concordant with those reported on PDA by Savary et al. (2021). The similarity of the obtained results between radial growth and nephelometry confirmed the interest of this high throughput method to determine fungal growth cardinal values. Concerning the minimal temperature, *B. allantoides*, *B. domesticum*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* and *L. verticilliforme* isolates but also *B. bisseptatum* CBS 110311, *B. lunatum* CBS 632.76 and *B. penzigii* CBS 317.34, were able to grow at 5.0 °C in contrast to *B. delphinooides* CBS 120718, *B. dimerum* MNHN-RF-05625 and *B. nectrioides* CBS 176.31 that no longer grew in these experimental conditions, even after one month. This led to wider confidence intervals for estimated T_{min} . In fact, the difficulty to study low temperatures and the absence of intermediate values in the experimental design between detectable and undetectable growth conditions is a limit of secondary modeling, because zero values cannot be appended to the dataset although some species are really sensitive to low temperature variations. The same problem was observed for the estimated T_{max} for the *B. delphinooides* CBS 120718^{HT}, *B. domesticum* UBOCC-A-120004 and *B. penicilloides* isolates which were probably over-estimated and explained by the lack of intermediate values between good growth and absence of growth. Therefore, one of the limits that can be classically encountered in modeling is based on the experimental design adopted which can induce for some isolates, very distant values not allowing for an optimal model fit. As a result, the model cannot always be used to infer the distal values of the curve.

Regarding the impact of pH on *Nectriaceae* spp. growth, no major differences were observed between species with nevertheless a significantly higher pH_{min} and pH_{opt} for the cheese-associated *Bisifusarium* and

Longinectria spp. (e.g. pH_{min} 3.7 ± 0.1 and pH 6.7 ± 0.4 , respectively for *B. domesticum* MNHN-RF-05627^{NT}) compared to the “non-cheese” species (p values ≤ 0.001 and 0.01 respectively). The latter six *Bisifusarium* spp. type strains were able to grow in a wide range of pH values (pH 3.0–12.0) with, overall, only a minor impact on growth rates between pH 5.0 and pH 10.0. Noteworthy, as expected, *B. domesticum* and other cheese-associated species growth at pH values classically measured in brines or on cheeses (pH 5.0–6.0) (Guinee and Fox, 2017; Mounier et al., 2017) was confirmed.

Water activity is a factor with high impacts on fungal growth (Pitt and Hocking, 2009). In this study, a_w was modified by sodium chloride as it is commonly used as a cheese ingredient not only for its flavor enhancing ability, but also for food preservation (Guinee, 2004; Nguyen Van Long et al., 2017). As already demonstrated on several filamentous fungi, this study highlighted that a decrease in a_w induced a significant decrease in *Bisifusarium* and *Longinectria* spp. growth rates with different effects depending on the considered species. The “non-cheese” species presented the lowest estimated a_{wmin} values (slightly significant, p value ≤ 0.01) although *B. allantoides*, *B. dimerum*, *B. penzigii* and *B. delphinoides* presented the highest halotolerance (a_{wmin} 0.86–0.89, corresponding to minimum $\sim 15.0\%$ NaCl). For *B. domesticum*, although highly associated with cheese, the growth limit was estimated at $\sim 7.0\%$ NaCl (a_{wmin} 0.96) except for *B. domesticum* UBOCC-A-120001 for which a_{wmin} was estimated at 0.93 ($\sim 8.5\%$) and UBOCC-A-120004 which only grew up to $\sim 3.0\%$ NaCl, with an estimated a_{wmin} at 0.97 ($\sim 6.0\%$ NaCl). Similar halotolerance was observed for *Longinectria* spp. isolates with a_{wmin} estimated between 0.96 and 0.97. Finally, *B. penicilloides* spp. isolates presented higher halotolerance with a_{wmin} 0.91–0.90 (corresponding to minimum $\sim 13.0\%$ NaCl). Although *B. allantoides* seems more adapted to high salt concentration, overall, the cheese-associated species were not the most halotolerant, but their growth range in the tested conditions is compatible with NaCl concentrations encountered during cheese making (overall 1.1–2.5% in ripening conditions) (Guinee and Fox, 2017; Mounier et al., 2017). Noteworthy, for the same water activity values, using glycerol as an a_w depressor, a lower impact on growth was observed for all *B. bisepatum*, *B. delphinoides*, *B. dimerum*, *B. domesticum*, *B. lunatum*, *B. nectrioides* and *B. penzigii* type strains (data not shown). This has been regularly observed for other fungi (Morin-Sardin et al., 2016; Nguyen Van Long et al., 2017) and is linked to the toxicity of Na⁺ and Cl⁻ ions, and to the ionic strength increase which can alter enzyme activities (Bois et al., 2006; Morita et al., 2004).

The second part of this study was performed on cheese matrices and investigated growth on cheese-mimicking medium (cheese agar) and actual Raclette de Savoie cheese for *Bisifusarium* and *Longinectria* species compared to growth on PDA. This was performed for the cheese-associated species ($n = 16$ isolates) and the type strains of the “non-cheese” *Bisifusarium* species ($n = 6$) at 15.0 °C and 25.0 °C. Overall, it should be noted that all tested species and isolates, including the “non-cheese” ones, were able to grow on the tested media. On cheese agar, *B. allantoides*, *L. lagenoides* and *L. verticilliforme* grew slightly slower than on PDA (μ_{opt} decrease between 8.6 and 18.8%), while for *B. penicilloides* isolates, the optimal growth rate decreased for one isolate or was unchanged or increased for the two others. Interestingly, for *B. domesticum* isolates, the μ_{opt} were considerably higher on this medium, in particular for two isolates (UBOCC-A-120001 and UBOCC-A-120003; +28.6 and +25.0%, respectively). As for the “non-cheese” species, a decrease was noted between 5.1% and 31.7% (overall, slightly higher negative impact than for cheese-associated species), except for *B. nectrioides* which grew better on cheese agar than on PDA ($\mu_{opt} + 31.4\%$). As for Raclette de Savoie, *B. allantoides*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* and *L. verticilliforme* had an important μ_{opt} decrease (22.9–55.6%). *B. bisepatum*, *B. delphinoides*, *B. dimerum*, *B. lunatum* and *B. penzigii* grew faster than other *Nectriaceae* species on cheese as well as on the two other media, but despite that, comparing growth on Raclette de Savoie to that on PDA, they seemed less adapted to this matrix (μ_{opt} decreased by 22.9 to 54.5%). Interestingly, for *B. domesticum*, although slower growth was

observed on cheese compared to PDA, members of this species appeared less impacted by growth on Raclette de Savoie (μ_{opt} decreased by only 4.8 to 19.4%), except for one isolate (UBOCC-A-120004, -40.0%).

A recurrent problem associated with modeling approaches is that they often rely on monitoring growth of a single strain per species. This clearly raises questions about the representativeness of the selected strain and therefore of the obtained results. Thereby, the use of several strains with different isolation origins and/or genetic profiles for a given species is crucial to obtain robust and reliable results that can be considered as representative of a species physiology. For this reason, we performed, when possible, the analyses on various isolates for the cheese-associated species (and for *B. dimerum* as an outgroup, for nephelometry method only). As previously stated, analysis of the secondary models and cardinal values confirmed similar profiles within each species, with low variability regardless of the approach used (laser nephelometry in liquid medium or radial growth on solid medium). Noteworthy, among the *B. penicilloides* isolates, VTT-D-041022 was the only isolate not isolated from cheese but from the outer surface of an Abbey in Scotland (Suihko et al., 2007), and despite that, it presented the same growth profiles as the two other *B. penicilloides* isolates for the nephelometry study and was the least impacted isolate within the species by a growth on cheese agar and Raclette de Savoie.

In conclusion, the obtained results provide new physiological insights on cheese-associated *Nectriaceae* spp. but also closely related *Bisifusarium* spp. for which knowledge is still scarce. For these former, growth characteristics were concordant with cheese making and ripening conditions. Noteworthy, *B. domesticum* seemed better adapted to the cheese matrix. Beyond new knowledge, the obtained data could be useful for optimizing *B. domesticum* use as a cheese adjunct or even of the novel *Nectriaceae* spp.. In the future, it would also be of interest to evaluate the cheese-associated species functional diversity and impact on cheese matrices (e.g. flavor compounds, proteolytic and lipolytic activities).

Funding

OS benefited from a Ph. D grant from the Région Bretagne and the French Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation. This work was co-funded by the French Dairy Interbranch Organization (CNIEL) (DIFUS Project, 2019_00627).

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Jeanne Ropars (Laboratoire Écologie, Systématique et Évolution, Université Paris-Saclay) for providing isolates as well as all the people who kindly provided the various cheeses samples to implement the *B. domesticum* isolate collection used for RAPD analyses. We would also like to thank members of the French Dairy Interbranch Organization (CNIEL), in particular, Laurence Abraham from Entremont and the Lactalis R&D team for kindly providing Raclette de Savoie and cheese agar ingredients.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109509>.

References

- Aunsbjerg, S.D., Andersen, K.R., Knöchel, S., 2015. Real-time monitoring of fungal inhibition and morphological changes. *J. Microbiol. Methods* 119, 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.10.024>.
- Bachmann, H.-P., Bobst, C., Büttikofer, U., Casey, M.G., Torre, M., Fröhlich-Wyder, M.-T., Fuerst, M., 2005. Occurrence and significance of fusarium domesticum alias anticollanti on smear-ripened cheeses. *Lebensm. Wiss. Technol.* 38, 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.05.018>.
- Bachmann, H.-P., Bobst, C., Büttikofer, U., Dalla, M., Fröhlich-Wyder, M.-T., Fuerst, M., 2003. Sticky cheese smear and natural white mould. *Milchwissenschaft* 58, 117–232.
- Bois, G., Bertrand, A., Piché, Y., Fung, M., Khasa, D.P., 2006. Growth, compatible solute and salt accumulation of five mycorrhizal fungal species grown over a range of NaCl concentrations. *Mycorrhiza* 16, 99–109. <https://doi.org/10.1007/s00572-005-0020-y>.
- Collado, C., Medina, L., Zorraquino, A., Baeza, T., Ferrer, C., Plazas, J., Colom, M.F., 2013. Cutaneous fusariosis by a species of the fusarium dimerum species complex in a patient with acute myeloblastic leukemia. *Rev. Iberoam. Micol.* 30, 119–121. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2012.11.001>.
- Crous, P.W., Lombard, L., Sandoval-Denis, M., Seifert, K.A., Schroers, H.-J., Chaverri, P., Gené, J., Guarro, J., Hirooka, Y., Thines, M., 2021. Fusarium: more than a node or a foot-shaped basal cell. *Stud. Mycol.* 98, 100116 <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2021.100116>.
- Dagnas, S., Membre, J.-M., 2013. Predicting and preventing mold spoilage of food products. *J. Food Prot.* 76, 538–551. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-349>.
- Declerck, S., D'Or, D., Cranenbrouck, S., Le Boulengé, É., 2001. Modelling the sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi in monoxenic culture. *Mycorrhiza* 11, 225–230. <https://doi.org/10.1007/s005720100124>.
- do Carmo, A., Costa, E., Marques, M., Quadrado, M.J., Tomé, R., 2016. Fusarium dimerum species complex (Fusarium penzigii) keratitis after corneal trauma. *Mycopathologia* 181, 879–884. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0060-1>.
- Flores-Flores, R., Velázquez-del Valle, M.G., León-Rodríguez, R., Flores-Moctezuma, H. E., Hernández-Lauzardo, A.N., 2013. Identification of fungal species associated with cladode spot of prickly pear and their sensitivity to chitosan. *J. Phytopathol.* 161, 544–552. <https://doi.org/10.1111/jph.12104>.
- Geisen, R., Cantor, M.D., Hansen, T.K., Holzapfel, W.H., Jakobsen, M., 2001. Characterization of penicillium roqueforti strains used as cheese starter cultures by RAPD typing. *Int. J. Food Microbiol.* 65, 183–191. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00514-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00514-6).
- Geiser, D.M., Al-Hatmi, A., Aoki, T., Arie, T., Balmas, V., Barnes, I., Bergstrom, G.C., Bhattacharyya, M.K.K., Blomquist, C.L., Bowden, R., Brankovics, B., Brown, D.W., Burgess, L.W., Bushley, K., Busman, M., Cano-Lira, J.F., Carrillo, J.D., Chang, H.-X., Chen, C.-Y., Chen, W., Chilvers, M.L., Chulze, S.N., Coleman, J.J., Cuomo, C.A., de Beer, Z.W., de Hoog, G.S., Del Castillo-Múnera, J., Del Ponte, E., Diéguez-Urbeondo, J., Di Pietro, A., Edel-Hermann, V., Elmer, W.H., Epstein, L., Eskalen, A., Esposito, M.C., Everts, K.L., Fernández-Pavía, S.P., da Silva, G.F., Foroud, N.A., Fourie, G., Frandsen, R.J.N., Freeman, S., Freitag, M., Frenkel, O., Fuller, K.K., Gagkaeva, T., Gardiner, D.M., Glenn, A.E., Gold, S., Gordon, T., Gregory, N.F., Gryzenhout, M., Guarro, J., Gugino, B., Gutiérrez, S., Hammond-Kosack, K., Harris, L.J., Homa, M., Hong, C.-F., Hornok, L., Huang, J.-W., Ilkit, M., Jacobs, A., Jacobs, K., Jiang, C., Jimenez-Gasco, M.D.M., Kang, S., Kasson, M.T., Kazan, K., Kennell, J.C., Kim, H., Kistler, H.C., Kuldau, G.A., Kulik, T., Kurzal, O., Laraba, I., Laurence, M.H., Lee, T.Y., Lee, Y.-W., Lee, Y.-H., Leslie, J.F., Liew, E.C.Y., Lofton, L. W., Logrieco, A., Sánchez López-Berges, M., Luque, A.G., Lysøe, E., Ma, L.-J., Marra, R.E., Martin, F.N., May, S.R., McCormick, S., McGee, C.T., Meis, J.F., Migheli, Q., Mohamed Nor, N.M.L., Monod, M., Moretti, A., Mostert, D., Mulé, G., Munaut, F., Munkvold, G.P., Nicholson, P., Nucci, M., O'Donnell, K., Pasquali, M., Pfennig, L.H., Prigiano, A., Proctor, R., Ranque, S., Rehner, S., Rep, M., Rodríguez-Alvarado, G., Rouse, L.J., Roth, M.G., Ruiz-Roldán, C., Saleh, A.A., Salleh, B., Sang, H., Scandiani, M., Scauflaire, J., Schmale, D., Short, D.P., Šišić, A., Smith, J., Smyth, C. W., Son, H., Spahr, E., Stajich, J.E., Steenkamp, E., Steinberg, C., Subramaniam, R., Suga, H., Summerell, B.A., Susca, A., Swett, C.L., Toomajian, C., Torres-Cruz, T.J., Tortorano, A.M., Urban, M., Vaillancourt, L.J., Vallad, G.E., van der Lee, T., Vanderpool, D., van Diepeningen, A.D., Vaughan, M., Venter, E., Vermeulen, M., Verweij, P.E., Viljoen, A., Waalwijk, C., Wallace, E.C., Walther, G., Wang, J., Ward, T., Wickes, B., Wiederhold, N.P., Wingfield, M.J., Wood, A.K.M., Xu, J.-R., Yang, X.B., Yli-Matilla, T., Yun, S.-H., Zakaria, L., Zhang, H., Zhang, N., Zhang, S., Zhang, X., 2021. Phylogenomic analysis of a 55.1 kb 19-gene dataset resolves a monophyletic Fusarium that includes the Fusarium solani species complex. *Phytopathology* 111 (7), 1064–1079. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-20-0330-LE>.
- Gryzenhout, M., Fouché, H.J., Swart, W.J., 2017. First report of a serious cladode disease of Opuntia ficus-indica (Prickly Pear) in South Africa caused by bisfusarium lunatum. *Plant Dis.* 101, 2148. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-17-0377-PDN>.
- Guinee, T.P., 2004. Salting and the role of salt in cheese. *Int. J. Dairy Technol.* 57, 99–109. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00145.x>.
- Guinee, T.P., Fox, P.F., 2017. Chapter 13 - salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. In: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W. (Eds.), *Cheese*, Fourth edition. Academic Press, San Diego, pp. 317–375. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00013-2>.
- Hassan, A.S., Al-Hatmi, A.M.S., Shobana, C.S., van Diepeningen, A.D., Kredics, L., Vágvolgyi, C., Homa, M., Meis, J.F., de Hoog, G.S., Narendran, V., Manikandan, P., IHFK Working Group, 2016. Antifungal susceptibility and phylogeny of opportunistic members of the genus Fusarium causing Human keratomycosis in South India. *Med. Mycol.* 54, 287–294. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv105>.
- Joubert, A., Calmes, B., Berruyer, R., Pihet, M., Bouchara, J.-P., Simoneau, P., Guillemette, T., 2010. Laser nephelometry applied in an automated microplate system to study filamentous fungus growth. *Biotechniques* 48, 399–404. <https://doi.org/10.2144/000113399>.
- Kosegarten, C.E., Ramírez-Corona, N., Mani-López, E., Palou, E., López-Malo, A., 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. *Int. J. Food Microbiol.* 240, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.024>.
- Kulkarni, G., Sajjan, S., Karegoudar, T.B., 2011. Pathogenicity of indole-3-acetic acid producing fungus fusarium delphinoides strain GPK towards chickpea and pigeon pea. *Eur. J. Plant Pathol.* 131, 355–369. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9813-3>.
- Lecomte, M., Berruyer, R., Latifa, H., Boedo, C., Hudhomme, P., Bersihand, S., Arul, J., Nguyen Quang, G., Gatto, J., Guilet, D., Richomme, P., Simoneau, P., Briard, M., Le Clerc, V., Poupard, P., 2012. Inhibitory effects of the carrot metabolites 6-methoxymellein and falcariindiol on development of the fungal leaf blight pathogen Alternaria dauci. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 80, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2012.10.002>.
- Lombard, L., van der Merwe, N.A., Groenewald, J.Z., Crous, P.W., 2015. Generic concepts in nectriaceae. In: *Studies in Mycology, Hypocrealean Lineages of Industrial and Phytopathological Importance*, 80, pp. 189–245. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.12.002>.
- Medina, A., Lambert, R.J.W., Magan, N., 2012. Rapid throughput analysis of filamentous fungal growth using turbidimetric measurements with the bioscreen C: a tool for screening antifungal compounds. *Fungal Biol.* 116, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.11.001>.
- Mongiardino Koch, N., Soto, I.M., Galvagno, M., Hasson, E., Iannone, L., 2015. Biodiversity of cactophilic microorganisms in western Argentina: community structure and species composition in the necroses of two sympatric cactus hosts. *Fungal Ecol.* 13, 167–180. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.10.001>.
- Morin-Sardin, S., Rigalma, K., Coroller, L., Jany, J.-L., Coton, E., 2016. Effect of temperature, pH, and water activity on mucor spp. Growth on synthetic medium, cheese analog and cheese. *Food Microbiol.* 56, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.11.019>.
- Morita, H., Yoshikawa, H., Suzuki, T., Hisamatsu, S., Kato, Y., Sakata, R., Nagata, Y., Yoshimura, T., 2004. Anti-microbial action against verotoxigenic Escherichia coli O157:H7 of nitric oxide derived from sodium nitrite. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1027–1034. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.1027>.
- Mounier, J., Coton, M., Irlinger, F., Landaud, S., Bonnarpe, P., 2017. Chapter 38 - smear-ripened cheeses. In: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W. (Eds.), *Cheese*, Fourth edition. Academic Press, San Diego, pp. 955–996. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00038-7>.
- Nguyen Van Long, N., Rigalma, K., Coroller, L., Dadure, R., Debaets, S., Mounier, J., Vasseur, V., 2017. Modelling the effect of water activity reduction by sodium chloride or glycerol on conidial germination and radial growth of filamentous fungi encountered in dairy foods. *Food Microbiol.* 68, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.06.014>.
- Park, J.-H., Oh, J., Song, J.-S., Kim, J., Sung, G.-H., 2019. Bisfusarium delphinoides, an emerging opportunistic pathogen in a burn patient with diabetes mellitus. *Mycobiology* 47, 340–345. <https://doi.org/10.1080/12298093.2019.1628521>.
- Pinon, A., Zwietering, M., Perrier, L., Membre, J.-M., Lepoq, B., Mettler, E., Thuault, D., Coroller, L., Stahl, V., Viallette, M., 2004. Development and validation of experimental protocols for use of cardinal models for prediction of microorganism growth in food products. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1081–1087. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.1081-1087.2004>.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2009. *Fungi and Food Spoilage*. Springer Science & Business Media.
- Ray, R., Ghosh, M., Chatterjee, M., Chatterjee, N., Banerjee, M., 2016. Onychomycosis caused by fusarium dimerum. *J. Clin. Sci. Res.* 5, 44–48. <https://doi.org/10.15380/2277-5706.JCSR.14.062>.
- Ropars, J., Craud, C., Lacoste, S., Dupont, J., 2012. A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. *Int. J. Food Microbiol.* 155, 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.005>.
- Rosso, L., Lobry, J., Charles, S.(Bajard), Flandrois, J.-P., 1995. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 610–616. <https://doi.org/10.1128/AEM.61.2.610-616.1995>.
- Rosso, L., Lobry, J.R., Flandrois, J.P., 1993. An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. *J. Theor. Biol.* 162, 447–463. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1993.1099>.
- Salah, H., Al-Hatmi, A., Theelen, B.J.F., Abukamar, M., Hashim, S., van Diepeningen, A., Las-Floer, C., Boekhout, T., Almaslamani, M., Taj-Aldeen, S., 2015. Phylogenetic diversity of human pathogenic fusarium and emergence of uncommon virulent species. *J. Infect.* 71. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.08.011>.
- Sardella, D., Gatt, R., Valdramidis, V.P., 2018. Assessing the efficacy of zinc oxide nanoparticles against penicillium expansum by automated turbidimetric analysis. *Mycology* 9, 43–48. <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1369187>.
- Savary, O., Coton, M., Frisvad, J.C., Nodet, P., Ropars, J., Coton, E., Jany, J.-L., 2021. Unexpected Nectriaceae species diversity in cheese, description of Bisfusarium allantoides sp. nov., Bisfusarium penicillioides sp. nov., Longinetria gen. nov. lagenoides sp. nov. and Longinetria verticilliforme sp. nov. *Mycosphere* 12 (1), 1077–1100. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/12/1/13>.
- Schroers, H.-J., O'Donnell, K., Lamprecht, S.C., Kammeier, P.L., Johnson, S., Sutton, D. A., Rinaldi, M.G., Geiser, D.M., Summerbell, R.C., 2009. Taxonomy and phylogeny of

- the fusarium dimerum species group. *Mycologia* 101, 44–70. <https://doi.org/10.3852/08-002>.
- Simon, L., Gastaud, L., Martiano, D., Bailleux, C., Haseine, L., Gari-Toussaint, M., 2018. First endogenous fungal endophthalmitis due to fusarium dimerum: a severe eye infection contracted during induction chemotherapy for acute leukemia. *J. Mycol. Med.* 28, 403–406. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.01.002>.
- Steinberg, C., Laurent, J., Edel-Hermann, V., Barbezant, M., Sixt, N., Dalle, F., Aho, S., Bonnin, A., Hartemann, P., Sautour, M., 2015. Adaptation of fusarium oxysporum and fusarium dimerum to the specific aquatic environment provided by the water systems of hospitals. *Water Res.* 76, 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.036>.
- Suihko, M.-L., Alakomi, H.-L., Gorbushina, A., Fortune, I., Marquardt, J., Saarela, M., 2007. Characterization of aerobic bacterial and fungal microbiota on surfaces of historic scottish monuments. *Syst. Appl. Microbiol.* 30, 494–508. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2007.05.001>.
- Sun, B.-D., Zhou, Y.-G., Chen, A., 2017. Bisifusarium tonghuanum (Nectriaceae), a novel species of fusarium-like fungi from two desert oasis plants. *Phytotaxa* 317, 123. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.317.2.4>.
- Tjørve, K., Tjørve, E., 2017. The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: an addition to the unified-Richards family. *PLoS ONE* 12, e0178691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178691>.
- Trunet, C., Mtimet, N., Mathot, A.-G., Postollec, F., Leguerinel, I., Sohier, D., Couvert, O., Carlin, F., Coroller, L., 2015. Modeling the recovery of heat-treated *Bacillus licheniformis* Ad978 and *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores at suboptimal temperature and pH using growth limits. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 562–568. <https://doi.org/10.1128/AEM.02520-14>.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., van 't Riet, K., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875–1881.

Supplementary data

Table S1: *B. domesticum* strains used on RAPD study.

Species	Strain code	Substrate/Host of origin
<i>B. domesticum</i>	MNHN RF-03342	Cheese (Saint-Nectaire, France)
	MNHN RF-05627 ^{NT}	Food (Belgium)
	MNHN-RF-05628	Food (Switzerland)
	MUCL-38933	Cheese (Saint-Nectaire, France)
	MUCL-38934	Cheese (Saint-Nectaire, France)
	MUCL-39198	Unknown (France)
	NNRL 37582	Unknown
	UBOCC-A-109095	Cheese-maker environment (France)
	UBOCC-A-117075	Cheese (France)
	UBOCC-A-113010	Unknown (France)
	UBOCC-A-120001	Commercial adjunct culture (Switzerland)
	UBOCC-A-120002	Commercial adjunct culture (France)
	UBOCC-A-120003	Cheese (Raclette d'alpage, Switzerland)
	UBOCC-A-120004	Commercial adjunct culture (France)
	UBOCC-A-120005	Commercial adjunct culture (France)
	UBOCC-A-120006	Commercial adjunct culture (France)
	UBOCC-A-120007	Commercial adjunct culture (France)
	UBOCC-A-120008	Cheese (Saint-Nectaire, France)
	UBOCC-A-120009	Cheese (Raclette d'alpage, Switzerland)
	UBOCC-A-120010	Cheese (Vacherin Fribourgeois, Switzerland)
	UBOCC-A-120011	Cheese (Alpeggio, Italy)
	UBOCC-A-120012	Cheese (Saint-Nectaire, France)
	UBOCC-A-120013	Cheese (Mont d'Or, France)
ESE-00042	Ewe cheese (France)	
ESE-00064	Cow cheese (France)	

^{NT}neotype strain. MNHN: Muséum National d'Histoire Naturelle, France ; MUCL: Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain, Belgium; NNRL : Agricultural Research Service Culture Collection, USA; UBOCC: Université de Bretagne Occidentale Culture Collection, France ; ESE : Laboratoire Ecologie Systématique Evolution, Université Paris Saclay, France.

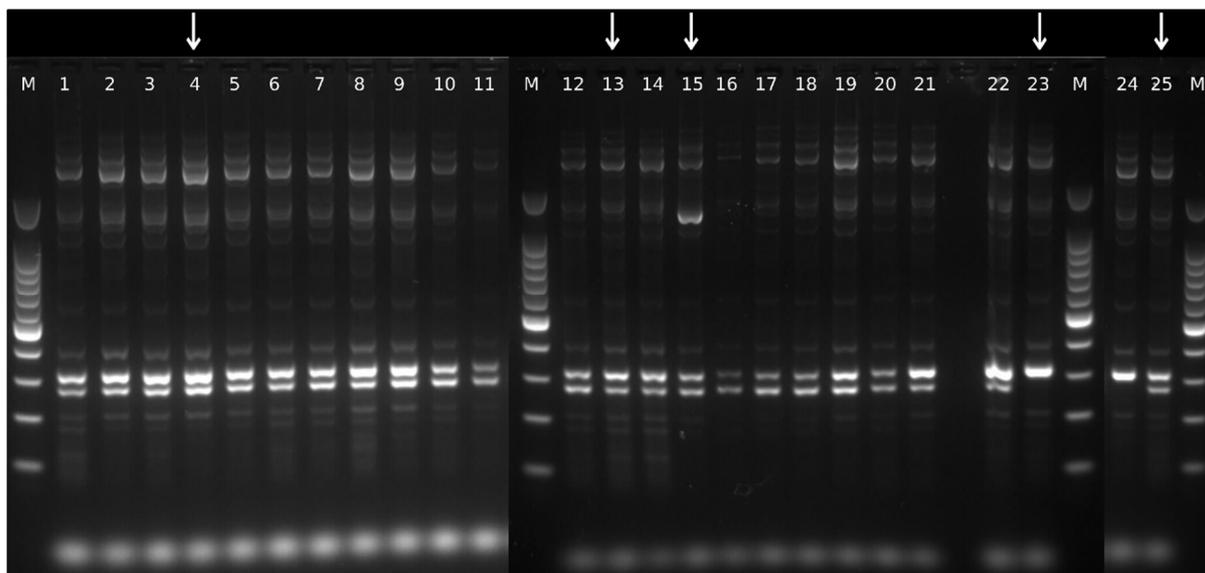


Figure S1. *ari1* RAPD genetic profiles of the 25 *B. domesticum* strains included in this study.

Lanes 1 to 25, *B. domesticum* strains UBOCC-A-117075, UBOCC-A-109095, MNHN RF-03342, MNHN RF-05627, MNHN RF-05628, MUCL 38934, MUCL 39198, MUCL 38933, UBOCC-A-120005, UBOCC-A-120006, UBOCC-A-120007, NRRL 37582, UBOCC-A-120002, UBOCC-A-120008, UBOCC-A-120003, UBOCC-A-120009, UBOCC-A-120010, UBOCC-A-120011, UBOCC-A-120012, UBOCC-A-120013, ESE-00042, ESE-00064, UBOCC-A-120004, UBOCC-A-113010, UBOCC-A-120001. M: size ladder (100 bp ladder, Promega). Selected isolates for the intraspecific study are highlighted by an arrow.

III. Résultats majeurs du chapitre II

Pour ce deuxième chapitre, on peut résumer les résultats majeurs comme suit :

- Obtention de données (**valeurs cardinales de croissance** en fonction de la **température**, du **pH** et du **NaCl**) **jusqu'alors inexistantes** pour les espèces *B. allantoides*, *B. biseptatum*, *B. delphinoïdes*, *B. dimerum*, *B. domesticum*, *B. lunatum*, *B. nectrioides*, *B. penicilloïdes*, *B. penzigii*, *L. lagenoides* et *L. verticilliforme*
- **Etude intraspécifique** permet une **meilleure représentativité** des résultats obtenus pour une espèce considérée
- **Association entre température optimale de croissance et habitat**, les espèces *Nectriaceae* associées au fromage présentent les températures optimales les plus basses avec une croissance observée à 5°C et pas au-delà de 30°C, quand les espèces « pathogènes humains » ont des températures optimales les plus élevées avec une croissance observée jusqu'à 40°C pour *B. dimerum*
- Croissance de tous les isolats *Bisifusarium* spp. et *Longinectria* spp. sur les milieux fromagers mais celle des *Bisifusarium* spp. non associées au fromages est très ralentie sur la Raclette de Savoie par rapport au PDA, quand celle de *B. domesticum* n'est pas ou peu impactée sur "cheese agar" et Raclette de Savoie. L'espèce *B. domesticum* est **la plus adaptée pour une croissance sur fromage.**

Chapitre III : Etude fonctionnelle

I. Introduction et stratégie expérimentale

Les deux précédents chapitres ont mis en évidence de possibles caractères d'adaptation à l'environnement fromager, principalement pour *B. domesticum* mais aussi pour les quatre nouvelles espèces isolées de cet environnement. On peut à présent se questionner quant à l'impact de leur métabolisme dans le contexte fromager. En effet, *B. domesticum*, qui est à ce jour la seule espèce de *Nectriaceae* utilisée en fabrication fromagère, a été initialement mise en évidence pour sa propriété anti-collante observée par Bachmann et al. (2003). Toutefois, le mécanisme *anticollanti* n'est toujours pas connu à ce jour, et tandis que la commercialisation du ferment *B. domesticum* par Agroscope indique clairement son utilisation en ce sens, le ferment proposé par le LIP et Mycodore destine *B. domesticum* à une utilisation en tant que ferment pour « moisissure Saint-Nectaire », un fromage que l'on sait caractérisé également par la présence de *Mucor* spp.. On peut vraisemblablement penser que *B. domesticum* a un rôle organoleptique sur ce type de fromage en formant notamment l'aspect blanc poudreux visible sur Saint-Nectaire, Reblochon ou encore sur certaines Tommes. Cependant, on peut naturellement poser la question suivante : **Quelles sont les propriétés fonctionnelles présentées par *B. domesticum* ?** La présence des nouvelles espèces interroge également, d'autant plus considérant le fait que l'aspect visuel et aromatique des fromages les abritant ne présentaient pas de signes d'altération, c'est pourquoi, comme indiqué précédemment, nous avons également inclus ces espèces dans le cadre de cette étude fonctionnelle. Dans ce cadre, les activités enzymatiques importantes au cours de l'affinage que sont la lipolyse et la protéolyse ont été évaluées ainsi que la production de composés volatiles, qui est par ailleurs étroitement liée à ces activités. Pour cette dernière, des croissances de 25 jours à 12°C ont été effectuées sur le milieu synthétique mimant le fromage (i.e. "cheese agar") pour les cinq espèces (pour un total de seize isolats) et sur la Raclette de Savoie (non affinée) uniquement pour les cinq isolats de *B. domesticum*. Ces conditions ont été sélectionnées sur la base d'une étude préliminaire effectuée sur deux isolats (*B. domesticum* MNHN-RF-05627 et *B. allantoides* UBOCC-A-120036) dans laquelle la variation de certains paramètres avait permis d'observer *i)* un bon regroupement des échantillons par isolat et par milieu de culture ("cheese agar" et Raclette de Savoie), *ii)* une production de davantage de composés par l'isolat de *B. domesticum*, *iii)* peu de différences de profils de production entre 15 et 25 jours d'incubation, *iv)* peu/pas de différence de production entre une inoculation en tapis et dans la masse et *v)* davantage de composés produits sur "cheese agar" que sur Raclette de Savoie. Enfin, le potentiel de production de métabolites

secondaires a également été évalué par LC-Q-TOF de façon exploratoire. L'ensemble de ces études fait l'objet d'une publication en préparation (**publication n°3**) présentée dans la partie II. du présent chapitre.

D'autre part, nous nous sommes également interrogés sur une autre propriété d'intérêt dans un contexte fromager que pourrait présenter *B. domesticum* : la capacité de bioprotection, qui pourrait par ailleurs, en partie, expliquer cette propriété *anticollanti* en inhibant la croissance d'autres espèces bactériennes ou fongiques altérant les fromages.

Enfin, comme indiqué précédemment, tandis que le genre *Fusarium* est identifié comme l'un des genres fongiques produisant le plus de mycotoxines (e.g. trichothecenes, deoxynivalenol, fumosines), l'espèce *B. domesticum* a été décrite comme atoxinogène dans la littérature (Bachmann et al., 2005). Ainsi, du fait du peu de données disponibles à ce jour sur *B. domesticum*, et bien entendu sur les quatre nouvelles espèces il semblait nécessaire de s'en assurer en termes d'innocuité. Ainsi, dans le cadre de cette étude fonctionnelle, la production de mycotoxines a été recherchée, d'une part lors des analyses effectuées en HPLC-DAD (par le Pr. Jens Frisvad du DTU) et en LC-Q-TOF présentées dans les **publications n°1 et n°3**. Cependant, la production de mycotoxines pouvant dépendre des conditions de culture des champignons, afin de compléter ces résultats une étude génomique ciblée a été entreprise via l'application de l'outil « *antibiotics and Secondary Metabolites Analysis Shell* » Fungal antiSMASH (v6.0) (Blin et al., 2021) qui recherche la présence de clusters de gènes de biosynthèse de métabolites secondaires dont certains peuvent correspondre à des mycotoxines.

II. Article en préparation pour soumission au journal Food Microbiology

Savary O., Coton E., Maillard M-B., Gaucheron F., Thierry A., Jany J-L, Coton M., Functional diversity of *B. domesticum* and the newly described cheese-associated *Nectriaceae* species, *B. allantoides*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* and *L. verticilliforme*. **Manuscript en préparation pour soumission au journal Food Research International.**

Le journal "*Food Research International*" a un "impact factor" de 6,475.

Functional diversity of *Bisifusarium domesticum* and the newly described cheese-associated *Nectriaceae* species, *B. allantoides*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* and *L. verticilliforme*.

Océane Savary^a, Emmanuel Coton^a, Marie-Bernadette Maillard^b, Frédéric Gaucheron^c, Anne Thierry^b, Jean-Luc Jany^a and Monika Coton^{a*}

^a*Univ Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne, F-29280 Plouzané, France*

^b*INRAE, Institut Agro, STLO, F-35000 Rennes, France*

^c*CNIEL, Maison du Lait, 75009 Paris, France*

Running title: Functional diversity of cheese-associated *Nectriaceae* spp.

*Corresponding author: Dr. Monika COTON, monika.coton@univ-brest.fr

HIGHLIGHTS

- Higher proteolytic activity at 12°C for several *B. domesticum* isolates.
- Identification of volatile compounds associated with cheese odor descriptors.
- Higher volatile compound production by *B. domesticum* and *B. penicilloides*.

ABSTRACT

Recently, new cheese-associated species belonging to the *Nectriaceae* family, along with the already well-known technological cheese species *Bisifusarium domesticum*, have been identified from different cheeses. The four novel species include *Bisifusarium allantoides*, *Bisifusarium penicilloides*, *Longinectria lagenoides*, and *Longinectria verticilliforme*. Beyond the known *B. domesticum* “*anticollanti*” property (prevent the sticky smear defect of some cheeses), other organoleptic properties that may impact overall cheese quality during production and ripening have hardly been explored for these species. In this context, this study aimed at determining the functional diversity of various isolates belonging to these five cheese-associated *Nectriaceae* spp., by determining their lipolytic and proteolytic activities as well as their volatilome (HS-Trap GC-MS) and non-volatile extrolite profiles (LC-Q-ToF). Interestingly, while all isolates were proteolytic and lipolytic, higher activities were observed at 12°C (cheese ripening conditions) for several *B. domesticum*, *B. penicilloides* and *L. lagenoides* isolates. Volatilomics analysis identified multiple cheese-related compounds, especially ketones and alcohols. *B. domesticum* and *B. penicilloides* isolates showed higher aromatic potential although compounds of interest were also produced by *B. allantoides* and *L. lagenoides*. Finally, an untargeted extrolite analysis highlighted the safety status of these strains as no mycotoxins were produced as well as the potential production of novel secondary metabolites.

Keywords: *Nectriaceae*, cheese, proteolyse, lipolyse, volatilome, extrolites

1. Introduction

According to the literature, cheese appeared more than 8 000 years ago in the region of the “Fertile Crescent” during the “Agricultural Revolution” (Fox and Guinee, 2020) and recent studies confirmed its historical production and consumption (e.g. cheese footprints observed from proteomic analyses of material from Egyptian tombs from the XIX dynasty -1290–1213 B.C.- Greco et al., 2018). Historically produced via spontaneous fermentation, during the last decades, cheese-making is better controlled by human intervention. With more than 1 500 varieties worldwide, exhibiting a multitude of flavors, odors, textures and colors (Fox et al., 2017), cheese is among the most popular and consumed fermented foods in the world. Moreover, cheese is also of particular interest for food microbiologists as it contains a highly diversified microbiota ever evolving during fermentation but also between the cheese core and surface (Penland et al., 2021; Wolfe et al., 2014). Cheese ecology, in which many bacterial and fungal species intervene, has been the subject of a large number of studies (e.g. Dugat-Bony et al., 2016; Hermet et al., 2014; Marino et al., 2019; Penland et al., 2021; Wolfe et al., 2014; Yeluri Jonnala et al., 2018). Fungal species are frequently used by cheesemakers or isolated from cheese, such as *Penicillium roqueforti* for blue-veined cheeses (e.g. Roquefort or Gorgonzola) (Coton et al., 2020) and *P. camemberti* in the case of bloomy rind cheeses (e.g. Camembert and Brie) (Dupont et al., 2017). Both species have been extensively studied in terms of genotypes and phenotypes (Caron et al., 2021; Dumas et al., 2020; Ropars et al., 2020) and are of particular interest as intraspecific functional variability has been observed among strains belonging to the different genetic populations. This can also be linked to how they potentially influence the organoleptic qualities of the final product and thus used for future strain selection.

Among the key fungal metabolic activities in cheese, proteolysis and lipolysis are important as they directly impact cheese aspect and texture but also contribute to flavor development by releasing metabolites or precursors (e.g. free amino acids, free fatty acids and peptides) involved in volatile compound production (McSweeney, 2017; Spinnler, 2017; Thierry et al.,

2017). Another aspect is the ability of these fungi to produce extrolites (i.e. secondary metabolites), including mycotoxins, which can raise strain safety questions. Understandably so, these traits have already been studied in some cheese-related fungal species, especially *P. roqueforti* and *P. camemberti*. For *P. roqueforti*, various phenotypic traits (e.g. lipolysis, proteolysis, color, volatile compounds, extrolite production, growth on bread, cheese, salt tolerance) were shown to be associated with the intraspecific diversity of strains belonging to the described genetic populations (Caron et al., 2021; Dumas et al., 2020; Gillot et al. 2017). All of these traits can have a strong influence on blue-veined cheese organoleptic qualities (Caron et al., 2021; Martín and Coton, 2017). The same thing can be said for *P. camemberti*, a species presenting less genetic diversity, for which two varieties (*P. camemberti* var. “*camemberti*” and var. “*caseifulvum*”) exhibiting contrasted phenotypic features in terms of color, growth, extrolite production, and competitive ability were identified (Ropars et al., 2020). Beyond the two mentioned emblematic *Penicillium* species, other mold species are also of interest during cheese-making but have not benefited from the same extensive research. This is the case for *Mucor lanceolatus* and *M. fuscus*, associated with Tomme de Savoie and Saint-Nectaire (Hermet et al., 2012), *Sporendonema casei*, associated with Cantal and Salers (Ropars et al., 2012), but also *Bisifusarium domesticum*. Interestingly, the latter species, which belongs to the *Nectriaceae* family, is used daily by cheesemakers as a ripening culture, in particular, for its ability to prevent surface stickiness of some smear-ripened cheeses (e.g. Raclette, Tilsit) (Bachmann et al., 2003; 2005), hence its “*anticollanti*” name, but also for the typical moldy rind aspect it creates for various other cheeses (e.g. Saint-Nectaire, Reblochon). Recently, we observed an unexpected diversity of multiple *Nectriaceae* species from diverse cheeses, which led to the description of four novel cheese-associated species, namely *Bisifusarium allantoides* and *Bisifusarium penicilloides*, *Longinectria lagenoides*, and *Longinectria verticilliforme* (Savary et al., 2021), the latter two belonging to a novel genus. An in-depth physiological study was performed on these species and highlighted distinct growth patterns suggesting their adaptation to the cheese environment (Savary et al., 2022). However,

to date there is still a major gap in knowledge to fully understand the role of these species in cheese.

In this context, the aim of this study was to evaluate the functional diversity of several isolates belonging to all five cheese-associated *Nectriaceae* spp. by investigating their lipolytic and proteolytic activities, volatilome from cultures on a cheese-mimicking medium and Raclette de Savoie cheese and their ability to produce extrolites, including mycotoxins.

2. Materials and methods

2.1. Nectriaceae isolate selection

For *B. allantoides* (n=3), *B. domesticum* (n=5), *B. penicilloides* (n=3), *L. lagenoides* (n=4) and *L. verticilliforme* (n=1), isolates were selected based on their availability in culture collections, except for *B. domesticum* isolates selected based on Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) profiles (Savary et al., 2022) (Table 1). Monospores were prepared in all cases prior to experimental use.

2.2. Conidia production

For conidia production, each fungal isolate was pre-cultured for ten days at 25°C on Potato dextrose agar (PDA, Difco, Fisher Scientific), then two mL of Tween 80 (0.015 %, v/v) were added on the surface of each culture to collect a conidia suspension. Conidia were counted in Malassez cells and suspensions adjusted to 10⁷ conidia/mL and conserved in 10 % (v/v) glycerol.

2.3. Lipolytic and proteolytic activities investigation

Lipolytic and proteolytic activities were determined based on Ozturkoglu-Budak et al. (2016) and Dumas et al. (2020). Briefly, 10 mL tributyrin agar (5 g/L peptone, 3 g/L yeast extract, 15 g/L agar, 10 mL/L tributyrin - ACROS, Organics -) and skim milk agar (100 g/L skim milk -

Difco, Fisher Scientific -, 20 g/L agar and 10 g/L yeast extract) were prepared in glass tubes. Skim milk agar was prepared by first autoclaving the skim milk separately at 104°C for ten min, while the other components were autoclaved at 121°C for 15 min. The two parts were then homogenized for one min using an Ultraturrax (IKA, Heidelberg, Germany) and then distributed in sterile glass tubes.

All sixteen isolates were studied as well as *P. roqueforti* FM164, as a positive control. Spores suspensions were adjusted to 10⁵ conidia/mL in Tween 80 (0.015 % v/v) and 25 µL were inoculated on the medium surface (or Tween 80 - 0.015% v/v - for negative control) and incubated at 12°C and 25°C. Three replicates were performed for each condition. Lipolytic and proteolytic activities were then monitored every two to three days, during a minimum of 24 days, by measuring the clear zone that formed just under the fungal culture.

2.4. Volatile profiling by headspace gas chromatography-mass spectrometry.

For volatile profiling, all isolates (n=16) were inoculated on cheese agar (pH 4.7 ± 0.01 adjusted with lactic acid) as described by Morin-Sardin et al. (2016) with the following modifications: no HCl addition and 3 mL lactic acid instead of 5.6 mL. Additionally, uniquely for the *B. domesticum* isolates, inoculation was performed on an industrial unripened Raclette de Savoie cheese (~pH 5.4) slices prepared using the same procedure as Savary et al. (2022). Cultures (three replicates) were performed by spreading 100 µL of 10⁵ conidia/mL suspensions (or Tween 0.015 % v/v as a negative control) and incubated at 12°C for 25 days. After this duration, 2.5 ± 0.02 g samples were transferred into 22 mL Perkin Elmer vials sealed with polytetrafluoroethylene/silicone septa and stored at -80 °C until analysis. Volatile compounds were extracted by headspace (HS) trap coupled to gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) using a Perkin Elmer Turbomatrix HS-40 trap automatic headspace sampler with trap enrichment and a Clarus 680 gas chromatograph coupled to a Clarus 600 T quadrupole mass spectrometer (PerkinElmer, France), as previously described (Pogačić et al., 2015), with modifications of the chromatographic conditions according to Harlé et al. (2020). Samples were

injected in a random order. Volatile compounds were identified by comparing their retention index (RI) and mass spectra, from the NIST 2008 Mass Spectral Library (Scientific Instrument Services, Ringoes, NJ, United States), and those reported in the literature but also, when available, with those of standards (Sigma Aldrich, France) analyzed in the same conditions.

Data were analyzed using R software (R Core Team, 2019). A principal component analysis (PCA) was first performed to identify the main trends and ensure that no aberrant samples were observed (one out of three replicates of the *B. domesticum* MNHN-RF-05627 isolate on Raclette de Savoie was removed due to a different macroscopic aspect). To highlight volatile differences between isolates, analysis of variance (ANOVA) and mean comparison were performed on data transformed in \log_{10} , to identify compounds that significantly increased or decreased in abundance compared to the negative control. Then, data were centered and scaled by compound and hierarchically clustered by Ward's minimum variance method, and Euclidean distance metric with the *hclust* R function before being plotted by the *heatmap.2* function of R *ggplots* package.

2.5. Metabolite profiling by liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (LC-Q-TOF)

All studied isolates were inoculated using 5 μL of 10^6 conidia/mL suspensions onto Yeast Extract Sucrose Agar (YES, pH 5.2) and skim milk agar plates (two replicates), and incubated for fourteen days at 25°C. Then, five six mm plugs were removed from the agar colonies for extraction with ethyl acetate / isopropanol (3:1) containing 1 % (v/v) formic acid using ultrasonication for 60 min. Extracts were then resuspended in 300 μL methanol and sonicated for 20 min before being filtered (0.45 μm , PTFE) into amber vials and conserved at -20°C until analysis. Each extract was analyzed by injecting five μL into a HPLC 1260 coupled to a 6530 Accurate-Mass quadrupole-time-of flight mass spectrometry Q-TOF (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with a dual electrospray ionization source (Agilent Technologies,

Santa Clara, CA). Molecules were separated using a ZORBAX Extend-C18 column (2.1 x 50 mm and 1.8 μm , 600 bars) equipped with a guard column and analytes were ionized in positive electrospray ionization (ESI+) mode in a scan range of 50 to 1700 m/z and 2 scan/s. The column was maintained at 35°C with a flow rate set to 0.2 mL/min. Mobile phases were as follows: LC-MS grade water containing 0.1% formic acid (solvent A) and methanol containing 0.1 % formic acid (solvent B) (Carlo Erba Reagents, France). Solvent B was maintained at 10 % for the first four min followed by an increase from 10 to 100 % for fifteen min before maintaining solvent B at 100% for seven min. Samples were maintained at 10°C in a well plate autosampler until injection and the total run time was 22 min followed by 5 min post-time to wash and re-equilibrate the column before the next injection. The mass spectrometer conditions were as follows: capillary voltage 4000 V, source temperature 325 °C, nebulizer pressure 50 psig, drying gas 12 L/min.

The secondary metabolites were identified using the Mass Hunter analytical software applying the METLIN-AMRT-PCD database to obtain presumptive identifications and generate putative formulas. Then, the Mass Profiler software was applied to compare the profiles between the inoculated samples and the negative control, the compounds only found in inoculated samples were retained and so considered as produced by the isolate.

3. Results

3.1. Lipolytic and proteolytic activity

As for proteolytic and lipolytic activities, all strains showed clearing zones below the surface mycelium at both temperatures and for both activities (Figure S1). For lipolytic activity on tributyrin agar after 24 days at 25°C and 12°C (Figure 1), clearing zone measurements varied from 4.0 to 13.0 mm and from 3.0 to 10.3 mm, respectively. In comparison to *P. roqueforti*, used as a control, the tested *Nectriaceae* strains showed smaller clearing zones. Among the tested isolates, slight variations were observed according to the considered isolate and incubation temperature. Interestingly, although growth was clearly slower at the lowest

temperature, clearing zones observed were larger at 12°C than at 25°C for three out of five *B. domesticum* isolates (MNHN-RF-05627, 6.0 ± 0.0 vs. 4.0 ± 0.0 mm at 12°C and 25°C, respectively, UBOCC-A-120001, 6.7 ± 0.6 vs. 5.0 ± 0.0 mm and UBOCC-A-120003, 8.3 ± 0.6 vs. 6.8 ± 0.3 mm), and one out of four *L. lagenoides* isolates (ESE00140, 9.7 ± 1.5 vs. 7.7 ± 3.8 mm). Conversely, higher activities were observed at 25°C for one out of five *B. domesticum* isolates (UBOCC-A-120004, 3.0 ± 0.0 vs. 8.3 ± 0.6 mm at 12°C and 25°C, respectively), two out of three *B. allantoides* isolates (UBOCC-A1200037, 6.7 ± 2.1 vs. 9.0 ± 0.0 mm, UBOCC-A-120035, 6.3 ± 1.5 vs. 9.3 ± 0.3 mm), one out of four *L. lagenoides* isolates (UBOCC-A-120039, 5.0 ± 1.7 vs. 8.3 ± 2.1 mm) and *L. verticilliforme* UBOCC-A-120043 (3.0 ± 0.0 vs. 6.8 ± 0.8 mm). The remaining isolates showed similar results at 12°C and 25°C.

For proteolytic activities, casein degradation in skim milk agar according to temperature was even more contrasted between isolates (Figure 2). Indeed, despite reduced growths, clearing zones were much larger at 12°C than 25°C for several isolates belonging to *B. domesticum* (MNHN-RF-05627, 19.0 ± 0.0 vs 13.7 ± 0.6 mm, UBOCC-A-120002, 15.3 ± 0.6 vs. 10.3 ± 0.6 mm and UBOCC-A-120003 18.3 ± 0.6 vs. 13.0 ± 1.0 mm), *B. penicilloides* (VTT-D-041022, 17.7 ± 2.3 vs. 10.0 ± 1.0 mm, UBOCC-A-120021, 15.7 ± 0.6 vs. 6.8 ± 0.8 mm and UBOCC-A-120034, 16.3 ± 1.2 vs. 6.7 ± 1.2 mm) and *L. lagenoides* (ESE00140, 13.2 ± 0.3 vs. 10.0 ± 0.0 mm). Conversely, much larger clearing zones were observed at 25°C than 12°C for *B. domesticum* UBOCC-A-120001 (17.3 ± 1.2 vs. 21.0 ± 0.0 mm at 12°C and 25°C respectively), *B. allantoides* UBOCC-A-120035 (15.0 ± 0.0 vs. 21.3 ± 11.8 mm), *L. lagenoides* UBOCC-A-120039 (14.7 ± 0.6 vs. 19.3 ± 13.6 mm) and *L. verticilliforme* UBOCC-A-120043 (5.3 ± 0.6 vs. 11.3 ± 0.6 mm). Moreover, at 25°C, low proteolytic activity was observed for *B. domesticum* UBOCC-A-120004 (5.7 ± 0.6 mm) while no clearing zone was observed at 12°C after 25 days incubation and only 3.3 ± 0.6 mm after 40 days while this value reached 28.7 ± 0.6 mm for *B. domesticum* MNHN-RF-05627 after 40 days (data not shown). Noteworthy, clearing zones obtained for *P. roqueforti* on skim milk agar were much smaller (4.3 ± 0.6 mm after 24 days at 25°C) than the other tested strains despite intense mycelium growth on the medium surface.

Moreover, regarding the clearing zone observed at 12°C, the lowest activity was noted for *L. verticilliforme* (11.3 ± 0.6 mm) while for some *B. allantoides*, *B. domesticum*, *B. penicilloides* and *L. lagenoides* isolates, the clearing zone reached up to 21.3, 21.0, 17.7 and 19.3 mm, respectively.

3.2. Volatile profiling

A total of 68 volatile compounds were detected and identified by headspace GC-MS in all cheese agar (all isolates) and Raclette de Savoie samples (only for *B. domesticum* isolates), including twenty-two ketones, twelve alcohols, nine aldehydes, seven esters, seven fatty acids, four carboxylic acids, three sulfur compounds, two phenols, one pyrazine and one styrene (Table 2). An ANOVA performed on all samples, including the negative controls, showed that among those compounds, 49 and 26 were significantly impacted by fungal growth (p value ≤ 0.01) on cheese agar and Raclette de Savoie, respectively (Table 2). ANOVA results identified which compounds were significantly more abundant (e.g. heptan-2-ol, decan-2-one, nonan-2-one on cheese agar samples) or less abundant (e.g. ethanol, benzaldehyde, 1-hydroxypropan-2-one) for the different fungal isolates when compared to the negative controls (non inoculated medium or cheese) and so considered as produced or not by the isolate.

PCA and heatmap analyses indicated that replicates of a given isolate were well grouped together, excepted for a few cases (Figures 3–4, Figure S2), which was globally also the case for isolates belonging to the same species, although intraspecific variability was observed. First, at the level species, *B. domesticum* and *B. penicilloides* produced more volatile compounds with respectively 13 to 19 (except four for UBOCC-A-120001) and ten to eighteen volatile compounds, while only six to seven were observed for *B. allantoides*, and nine to thirteen for *L. lagenoides* (Figure 5). Conversely, *L. verticilliforme* produced only one compound, namely oct-1-en-3-ol. Volatile compounds produced by the different isolates corresponded mainly to alcohols and ketones for all species, while few esters and phenols were also produced by *B. domesticum* and *B. penicilloides* and/or *B. allantoides*, and

aldehydes by *L. lagenoides*. Moreover, while only oct-1-en-3-ol was produced by the five species, three compounds were produced by all four other species, namely 3-methylbutan-1-ol, 3-methylpentan-2-one, and heptan-4-one (Figure 5). Other compounds were common to two or three species. As for *B. domesticum*, *B. penicilloides* and *L. lagenoides*, seven compounds were commonly produced such as heptan-2-ol, nonan-2-one and undecan-2-one, without significant production differences (Figure 5) and six compounds were produced only by *B. domesticum* and *B. penicilloides* isolates, such as heptyl acetate, heptan-2-one and pentan-2-one (Figure 5). Finally, undecan-2-ol was produced only by *Bisifusarium* spp., 4-methylphenol by *B. allantoides* and *B. domesticum*, and octan-3-one by *B. allantoides* and *L. lagenoides*. Conversely, other compounds were specific to one species as propan-2-one by *B. penicilloides*, (E)-dec-7-en-2-one by *B. domesticum* and non-3-en-1-ol, (E)-non-2-enal, (E)-oct-2-enal and oct-1-en-3-one only produced by *L. lagenoides* (Figure 5).

At the intraspecific level, volatilome variability according to the considered isolate was also observed (Figure 6). This was particularly the case among *B. domesticum* isolates, as UBOCC-A-120001 produced less compounds (n=5), namely 3-methylpentan-2-one, heptan-4-one, oct-1-en-3-ol and 4-methylphenol (also produced by other *B. domesticum* isolates and with no quantitatively significant differences) and 3-methylbutan-1-ol, specific to this isolate. Noteworthy, the latter compound was also produced by *B. allantoides* UBOCC-A-120035 and UBOCC-A-120037, *B. penicilloides* VTT-D-041022, and *L. lagenoides* ESE00140 with no abundance difference between these isolates. Still for *B. domesticum*, it could be noted that, with the exception of the UBOCC-A-120001 isolate, ten compounds (e.g. heptan-2-ol, nonan-2-ol, nonan-2-one, undecan-2-ol and undecan-2-one) were produced by all *B. domesticum* isolates (Figure 6). Moreover, MNHN-RF-05627 also exhibited a different volatilome from a quantitative point of view, as several compounds (e.g. nonan-2-ol, heptyl acetate, undecan-2-ol and (Z)-oct-3-en-2-ol) were produced at significantly higher concentrations when compared to the other *B. domesticum* isolates.

As for *B. allantoides*, which produced a lower number of volatile compounds, heptan-4-one, oct-1-en-3-ol, octan-3-one, 3-methylpentan-2-one and 4-methylphenol were produced by the three strains, while undecan-2-ol and 3-methylbutanol were not produced by UBOCC-A-120035 and UBOCC-A-120036, respectively (Figure 6). Beyond these qualitative differences, regarding production levels, no significant differences were observed between the three *B. allantoides* isolates. Concerning *B. penicilloides*, nine compounds were common to the three isolates (e.g. undecan-2-ol, nonan-2-ol, heptan-2-one) (Figure 6), while six compounds (e.g. decan-2-one, propan-2-one, undecan-2-one) were produced by UBOCC-A-120034 and VTT-D-041022 but not by the third isolate (i.e. UBOCC-A-120021) (Figure 6). Fewer compounds and no production of specific compounds was observed for the latter isolate. Overall, no significant abundance differences were noted among isolates, except for heptan-2-ol, propan-2-one and 3-methylpentan-2 for which higher production was observed for VTT-D-041022. For *L. lagenoides*, five compounds were common to the four strains (i.e. 3-methylpentan-2-one, oct-1-en-3-ol, (E)-non-2-enal, (E)-oct-2-enal and (Z)-oct-3-en-2-ol), (Figure 6) while two compounds were produced by three out of four isolates (i.e. nonan-2-one and oct-1-en-3-one not produced by UBOCC-A-120039 and UBOCC-A-120038, respectively). Others were produced by two out of four isolates (i.e. octan-3-one produced by ESE00140 / UBOCC-A-120041, non-3-en-1-ol by UBOCC-A-120039 / UBOCC-A-120041 and nonan-2-ol, decan-2-one and undecan-2-one by ESE00140 / UBOCC-A-120038) or specific to a given isolate (i.e. heptan-2-ol and hexan-2-one by UBOCC-A-120039, and 3-methylbutan-1-ol and heptan-4-one by ESE00140) (Figure 6). However, among these productions, no significant quantitative differences were noted between *L. lagenoides* isolates.

Regarding volatile profiling on Raclette de Savoie, which were only performed for the five selected *B. domesticum* isolates, ten to fifteen compounds were produced, including seven compounds (e.g. 3-methylpentan-2-one, furan-2-carbaldehyde, oct-1-en-3-ol and octan-3-one) common to all isolates (Figure 7). Otherwise, only a few qualitative differences could be

noted. Indeed, a production of non-8-en-2-one and nonan-2-one was observed by all isolates except UBOCC-A-120001, while undecan-2-one and propan-2-one were not produced by UBOCC-A-120003 and UBOCC-A-120004, respectively. Then, some compounds were specific to one isolate (i.e. (E)-oct-2-enal for UBOCC-A-120004 or heptan-2-ol, nonan-2-ol, heptan-2-one for MNHN-RF-05627) (Figure 7). Moreover, among the common compounds produced, only a few quantitative differences were observed. For instance, while oct-1-en-3-ol and 4-methylphenol were produced by all isolates, the former was detected at a lower abundance for MNHN-RF-05627 and the latter at a higher abundance for UBOCC-A-120002 and UBOCC-A-120004. Conversely, for other compounds such as undecan-2-one, nonan-2-one and non-8-en-2-one, no significant differences were noted.

When comparing *B. domesticum* volatilomes on cheese agar and Raclette de Savoie, it could be noted that even if several compounds were produced on both media by some isolates (e.g. oct-1-en-3-ol, heptan-4-one undecan-2-one, nonan-2-one, non-8-en-2-one), others were only produced on Raclette de Savoie cheese (e.g. furan-2-carbaldehyde, octan-3-one, propan-2-one) (Figure S3). Noteworthy, for UBOCC-A-120001, the *B. domesticum* isolate which produced only four compounds on cheese agar, a distinct volatilome was observed and a greater production of volatile compounds was observed on Raclette de Savoie (Figure S3). MNHN-RF-5627 was the only isolate to produce heptan-2-ol, nonan-2-ol and heptan-2-one on Raclette de Savoie while on cheese agar several isolates produced them. Finally, among the compounds produced in common on both media, only few quantitative differences were noted, which could be linked either to a matrix effect or to isolate activity, or both. Indeed, the same compounds could be found with abundance differences on both media due to a better production on one but it could also be due to a better extraction.

3.3. Extrolite production

Extrolite profiles were assessed for the five species by LC-MS/Q-TOF. Compounds (putative identifications) that were found in more than 50 % of all replicates for a given species were

considered as part of the core metabolome and results are presented in Figure 8 and Figure S4. As for skim milk agar cultures, alpha linolenic acid and enigmol (putative identifications) were produced by all species and isolates while 63, 40, 72, 82 and 140 compounds were produced by *B. allantoides*, *B. domesticum*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* and *L. verticilliforme*, respectively. Among them, several compounds were unique to one species (25, 14, 32, 36 and 87 compounds, respectively) and the database proposed several putative identifications such as D-erythro-sphingosine C-15 and prosopinine produced only by *B. domesticum* or dihydroceramide C2 and dihydrodioscorine produced by *B. allantoides* and *L. lagenoides*, respectively. As for YES agar cultures, linoleic acid, enigmol, phytosphingosine and phytosphingosine-1-P were produced by all isolates regardless of the species, while 34, 22, 55, 30 and 65 compounds were produced by *B. allantoides*, *B. domesticum*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* and *L. verticilliforme*, respectively with 10, 11, 26, 13 and 48 compounds produced only by one of these respective species (Figure 8). Among these specific compounds, for example, 2,6-dipentylpiperidine, D-erythro-sphingosine C-15 and dihydroceramide were only produced by *B. domesticum* isolates while 1,8-diazacyclotetradecane-2,9-dione was only produced by *B. penicilloides*.

When comparing both media used for extrolite profiling, more compounds were produced on skim milk agar compared to YES agar for the five species (Figure S4). However, it could be noted, for some species, that several compounds (on average 11%) would be produced on both media. For example, 2,6-dipentylpiperidine, D-erythro-sphingosine C-15, prosopinine or dihydrodioscorine and 4-oxoretinol were produced by *B. domesticum* and *L. lagenoides*, respectively, regardless of the considered medium (Figure S4).

4. Discussion

The involvement of bacteria and fungi via the action of several metabolic pathways such as lipolysis and proteolysis, during cheese-making has been well established (Ardö et al., 2017; McSweeney, 2017; Spinnler, 2017; Thierry et al., 2017). For fungi, while these aspects have

been largely studied for some key species (e.g. *P. roqueforti*) (Caron et al., 2021; Dumas et al., 2020; Gillot et al., 2017), for others further knowledge is needed. This is particularly the case of *B. domesticum* as well as the recently described *B. allantoides*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* and *L. verticilliforme* species (Savary et al., 2021) as no studies had yet been done to decipher their potential roles during cheese-making. In this context, we focused on studying these species in relation to their relevant functional traits for cheese-making, namely proteolytic and lipolytic activities as well as volatile and extrolite profiles.

First, lipolytic and proteolytic activities were determined as these are key reactions occurring during cheese production and strongly participate to the final cheese characteristics (e.g. aspect, texture but also by releasing aroma compounds and precursors) (Ardö et al., 2017; Martín and Coton, 2017; McSweeney, 2017; Thierry et al., 2017). All isolates were confirmed to be proteolytic and lipolytic, however, within each species, isolate-dependent activities were observed. For lipolytic activity, lower intraspecific variability among isolates was observed although a temperature effect was seen. Interestingly, at 12°C, despite reduced growth, higher activity was noted for *B. domesticum* MNHN-RF-05627, UBOCC-A-120001 and UBOCC-A-120003 but also *L. lagenoides* ESE00140. This is of particular interest as cheese ripening is performed at similar temperatures, suggesting these isolates are well adapted to these conditions. However, compared to *P. roqueforti* control included in this study, the tested *Nectriaceae* species exhibited lower lipolytic activity. The same observations were made for proteolytic activities for some isolates (*B. domesticum* MNHN-RF-05627, UBOCC-A-120002 and UBOCC-A-120003, *B. penicilloides* UBOCC-120021, UBOCC-A-120034, VTT-D041022 and *L. lagenoides* ESE00140) as they were clearly more proteolytic at 12°C than 25°C, despite slower growth. Some intraspecific variability was also observed as one *B. domesticum* isolate had a low proteolytic activity at 25°C and no clearing zone at 12°C after 25 days. Interestingly, this isolate (UBOCC-A-120004) was also shown to have a distinct genetic profile (based on RAPD), be less tolerant to salt as well as low temperatures (5°C) in a previous study (Savary et al., 2022). In comparison to *P. roqueforti* used as a control as well known for both its intense

lipolytic and proteolytic activities (Caron et al., 2021; Dumas et al., 2020; Gillot et al., 2017), lower proteolytic activities were observed at 12°C while at 25°C, a similar activity was observed with several isolates (*B. domesticum* UBOCC-A-120004, *B. penicilloides* UBOCC-A-120021 and UBOCC-A-120034). The performed proteolytic and lipolytic tests rather correspond to qualitative or semi-quantitative tests so it is not easy to compare our data with previous studies.

Nectriaceae isolates volatilomes were then determined after growth on a cheese-mimicking medium, but also on Raclette de Savoie cheese for five *B. domesticum* isolates. Among the fungal cultures, distinct volatile profiles were distinguished, mainly grouping isolates of the same species together. Based on cheese agar results, *B. domesticum* and *B. penicilloides* were qualitatively differentiated from the others species as they produced more volatile compounds. Conversely, *L. verticilliforme* produced only one compound in the tested conditions. The former compound corresponded to oct-1-en-3-ol, produced by all five species isolates except *B. penicilloides* UBOCC-A-120021 and is well known to have a mushroom, earthy or oily odor (Frisvad, 2014; Spinnler, 2017). This compound is frequently produced by many fungal species (Elmassry et al., 2020), in relation to cheese, *P. camemberti* is a well known producer and the compound is derived from the degradation of unsaturated fatty acids (Thierry et al., 2017). It is known to contribute to the characteristic Camembert aroma (Ganesan and Weimer, 2017; Molimard and Spinnler, 1996). Furthermore, some specific compounds with interesting odor descriptors for cheese-making were produced by the four other species. Regarding the *Bisifusarium* species, only undecan-2-ol (odor descriptor: fresh, waxy) was solely produced by the three species (except UBOCC-A-120035 and UBOCC-A-120001 isolates) with a significantly higher production by *B. domesticum* MNHN-RF-05627 compared to *B. domesticum* UBOCC-A-120004, *B. penicilloides* UBOCC-A-120021 and *B. allantoides* UBOCC-A-120036. Moreover, *B. penicilloides* and *B. domesticum* produced six specific compounds with fruity or sweet descriptors including heptan-2-one, non-8-en-2-one, and pentan-2-one. They also produced heptan-2-ol and nonan-2-ol, two alcohols that are also known to participate in Camembert aroma (Thierry et al., 2017). Among volatile compounds,

methyl-ketones (e.g. nonan-2-one - fresh, sweet -, undecan-2-one - fruity, creamy, fatty -) were the most abundant and well associated with *B. domesticum*, *B. penicilloides* and *L. lagenoides*. These compounds result from fatty acid beta-oxidation, which is particularly described in blue-veined cheese but also in Parmigiano Reggiano, Camembert de Normandie or Cheddar cheese, and associated with the metabolism of *P. camemberti*, *P. roqueforti* or *G. candidum* (Gillot et al., 2017; Spinnler, 2017; Thierry et al., 2017). Regarding the other main volatile compounds of interest, heptan-4-one production is known to have a “cheese” odor and was produced by all *B. allantoides*, *B. domesticum* and *B. penicilloides* isolates. Propan-2-one, a compound commonly associated with cheese as Queso Blanco (Ganesan and Weimer, 2017), was only produced by *B. penicilloides* UBOCC-A-120034 and VTT-D-041022 on cheese agar and by *B. domesticum* on Raclette de Savoie (except UBOCC-A-120004). Furthermore, only a few aldehydes were produced by these species, conversely to alcohols that were the second most abundant family of compounds produced by the studied *Nectriaceae*. This result might be explained by aldehydes reduction into alcohols during ripening (Thierry et al., 2017).

To study the production of volatile compounds, we chose two experimental conditions that mimicked cheese-making conditions, so a cheese agar model but also Raclette de Savoie. Cheese agar medium provides a standardized and controlled condition to determine the volatilome of a given strain without any biotic interactions within the complex cheese ecosystem, while unripened Raclette de Savoie cheese was used as it is voluntarily inoculated with *B. domesticum* at the industrial scale for its *anticollanti* properties so was closer to technological conditions. Some differences were clearly observed between isolates and according to medium as specific volatile profiles were observed. For example, butan-2-one was not produced on cheese agar by *B. domesticum* strains MNHN-RF-05627, UBOCC-A-120001 and UBOCC-A-120002 while clearly identified from Raclette de Savoie cheese samples. In addition, *B. domesticum* UBOCC-A-120001 showed qualitatively, the lowest production of volatile compounds on cheese agar compared to the other *B. domesticum* isolates while on Raclette de savoie cheese, the latter exhibited a similar profile with the other

isolates (the other isolates profiles were only slightly impacted by medium). Based on these results, on cheese agar, *B. domesticum* MNHN-RF-05627 and *B. penicilloides* VTT-D-041022 had higher aromatic potential as more volatile compounds were produced and/or with higher abundances, which could clearly be of interest for future screening of strains for use during cheese-making. However, the volatilome in a given condition only provides a partial view of the isolate aromatic potential as sensory evaluation of cheese samples is also of interest. Regarding extralite production, a recent study by Savary et al. (2021) highlighted that, with the tested conditions, no known mycotoxins among those frequently produced by *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* or *Penicillium* spp. were detected in *B. allantoides*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* and *L. verticilliforme*, a characteristic also observed for *B. domesticum* (Pr. J. C. Frisvad, personal communication) and thus in agreement with the Bachmann et al. (2005) study. Moreover, in the latter study, no formation of cytotoxic metabolites and metabolites with antibiotic activity against *Geobacillus stearothermophilus* were observed, which reinforces the potential safety status of this species (based on the European Qualified Presumption of Safety or the US Generally Recognized As Safe statuses). Based on a global metabolite profiling analysis performed by LC-MS/Q-TOF, on fourteen days YES and skim milk agar cultures, several common compounds were produced by the five species with, in general, twice as many compounds produced on skim milk agar medium vs. YES agar. In general, *B. domesticum* produced about half as many metabolites, regardless of medium, than the four other species and *L. verticilliforme* produced the highest number of compounds, while the opposite trend was observed for volatile. Using the METLIN-AMRT-PCD database, several compounds were putatively identified based on their m/z ions such as alpha linolenic acid and enigmol in skim milk agar and linoleic acid, enigmol, phytosphingosine and phytosphingosine-1-P in YES agar, produced by all species. Also, depending on the species, ceramides, sphingosines or fatty acids were also identified. Finally, these results also highlighted the putative production of several compounds with high molecular weight (potentially cyclic lipopeptides or complex fatty acids based on Savary et al., 2021) that could not be precisely identified. In particular, the five

species produced several compounds on skim milk agar with molecular weights equivalent to around 965 to 1700 g/mol and up to 3025 g/mol for *Longinectria* isolates.

5. Conclusions

The obtained results provide new insights about the functional properties of *B. domesticum* and the newly described cheese-associated *Nectriaceae* species (i.e. *B. allantoides*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* and *L. verticilliforme*). Clearly, these traits are of interest for future *B. domesticum* strain selection by cheesemakers to improve overall cheese quality and safety. Our findings also highlight the potential interest for the newly described cheese-associated *Nectriaceae* species (in particular *B. penicilloides*) during cheese-making (novel adjunct or ripening cultures). Finally, extrolite profiling reinforced the data on the atoxigenic character of the tested *B. domesticum* and *Nectriaceae* spp. isolates although further investigation of the unidentified compounds should still be performed.

Acknowledgments

We would also like to thank members of the French Dairy Interbranch Organization (CNIEL), in particular, Laurence Abraham from Entremont and the Lactalis R&D team for kindly providing Raclette de Savoie and cheese agar ingredients.

Funding

OS benefited from a Ph.D grant from the Région Bretagne and the French Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation. This work was co-funded by the French Dairy Interbranch Organization (CNIEL) (DIFUS Project, 2019_00627).

Authors' contributions

EC, J-LJ, FG and MC obtained the funding, supervised the study, edited and proofread the manuscript. EC, J-LJ, MC and OS designed the experiments. OS performed experimental work, analysed the data and drafted the manuscript. AT and M-BM performed GC-MS analyses and AT and MC provided assistance for statistical and correlation analyses. OS and MC performed all extrolite profiling experiments by LC-MS/Q-TOF and data analyses. All authors contributed and proofread the article.

References

- Ardö, Y., McSweeney, P.L.H., Magboul, A.A.A., Upadhyay, V.K., Fox, P.F., 2017. Chapter 18 - Biochemistry of cheese ripening: proteolysis, in: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W. (Eds.), *Cheese (Fourth Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 445–482. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00018-1>
- Bachmann, H.P., Bobst, C., Bütikofer, U., Casey, M.G., Dalla Torre, M., Fröhlich-Wyder, M.T., Fürst, M., 2005. Occurrence and significance of *Fusarium domesticum* alias *Anticollanti* on smear-ripened cheeses. *LWT - Food Science and Technology* 38, 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.05.018>
- Bachmann, H.-P., Bobst, C., Bütikofer, U., Dalla, M., Fröhlich-Wyder, M.-T., Fuerst, M., 2003. Sticky cheese smear and natural white mould. *Milchwissenschaft* 58, 117–232.
- Bardou, P., Mariette, J., Escudié, F., Djemiel, C., Klopp, C., 2014. jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics* 15, 293. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-293>
- Caron, T., Piver, M.L., Péron, A.-C., Lieben, P., Lavigne, R., Brunel, S., Roueyre, D., Place, M., Bonnarme, P., Giraud, T., Branca, A., Landaud, S., Chassard, C., 2021. Strong effect of *Penicillium roqueforti* populations on volatile and metabolic compounds responsible for aromas, flavor and texture in blue cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 354, 109174. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109174>
- Coton, E., Coton, M., Hymery, N., Mounier, J., Jany, J.-L., 2020. *Penicillium roqueforti*: an overview of its genetics, physiology, metabolism and biotechnological applications. *Fungal Biology Reviews* 34, 59–73. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2020.03.001>
- Dugat-Bony, E., Garnier, L., Denonfoux, J., Ferreira, S., Sarthou, A.-S., Bonnarme, P., Irlinger, F., 2016. Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. *International Journal of Food Microbiology* 238, 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.026>
- Dumas, E., Feurtey, A., Rodríguez de la Vega, R.C., Le Prieur, S., Snirc, A., Coton, M., Thierry, A., Coton, E., Le Piver, M., Roueyre, D., Ropars, J., Branca, A., Giraud, T., 2020. Independent domestication events in the blue-cheese fungus *Penicillium roqueforti*. *Mol. Ecol.* <https://doi.org/10.1111/mec.15359>
- Dupont, J., Dequin, S., Giraud, T., Tacon, F.L., Marsit, S., Ropars, J., Richard, F., Selosse, M.-A., 2017. Fungi as a Source of Food. *Microbiology Spectrum* 5. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0030-2016>

- Elmassry, M.M., Farag, M.A., Preissner, R., Gohlke, B.-O., Piechulla, B., Lemfack, M.C., 2020. Sixty-one volatiles have phylogenetic signals across bacterial domain and fungal kingdom. *Frontiers in Microbiology* 11, 2380. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.557253>
- Fox, P.F., Guinee, T.P., 2020. Cheese: Overview, in: Reference Module in Food Science. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00093-3>
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H., 2017. Principal Families of Cheese, in: Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H. (Eds.), *Fundamentals of Cheese Science*. Springer US, Boston, MA, pp. 27–69. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_3
- Frisvad, J.C., 2014. Penicillium/Penicillia in food production, in: Batt, C.A., Tortorello, M.L. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*. Academic Press, Oxford, pp. 14–18. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00249-4>
- Ganesan, B., Weimer, B.C., 2017. Chapter 19 - Amino acid catabolism and its relationship to cheese flavor outcomes, in: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W. (Eds.), *Cheese (Fourth Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 483–516. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00019-3>
- Gillot, G., Jany, J.-L., Poirier, E., Maillard, M.-B., Debaets, S., Thierry, A., Coton, E., Coton, M., 2017. Functional diversity within the *Penicillium roqueforti* species. *Int J Food Microbiol* 241, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.001>
- Greco, E., El-Aguizy, O., Ali, M.F., Foti, S., Cunsolo, V., Saletti, R., Ciliberto, E., 2018. Proteomic Analyses on an Ancient Egyptian Cheese and Biomolecular Evidence of Brucellosis. *Anal. Chem.* 90, 9673–9676. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02535>
- Harlé, O., Falentin, H., Niay, J., Valence, F., Courselaud, C., Chuat, V., Maillard, M.-B., Guédon, É., Deutsch, S.-M., Thierry, A., 2020. Diversity of the metabolic profiles of a broad range of lactic acid bacteria in soy juice fermentation. *Food Microbiol* 89, 103410. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103410>
- Hermet, A., Méheust, D., Mounier, J., Barbier, G., Jany, J.-L., 2012. Molecular systematics in the genus *Mucor* with special regards to species encountered in cheese. *Fungal Biology* 116, 692–705. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.04.002>
- Hermet, A., Mounier, J., Keravec, M., Vasseur, V., Barbier, G., Jany, J.L., 2014. Application of capillary electrophoresis single-stranded conformation polymorphism (CE-SSCP) analysis for identification of fungal communities in cheese. *Food Microbiology* 41, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.01.013>
- Marino, M., Dubsky de Wittenau, G., Saccà, E., Cattonaro, F., Spadotto, A., Innocente, N., Radovic, S., Piasentier, E., Marroni, F., 2019. Metagenomic profiles of different types of Italian high-moisture Mozzarella cheese. *Food Microbiology* 79, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.007>
- Martín, J.F., Coton, M., 2017. Chapter 12 - Blue Cheese: Microbiota and Fungal Metabolites, in: Frias, J., Martínez-Villaluenga, C., Peñas, E. (Eds.), *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*. Academic Press, Boston, pp. 275–303. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802309-9.00012-1>
- McSweeney, P.L.H., 2017. Chapter 14 - Biochemistry of cheese ripening: Introduction and overview, in: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W. (Eds.), *Cheese (Fourth Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 379–387. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00014-4>

- Molimard, P., Spinnler, H.E., 1996. Review: Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. *Journal of Dairy Science* 79, 169–184. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76348-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76348-8)
- Morin-Sardin, S., Rigalma, K., Coroller, L., Jany, J.-L., Coton, E., 2016. Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor* spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese. *Food Microbiol.* 56, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.11.019>
- Ozturkoglu-Budak, S., Wiebenga, A., Bron, P.A., de Vries, R.P., 2016. Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 237, 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.007>
- Penland, M., Deutsch, S.-M., Falentin, H., Pawtowski, A., Poirier, E., Visenti, G., Le Meur, C., Maillard, M.-B., Thierry, A., Mounier, J., Coton, M., 2020. Deciphering microbial community dynamics and biochemical changes during Nyons black olive natural fermentations. *Front Microbiol* 11, 586614. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.586614>
- Penland, M., Falentin, H., Parayre, S., Pawtowski, A., Maillard, M.-B., Thierry, A., Mounier, J., Coton, M., Deutsch, S.-M., 2021. Linking Pélardon artisanal goat cheese microbial communities to aroma compounds during cheese-making and ripening. *International Journal of Food Microbiology* 345, 109130. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109130>
- Pogačić, T., Maillard, M.-B., Leclerc, A., Hervé, C., Chuat, V., Yee, A.L., Valence, F., Thierry, A., 2015. A methodological approach to screen diverse cheese-related bacteria for their ability to produce aroma compounds. *Food Microbiology* 46, 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.018>
- Ropars, J., Cruaud, C., Lacoste, S., Dupont, J., 2012. A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. *Int. J. Food Microbiol.* 155, 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.005>
- Ropars, J., Didiot, E., Rodríguez de la Vega, R.C., Bennetot, B., Coton, M., Poirier, E., Coton, E., Snirc, A., Le Prieur, S., Giraud, T., 2020. Domestication of the emblematic white cheese-making fungus *Penicillium camemberti* and its diversification into two varieties. *Current Biology* 30, 4441-4453.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.08.082>
- Savary, O., Coton, M., Frisvad, J.C., Nodet, P., Ropars, J., Coton, E., Jany, J.-L., 2021. Unexpected *Nectriaceae* species diversity in cheese, description of *Bisifusarium allantoides* sp. nov., *Bisifusarium penicilloides* sp. nov., *Longinectria* gen. nov. *lagenoides* sp. nov. and *Longinectria verticilliforme* sp. nov. *Mycosphere* 12(1), 1077–1100. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/12/1/13>
- Savary, O., Coton, M., Jany, J.L., Coroller, L., Coton, E., 2022. Effect of abiotic factors and culture media on the growth of cheese-associated *Nectriaceae* species. *International Journal of Food Microbiology* 364, 109509. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109509>
- Spinnler, H.-E., 2017. Chapter 36 - Surface Mold–Ripened Cheeses, in: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W. (Eds.), *Cheese* (Fourth Edition). Academic Press, San Diego, pp. 911–928. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00036-3>
- Thierry, A., Collins, Y.F., Abeijón Mukdsi, M.C., McSweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G., Spinnler, H.E., 2017. Chapter 17 - Lipolysis and metabolism of fatty acids in cheese, in: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W. (Eds.), *Cheese* (Fourth Edition). Academic Press, San Diego, pp. 423–444. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00017-X>

- Wolfe, B.E., Button, J.E., Santarelli, M., Dutton, R.J., 2014. Cheese rind communities provide tractable systems for *in situ* and *in vitro* studies of microbial diversity. *Cell* 158, 422–433. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.041>
- Yeluri Jonnala, B.R., McSweeney, P.L.H., Sheehan, J.J., Cotter, P.D., 2018. Sequencing of the cheese microbiome and its relevance to industry. *Front Microbiol* 9, 1020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01020>

Figure captions

Figure 1: Lipolytic activity of the studied cheese-associated *Nectriaceae* species. The clear zone was measured on tributyrin agar after 24 days culture performed at 25°C (solid) and 12°C (hatched). The following species and isolates are represented (mean value of three replicates, the error bars corresponding to standard deviation): *B. allantoides* (UBOCC-A-120035, UBOCC-A-120036 and UBOCC-A-120037), *B. domesticum* (MNHN-RF-05627, UBOCC-A-120001, UBOCC-A-120002, UBOCC-A-120003 and UBOCC-A-120004), *B. penicilloides* (UBOCC-A-120021, UBOCC-A-120034 and VTT-D-041022), *L. lagenoides* (ESE000140, UBOCC-A-120038, UBOCC-A-120039 and UBOCC-A-120041), *L. verticilliforme* (UBOCC-A-1200043) and *P. roqueforti* (FM164), as a positive control. No clear zone was observed on the negative control (data not shown).

Figure 2: Proteolytic activity of the studied cheese-associated *Nectriaceae* species. The halo size was measured on skim milk agar after 24 days culture performed at 25°C (solid color) and 12°C (hatched). The following species and isolates are represented (mean value of three replicates, the error bars corresponding to standard deviation): *B. allantoides* (UBOCC-A-120035, UBOCC-A-120036 and UBOCC-A-120037), *B. domesticum* (MNHN-RF-05627, UBOCC-A-120001, UBOCC-A-120002, UBOCC-A-120003 and UBOCC-A-120004), *B. penicilloides* (UBOCC-A-120021, UBOCC-A-120034 and VTT-D-041022), *L. lagenoides* (ESE000140, UBOCC-A-120038, UBOCC-A-120039 and UBOCC-A-120041), *L. verticilliforme* (UBOCC-A-1200043) and *P. roqueforti* (FM164), as a positive control. No clear zone was observed on the negative control (data not shown).

Figure 3: Normalized heat-map representation of the studied cheese-associated *Nectriaceae* species volatilome after 24 days culture on cheese agar. Hierarchical clustering was done using Ward's linkage and Euclidean distances. Sample names are on the bottom and volatile compound names are on the right. The green to red color range correspond to low to high compound abundances. The samples were noted with the abbreviations described below with the information “_CAR1”, “_CAR2”, “_CAR3” corresponding to replicate 1, 2, 3 on cheese agar respectively. BA_A, BA_B and BA_C correspond to *B. allantoides* UBOCC-A-120035, UBOCC-A-120036 and UBOCC-A-120037. BD_A, BD_B, BD_C, BD_D and BD_E correspond to *B. domesticum* MNHN-RF-05627, UBOCC-A-120001, UBOCC-A-120002, UBOCC-A-120003 and UBOCC-A-120004. BP_A, BP_B and BP_C correspond to *B. penicilloides* UBOCC-A-120021, UBOCC-A-120034 and VTT-D-041022. LL_A, LL_B, LL_C and LL_D correspond to *L. lagenoides* ESE000140, UBOCC-A-120038, UBOCC-A-120039

and UBOCC-A-120041. LV_A correspond to *L. verticilliforme* UBOCC-A-120043 while the negative control was noted NEG.

Figure 4: Normalized heat-map representation of *B. domesticum* isolate volatilome after 24 days culture on cheese agar or Raclette de Savoie cheese. Hierarchical clustering was done using Ward's linkage and Euclidean distances. Sample names are on the bottom and volatile compound names are on the right. The green to red color range corresponds to low to high compound abundances. The samples were noted with the abbreviations described below with the information “_CAR1”, “_CAR2”, “_CAR3” and “_RCT1”, “_RCT2”, “_RCT3”. corresponding to replicate 1, 2, 3 on cheese agar and 1, 2, 3 on Raclette de Savoie respectively. BD_A, BD_B, BD_C, BD_D and BD_E correspond to *B. domesticum* MNHN-RF-05627, UBOCC-A-120001, UBOCC-A-120002, UBOCC-A-120003 and UBOCC-A-120004 while the negative control was noted NEG.

Figure 5: Venn diagrams representing interspecies volatilome comparison on cheese agar. For each species (*B. allantoides*, *B. domesticum*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* and *L. verticilliforme*), the volatile compounds produced by at least one isolate are represented. Numbers correspond to the compounds specific to one species or shared by several species highlighted by the circles. The diagrams were obtained using the “*jvenn*” online tool (Bardou et al., 2014).

Figure 6: Venn diagrams representing intraspecific volatilome comparison on cheese agar samples. Numbers correspond to the compounds specific to one isolate or shared by several isolates highlighted by the circles. The diagrams were obtained using the “*jvenn*” online tool (Bardou et al., 2014). *L. verticilliforme* was not presented here because only one isolate was available and studied.

Figure 7: Venn diagrams representing the volatilomes of *B. domesticum* isolates on Raclette de Savoie. Numbers correspond to the compounds specific to one isolate or shared by several isolates highlighted by the circles. The diagrams were obtained using the “*jvenn*” online tool (Bardou et al., 2014).

Figure 8: Venn diagrams representing interspecies extrolite profiles comparison on skim milk agar and YES agar. Numbers correspond to the compounds specific to one species or shared by several species highlighted by the circles. The diagrams were obtained using the “*jvenn*” online tool (Bardou et al., 2014).

Figure 1.

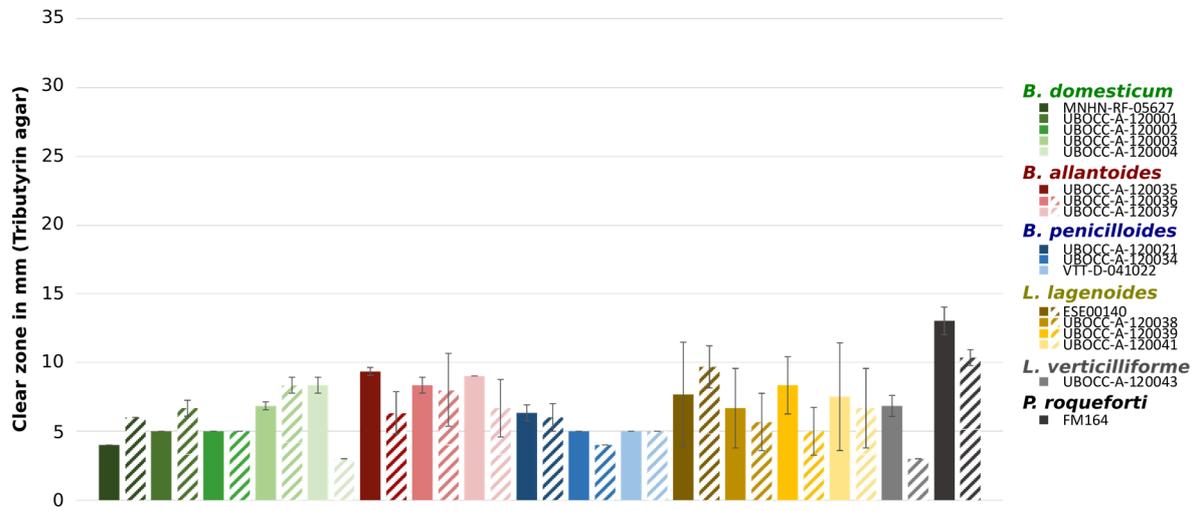


Figure 2.

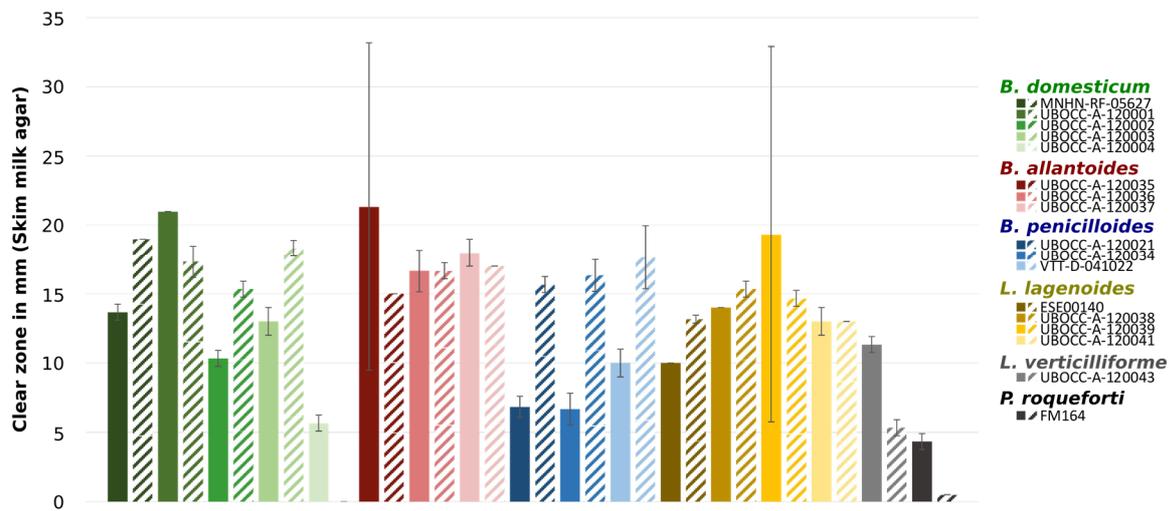


Figure 3.

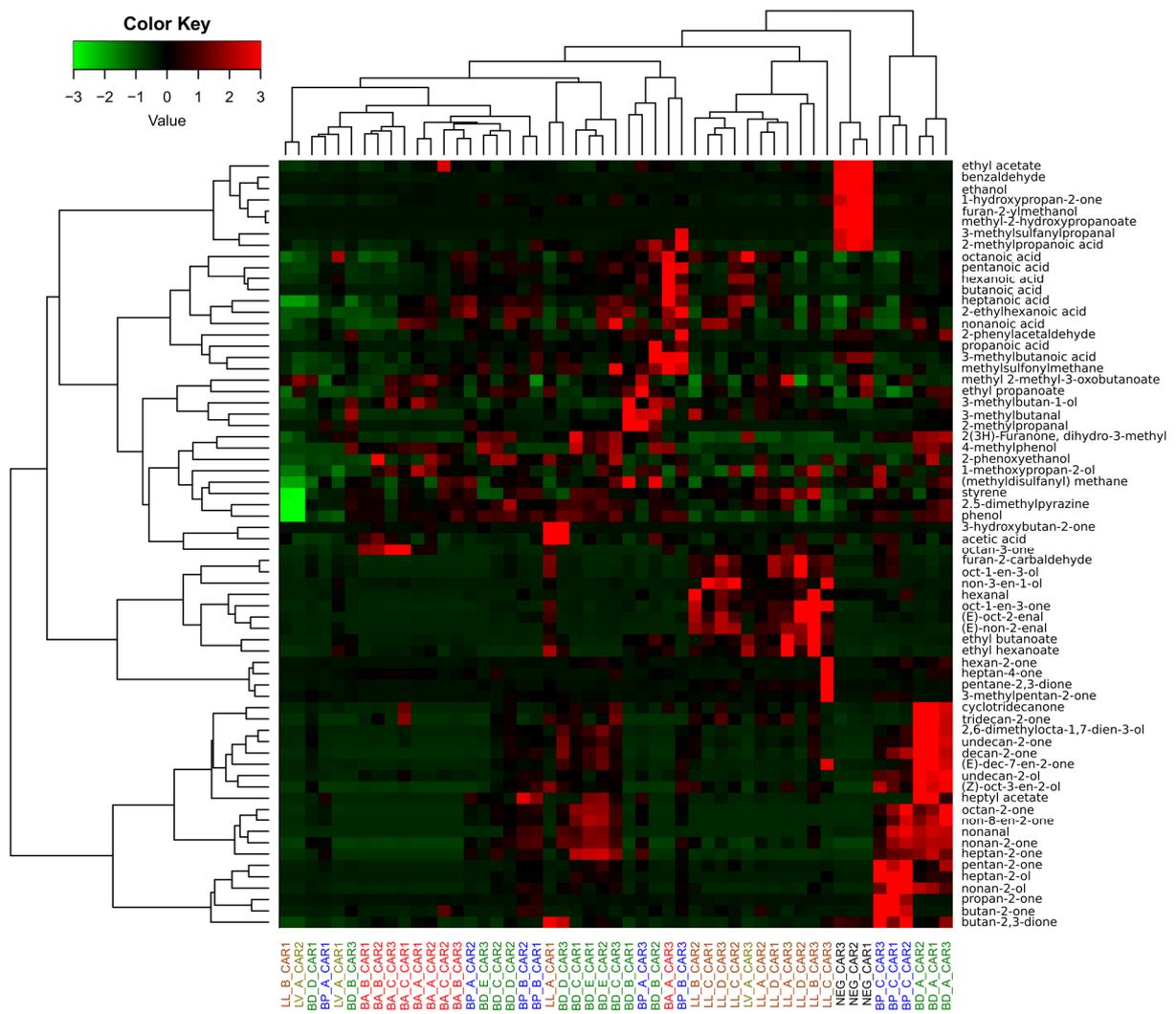


Figure 4.

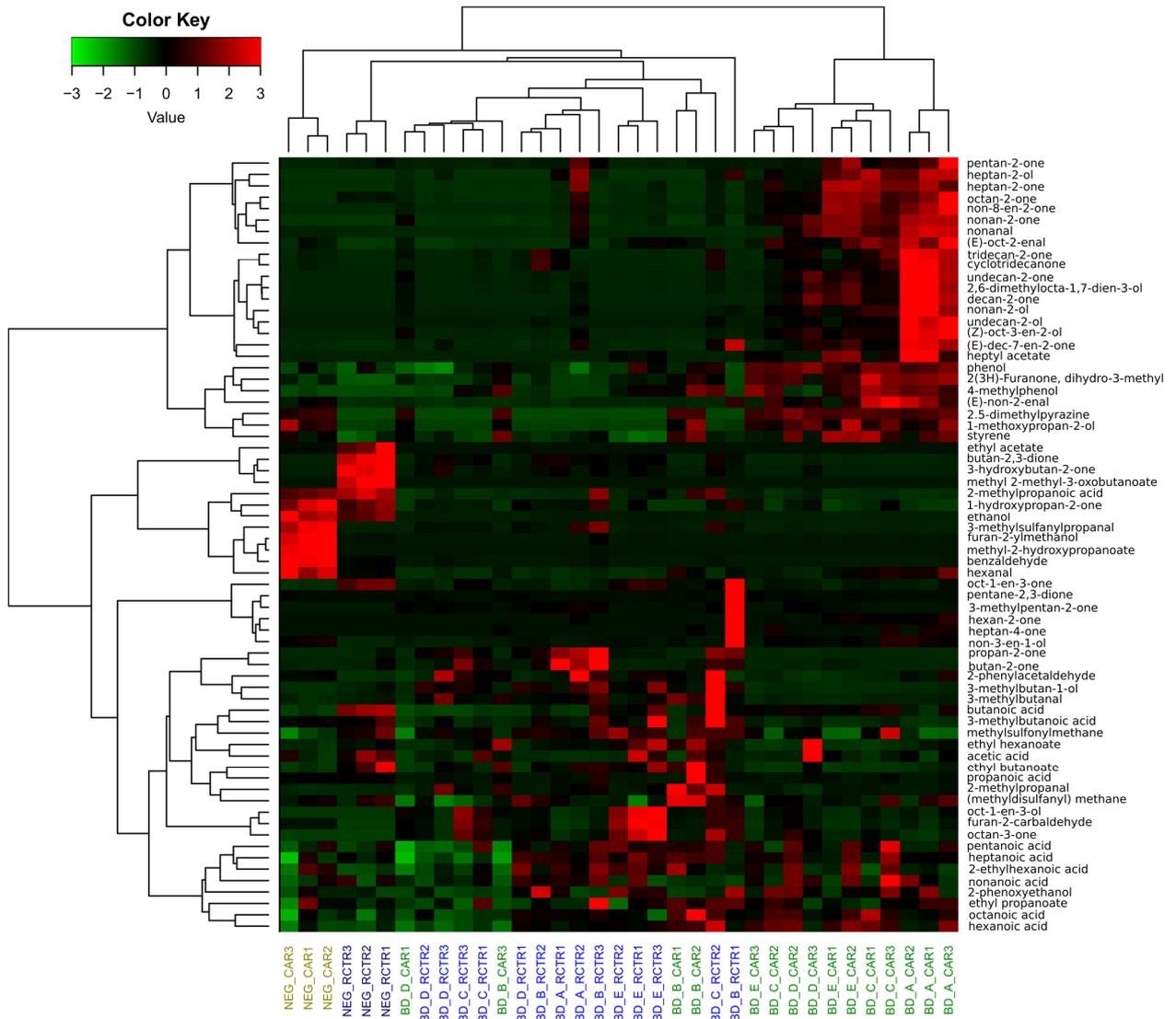


Figure 5.

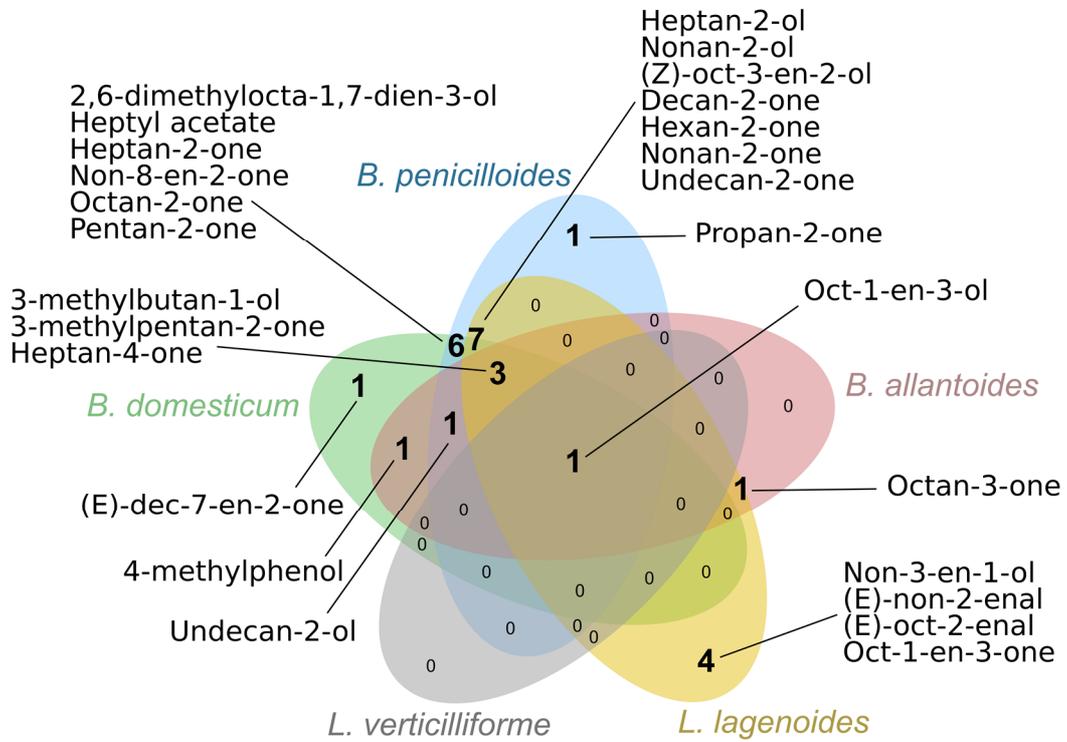
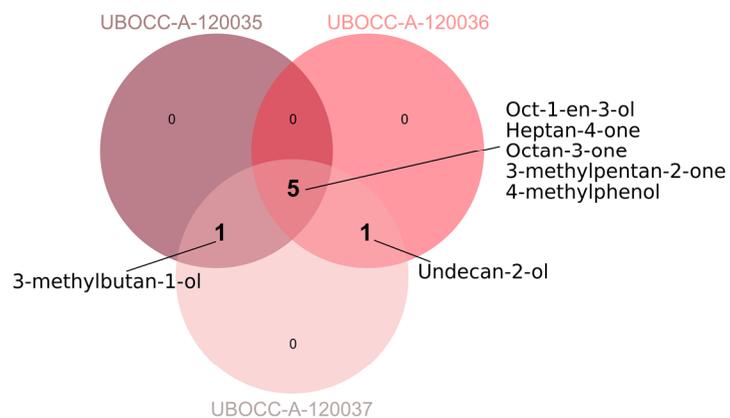
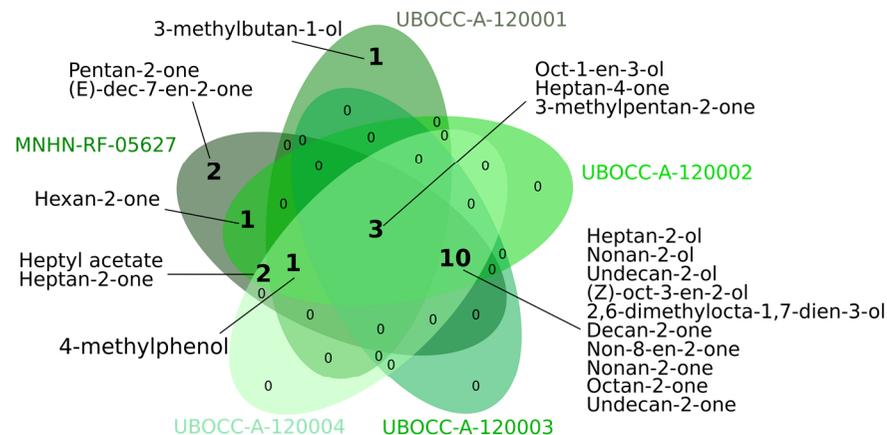


Figure 6.

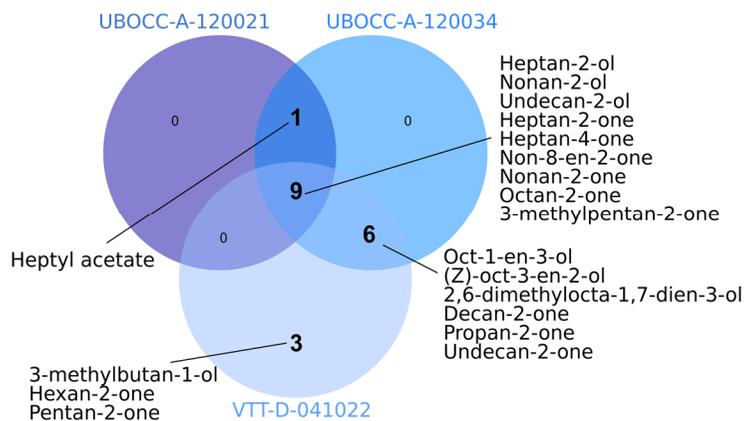
B. allantoides



B. domesticum



B. penicilloides



L. lagenoides

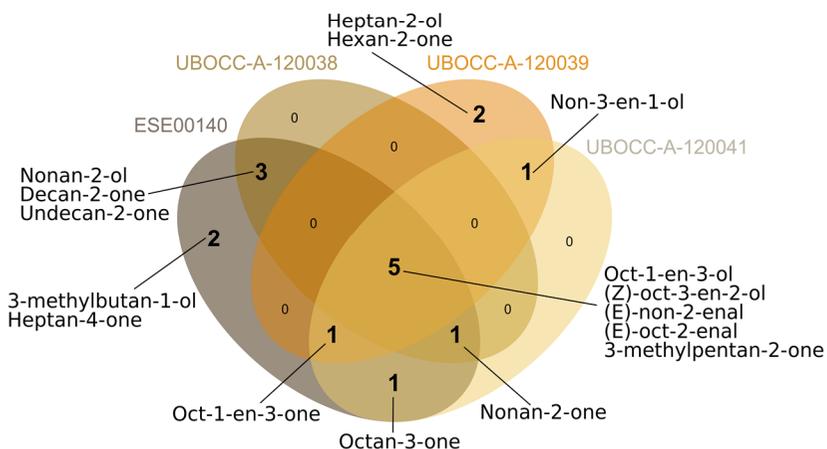


Figure 7.

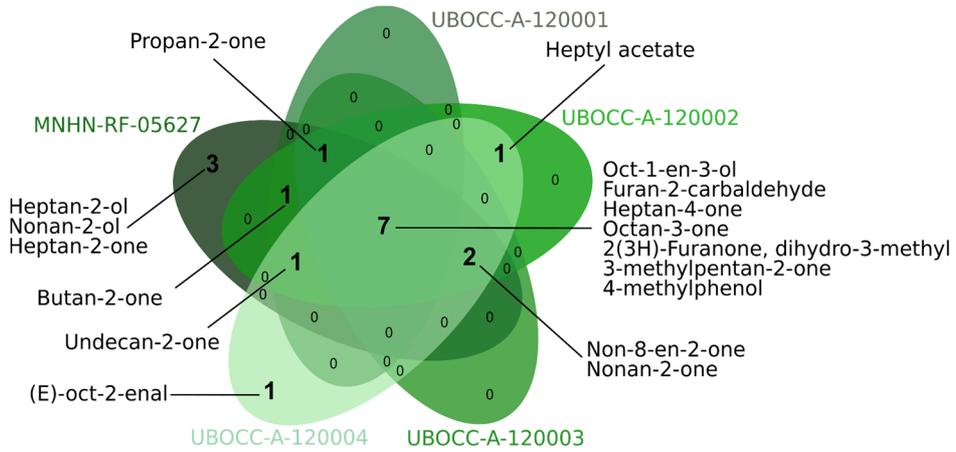


Figure 8.

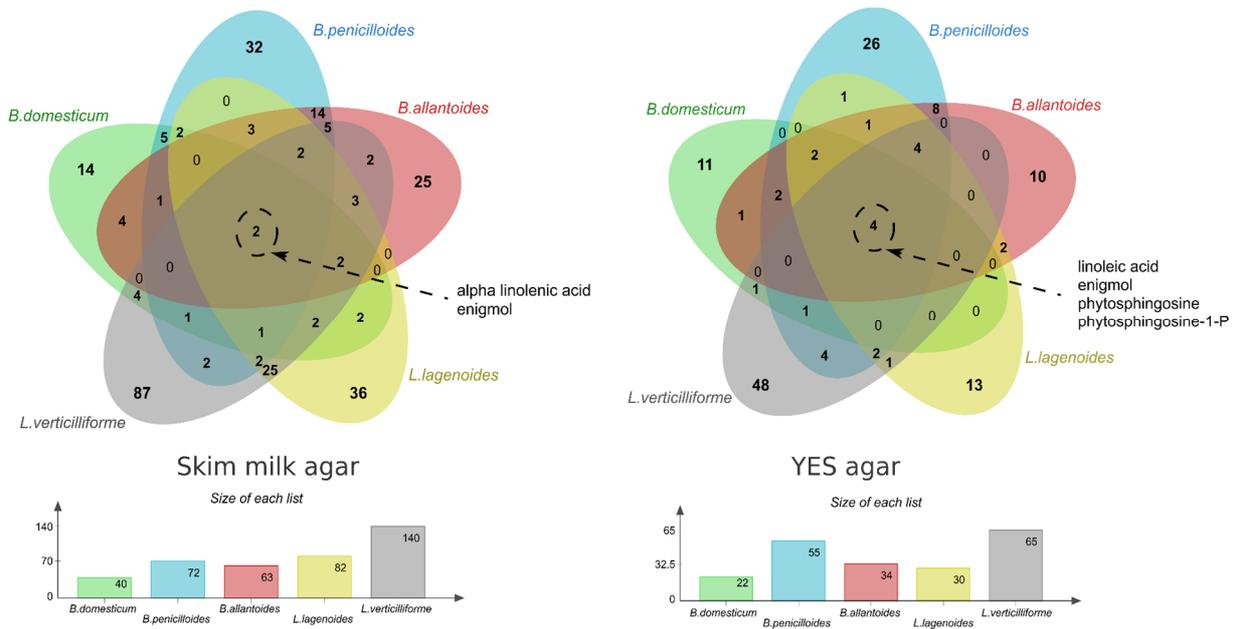


Table 1. *Nectriaceae* spp. strains used for the inter- and intra-specific studies.

Species	Strain code	Substrate/Origin
<i>Bisifusarium</i>	UBOCC-A-120035	Cheese (Manchego, Spain)
<i>allantoides</i>	UBOCC-A-120036 ^{HT}	Soft cheese type (France)
	UBOCC-A-120037	Soft cheese type (France)
<i>Bisifusarium</i>	MNHN RF-05627 ^{NT}	Food (Belgium)
<i>domesticum</i>	UBOCC-A-120001	Commercial adjunct culture (France)
	UBOCC-A-120002	Commercial adjunct culture (France)
	UBOCC-A-120003	Cheese (Raclette d'alpage, Switzerland)
	UBOCC-A-120004	Commercial adjunct culture (France)
<i>Bisifusarium</i>	UBOCC-A-120021 ^{HT}	Cheese (Mont d'Or, France)
<i>penicilloides</i>	UBOCC-A-120034	Cheese (Mont d'Or, France)
	VTT-D-041022	Surface of sandstone building, Arbroath Abbey (Scotland)
<i>Longinectria</i>	ESE 00140	Cheese (Tilsit, France)
<i>lagenoides</i>	UBOCC-A-120038	Cheese (Raclette d'alpage, Switzerland)
	UBOCC-A-120039 ^{HT}	Cheese (Vacherin Fribourgeois, Switzerland)
	UBOCC-A-120041	Raw cow's milk cheese (Switzerland)
<i>Longinectria</i>	UBOCC-A-120043 ^{HT}	Cheese (Alpeggio, Italy)
<i>verticilliforme</i>		

^{HT}holotype, ^{NT}neotype strains.

MNHN: Muséum National d'Histoire Naturelle, France; UBOCC: Université de Bretagne Occidentale Culture Collection, France.

Table 2. Information of the volatile compounds identified by GC-MS on cheese agar and Raclette de Savoie.

Compound (IUPAC name)	Formula	MW (g/mol)	EIC (m/z)	Identification (RI, DB, S)	CAS n°	Odor descriptor*	pvalue (CA)	p value (RCT)
Alcohols								
Ethanol	C2H6O	46.07	46	RI, DB	64-17-5	Alcoholic	1,09E-13	4,20E-07
Furan-2-ylmethanol	C5H6O2	98.10	98	RI, DB	98-00-0	burnt, sweet, caramellic	1,67E-09	0,035
Heptan-2-ol	C7H16O	116.2	101	RI, DB, S	543-49-7	Fruity, earthy, bitter	6,98E-18	1,42E-02
Nonan-2-ol	C9H20O	144.25	126	RI, DB	628-99-9	Waxy, fruity, dairy, musty	6,32E-12	0,052
Non-3-en-1-ol	C9H18O	142.24	81	RI, DB	10340-23-5	Fresh, waxy, green, rind, mushroom	1,17E-06	0,179
Oct-1-en-3-ol	C8H16O	128.21	110	RI, DB	3391-86-4	Mushroom, fungal, earthy, oily	9,83E-12	5,46E-07
Undecan-2-ol	C11H24O	172.31	97	RI, DB	1653-30-1	Fresh, waxy, cotton	9,13E-09	0,101
(Z)-oct-3-en-2-ol	C8H16O	128.21	67	DB	69668-89-9	-	6,47E-13	0,124
1-methoxypropan-2-ol	C4H10O2	90.12	47	RI, DB, S	107-98-2	-	1,73E-03	0,721
2,6-dimethylocta-1,7-dien-3-ol	C10H18O	154.25	97	DB	22460-59-9	-	6,08E-10	0,193
3-methylbutan-1-ol	C5H12O	88.15	55	RI, DB, S	137-32-6	Alcoholic, fatty, winey, cocoa	2,14E-04	0,090
2-phenoxyethanol	C8H10O2	138.16	138	DB	122-99-6	Mild, rose, balsam, cinnamyl	0,286	0,247
Aldehydes								
Benzaldehyde	C7H6O	106.12	105	RI, DB, S	100-52-7	Almond, sweet, bitter	5,90E-15	1,01E-03
Furan-2-carbaldehyde	C5H4O2	96.08	95	RI, DB, S	98-01-1	Sweet, woody, almond	7,56E-10	2,31E-06
Hexanal	C6H12O	100.16	82	RI, DB	66-25-1	Green, fresh, sweaty, fruity	1,92E-04	8,17E-04
Nonanal	C9H18O	142.24	96	RI, DB	124-19-6	Fatty, waxy, orange	3,15E-06	0,055
(E)-non-2-enal	C9H16O	140.22	83	RI, DB	18829-56-6	Fatty, green, citrus	3,41E-10	0,152
(E)-oct-2-enal	C8H14O	126.2	83	RI, DB	2548-87-0	Fresh, cucumber, fatty, waxy	1,91E-10	1,91E-03
2-methylpropanal	C4H8O	72.11	72	RI, DB, S	78-84-2	Fresh, aldehydic, floral, green	1,31E-05	0,233
2-phenylacetaldehyde	C8H8O	120.15	91	RI, DB, S	122-78-1	Green, floral, honey	1,22E-04	0,174
3-methylbutanal	C5H10O	86.13	58	RI, DB, S	590-86-3	Aldehydic, peach, fatty	4,77E-05	0,373
Carboxylic acids								
Acetic acid	C2H4O2	60.05	60	RI, DB, S	64-19-7	Pungent, sour, vinegar	0,785	0,076
2-methylpropanoic acid	C4H8O2	88.11	73	RI, DB, S	79-31-2	Acidic, sour cheese, rancid, buttery	1,16E-04	0,051
3-methylbutanoic acid	C5H10O2	102.13	60	RI, DB, S	503-74-2	Sour, sweaty, cheese	7,65E-02	0,474
2-ethylhexanoic acid	C8H16O2	144.21	116	DB	149-57-5	-	0,329	0,085
Esters								
Ethyl acetate	C4H8O2	88.105	61	RI, DB, S	141-78-6	Ethereal, fruity, sweet, weedy, green	7,96E-03	1,72E-06
Ethyl butanoate	C6H12O2	116.16	116	RI, DB, S	105-54-4	Fruity, juicy, pineapple	3,95E-03	0,100

Table 2. Continued.

Compound (IUPAC name)	Formula	MW (g/mol)	EIC (m/z)	Identification (RI, DB, S)	CAS n°	Odor descriptor*	pvalue (CA)	p value (RCT)
Ethyl hexanoate	C8H16O2	144.21	88	RI, DB, S	123-66-0	Fruity, sweet, pineapple, waxy	1,24E-02	1,12E-03
Ethyl propanoate	C5H10O2	102.13	102	RI, DB, S	105-37-3	Sweet, fruity, rum, grape, pineapple	0,174	0,375
Heptyl acetate	C9H18O2	158.24	98	RI, DB	112-06-1	Fresh, green, rum, fruit	3,67E-12	5,42E-08
Methyl 2-hydroxypropanoate	C4H8O3	104.10	33	DB	547-64-8	-	5,40E-14	0,118
Methyl 2-methyl-3-oxobutanoate	C6H10O3	130.139	130	DB	17094-21-2	-	0,606	9,73E-08
Fatty acids								
Butanoic acid	C4H8O2	88.11	60	RI, DB, S	107-92-6	Cheesy, sour, dairy	0,421	0,032
Heptanoic acid	C7H14O2	130.18	60	RI, DB, S	111-14-8	Rancid, sour, cheesy, sweat	0,787	0,489
Hexanoic acid	C6H12O2	116.16	60	RI, DB, S	142-62-1	Fruity, fatty, sour, cheese	0,617	0,480
Nonanoic acid	C9H18O2	158.24	129	DB	112-05-0	Waxy, cheese, fatty	0,508	0,944
Octanoic acid	C8H16O2	144.21	101	RI, DB, S	124-07-2	Oily, rancid, capric, fatty, cheesy	0,632	0,660
Pentanoic acid	C5H10O2	102.13	60	RI, DB, S	109-52-4	Putrid, acidic, sweaty, rancid	0,393	0,317
Propanoic acid	C3H6O2	74.08	74	RI, DB, S	79-09-4	Acidic, dairy, fruity, cheesy	0,031	0,277
Ketones								
Butan-2-one	C4H8O	72.11	72	RI, DB, S	78-93-3	Fruity, green, acetone-like	4,46E-03	2,43E-04
Butane-2,3-dione	C4H6O2	86.09	86	RI, DB, S	431-03-8	Buttery, sweet, creamy, caramel	2,36E-03	6,58E-04
Cyclotridecanone	C13H24O	196.33	96	DB	832-10-0		1,09E-02	0,086
Decan-2-one	C10H20O	156.26	113	RI, DB	693-54-9	Floral, fatty, peach	2,74E-11	0,177
Heptan-2-one	C7H14O	114.19	58	RI, DB, S	110-43-0	Fruity, sweet, herbal	4,77E-12	7,07E-03
Heptan-4-one	C7H14O	114.19	71	RI, DB	123-19-3	Fruity, cheese, sweet, pineapple	0,059	0,175
Hexan-2-one	C6H12O	100.16	100	RI, DB, S	591-78-6	Fruity, fungal, meaty, buttery	1,30E-08	0,077
Non-8-en-2-one	C9H16O	140.22	97	RI, DB	5009-32-5	Fruity, baked	1,45E-11	2,62E-04
Nonan-2-one	C9H18O	142.24	58	RI, DB, S	821-55-6	Fresh, sweet, green	8,62E-15	4,14E-04
Oct-1-en-3-one	C8H14O	126.2	70	RI, DB	4312-99-6	Herbal, mushroom, earthy	3,06E-05	9,52E-03
Octan-2-one	C8H16O	128.21	58	RI, DB, S	111-13-7	Earthy, woody, herbal	3,52E-14	8,58E-03
Octan-3-one	C8H16O	128.21	99	RI, DB	106-68-3	Fresh, herbal, mushroom, sweet	9,17E-04	1,79E-07
Pentan-2-one	C5H10O	86.13	86	RI, DB	107-87-9	Fruity, fermented, sweet, wine	1,04E-06	0,020
Pentane-2,3-dione	C5H8O2	100.12	100	RI, DB, S	600-14-6	Sweet, butter, creamy, nutty, cheese	0,020	0,495
Propan-2-one	C3H6O	58.08	58	RI, DB	67-64-1	Solvent, ethereal, apple, pear	5,23E-13	1,06E-03

Table 2. Continued.

Compound (IUPAC name)	Formula	MW (g/mol)	EIC (m/z)	Identification (RI, DB, S)	CAS n°	Odor descriptor*	pvalue (CA)	p value (RCT)
Tridecan-2-one	C13H26O	198.34	198	RI, DB	593-08-8	Fatty, waxy, dairy, mily, nutty, herbal	3,20E-04	0,134
Undecan-2-one	C11H22O	170.29	170	RI, DB	112-12-9	Fruity, waxy, creamy, fatty, floral	3,00E-10	1,92E-03
(E)-dec-7-en-2-one	C10H18O	154.25	93	DB	35194-33-3	-	9,11E-07	0,081
1-hydroxypropan-2-one	C3H6O2	74.08	74	RI, DB	116-09-6	Caramellic, sweet, ethereal	2,81E-05	8,23E-03
2(3H)-Furanone, dihydro-3-methyl	C5H8O2	100.12	56	RI, DB	1679-47-6	-	3,30E-07	1,52E-04
3-hydroxybutan-2-one	C4H8O2	88.11	88	RI, DB, S	513-86-0	Sweet, buttery, creamy, dairy, milky, fatty	0,042	2,67E-03
3-methylpentan-2-one	C6H12O	100.16	72	RI, DB	565-61-7	-	5,72E-09	2,89E-07
Phenols								
Phenol	C6H6O	94.11	94	DB	108-95-2	Phenolic, plastic	1,84E-04	0,196
4-methylphenol	C7H8O	108.14	108	DB	106-44-5 9	Phenolic, animal, mimosa	2,19E-08	1,08E-05
Others								
Methylsulfonylmethane	C2H6O2S	94.14	94	DB	67-71-0	Sulfurous, burnt	0,069	0,203
(methylsulfonyl)methane	C2H6S2	94.2	94	RI, DB, S	624-92-0	Sulfurous, vegetable, malty	0,245	0,765
3-methylsulfonylpropanal	C4H8OS	104.17	104	RI, DB, S	3268-49-3	Musty, potato, tomato, vegetable, creamy	1,64E-05	0,045
2,5-dimethylpyrazine	C6H8N2	108.14	108	RI, DB, S	123-32-0	Nutty, Roasted, baked, potato	0,411	0,031
Styrene	C8H8	104.15	104	RI, DB	100-42-5	Sweet, balsam, floral, plastic	0,617	0,020

The compounds names are according to the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) nomenclature,

EIC (m/z): mass fragment used for quantification.

Identification was performed based on the following criteria: comparison of LRI calculated with data published in the literature and in intern (RI), comparison of mass spectral data with those of NIST 2008 library (DB) and comparison of LRI with those of authentic standards injected in the same GC- MS system (S).

*Odor descriptor associated with the compounds, based on Thegoodscentscompany database (<http://www.thegoodscentscompany.com>)

*pvalue (CA) and (RCT) were obtained from ANOVA performed on cheese agar and Raclette de Savoie samples respectively. The pvalue are highlighted by three shade of grey corresponding to pvalue ≤ 0.001; ≤0.01; ≤0.005.

Supplementary data

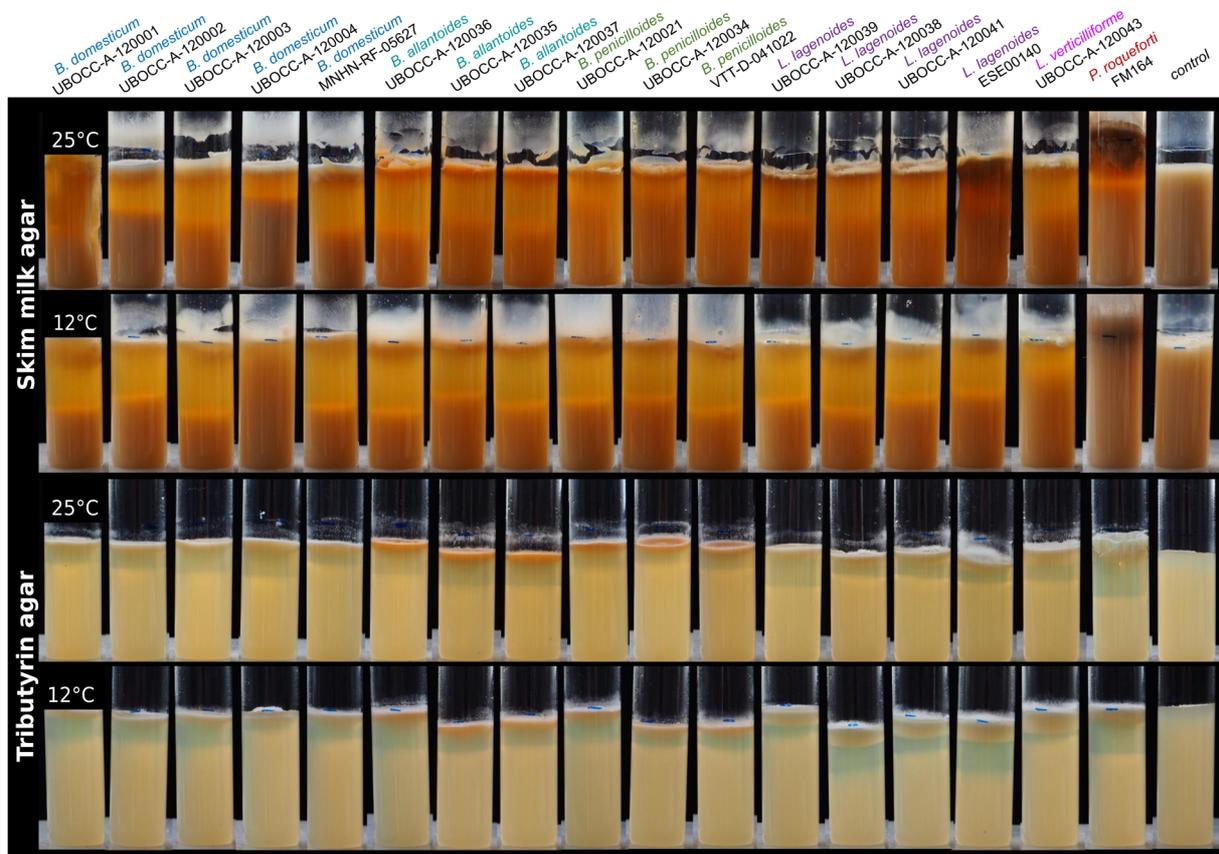


Figure S1: Observations of proteolysis and lipolysis tests after 24 days of incubation at 25°C and 12°C. Each column represents a studied isolate and its code is written on the first line. Each tube corresponds to a culture (25 μ L at 10^5 conidia/mL) carried out on “skim milk agar” (lines one and two) and “tributyryn agar” (lines three and four). The activities are observed by the clear zone formation. Only one out three replicates were presented on this figure.

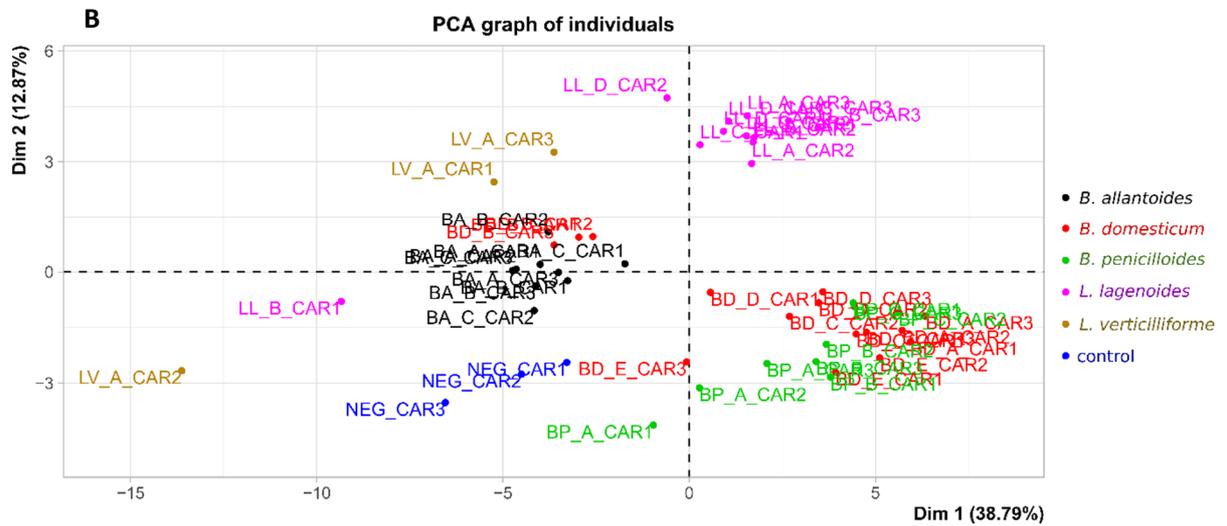
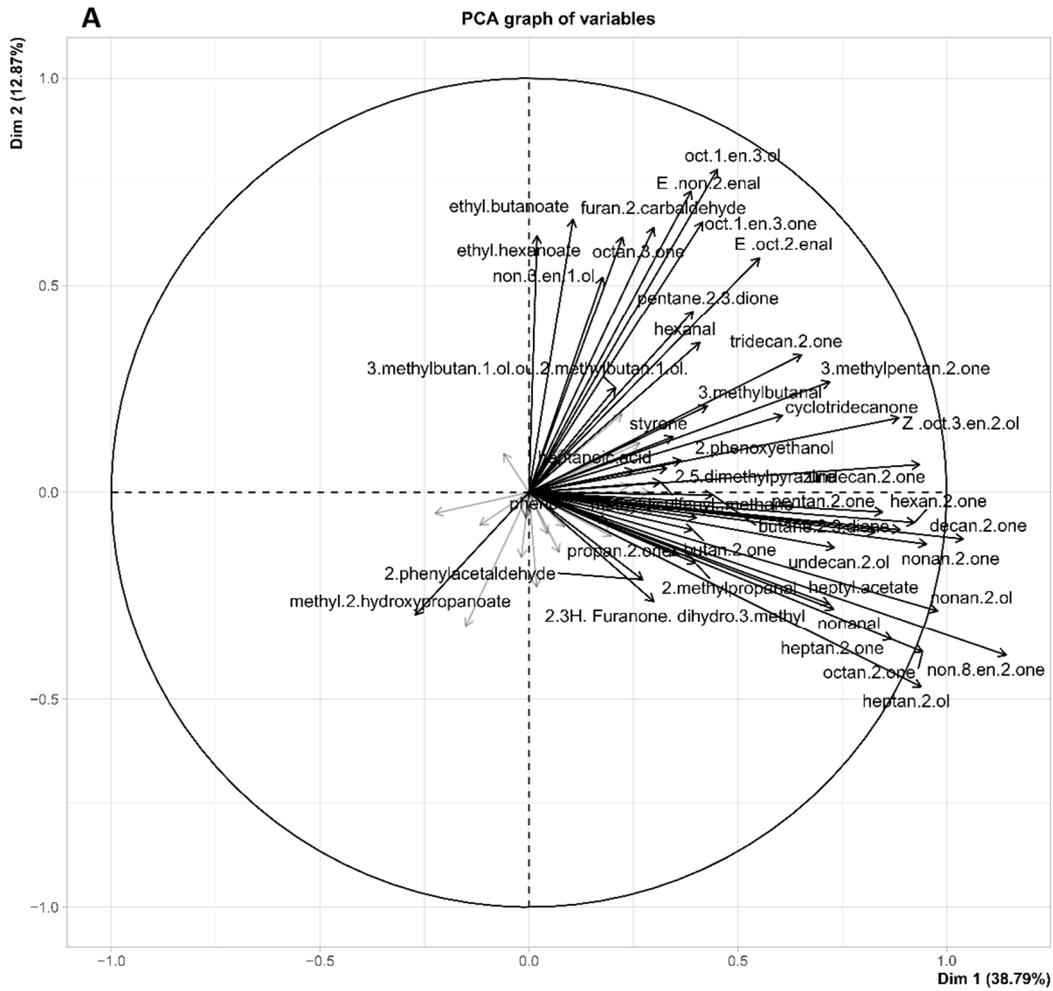


Figure S2: Principal component analysis on 68 volatile compounds detected from cheese agar cultures of the studied *Nectriaceae* species. The data were obtained from cheese mimicking medium (cheese agar) inoculated independently by *B. allantoides* (n= 3), *B. domesticum* (n=5), *B. penicilloides* (n=3), *L. lagenoides* (n=4) and *L. verticilliforme* (n=1) or tween as a negative control, and incubated for 25 days at 12°C in the dark. Variable factor map (A) and Individual factor map (B) are represented, and the colors correspond to the five species and the negative control (non inoculated medium). The volatiles poorly represented on plot (A) are not shown ($\cos^2 < 0.2$). The samples were noted with the abbreviations described below with the information “_CAR1”, “_CAR2”, “_CAR3” corresponding to replicate 1, 2, 3 on cheese agar, respectively. BA_A, BA_B and BA_C correspond to *B. allantoides* UBOCC-A120035, UBOCC-A-120036 and UBOCC-A-1200037. BD_A, BD_B, BD_C, BD_D and BD_E correspond to *B. domesticum* MNHN-RF-05627, UBOCC-A-120001, UBOCC-A-120002, UBOCC-A-120003 and UBOCC-A-120004. BP_A, BP_B and BP_C correspond to *B. penicilloides* UBOCC-A-120021, UBOCC-A-120034 and VTT-D-041022. LL_A, LL_B, LL_C and LL_D correspond to *L. lagenoides* ESE000140, UBOCC-A-120038, UBOCC-A-120039 and UBOCC-A-120041. LV_A correspond to *L. verticilliforme* UBOCC-A-120043 while the negative control is noted NEG.

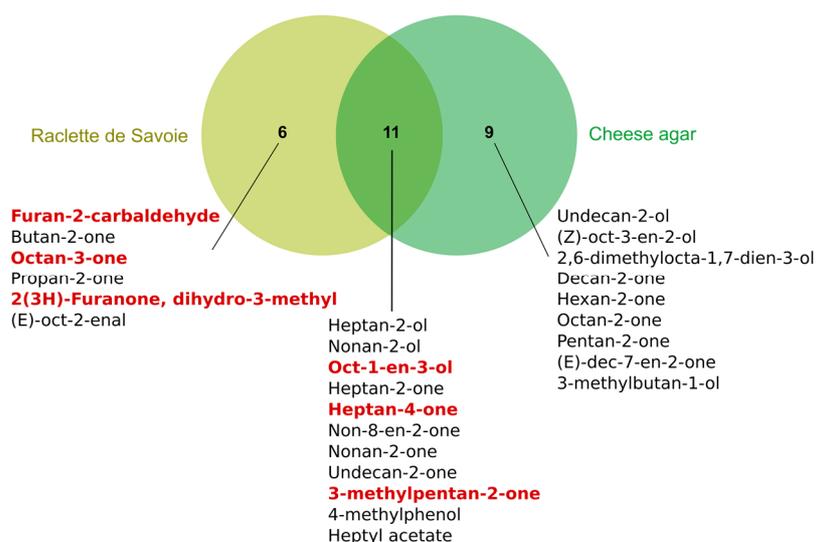


Figure S3: Venn diagram representing volatiles of *B. domesticum* isolates on Raclette de Savoie and cheese agar. Numbers correspond to the compounds specific to one medium or shared by both media highlighted by the circles. The compounds produced by the five isolates are in red and bold. The diagrams were obtained using the “jvenn” online tool (Bardou et al., 2014).

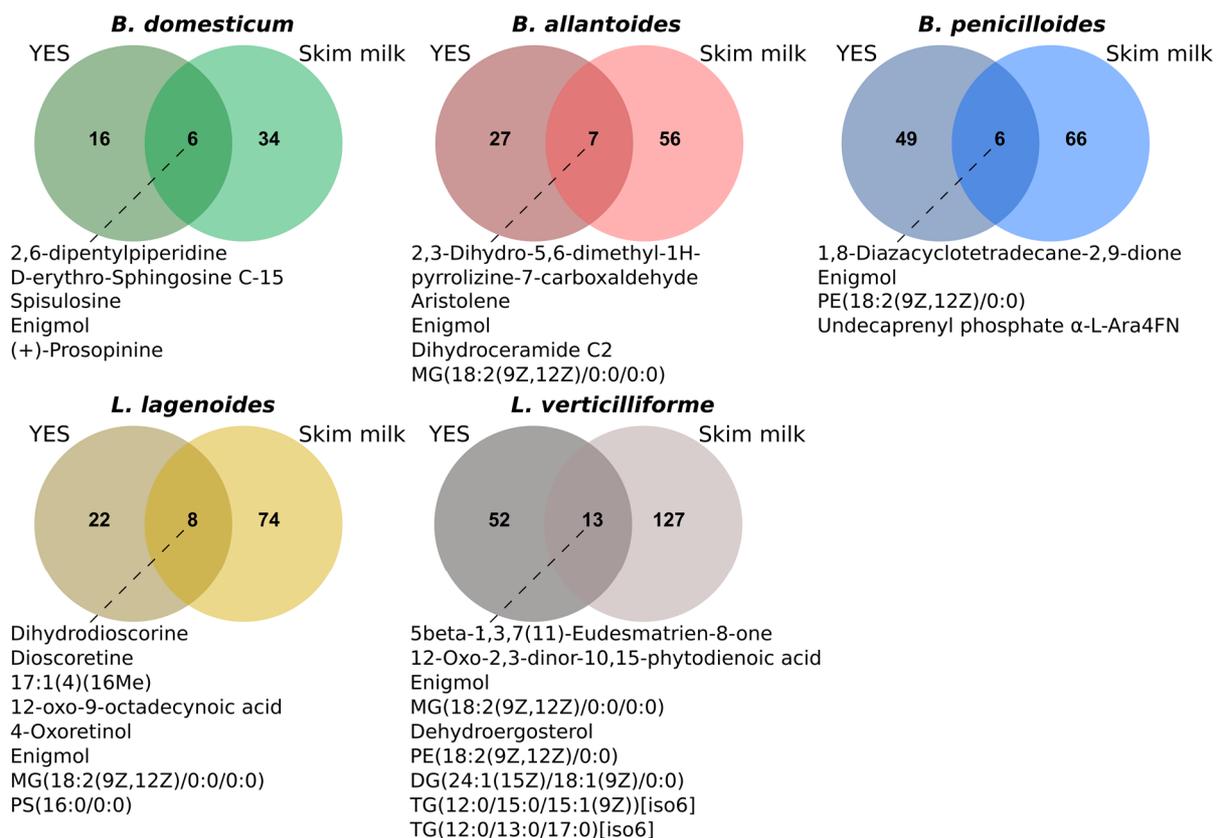


Figure S4: Venn diagram representing extrolite profiles comparison on skim milk agar vs. YES agar. Numbers correspond to the compounds specific to one medium or shared by both media highlighted by the circles for the considered species. The compounds produced in both media are noted. The diagrams were obtained using the “jvenn” online tool (Bardou et al., 2014).

III. Annexe de la publication n°3

III.1. Aspects macroscopiques

Lors de l'étude fonctionnelle présentée dans la **publication n°3**, de façon intéressante, des différences d'aspect du mycélium ont pu être notées entre les différents milieux utilisés. En effet, d'une part, dans le contexte de l'étude de l'activité protéolytique, des premiers tests ont été effectués sur milieu "skim milk agar" en boîte de Petri révélant, en particulier pour *B. domesticum*, un aspect du mycélium plus aérien et développé sur ce milieu comparativement au PDA (**Figures 23 et 24**). D'autre part, les cultures réalisées pour l'analyse de production de composés volatiles ont également présenté un aspect du mycélium beaucoup plus développé sur "cheese agar" et Raclette de Savoie comme illustré pour *B. domesticum* sur la **Figure 25**. Enfin, la réalisation des cultures pour les analyses des extrolites a également mis en évidence une croissance très impactée de *B. domesticum* sur milieu YES (**Figure 26**).

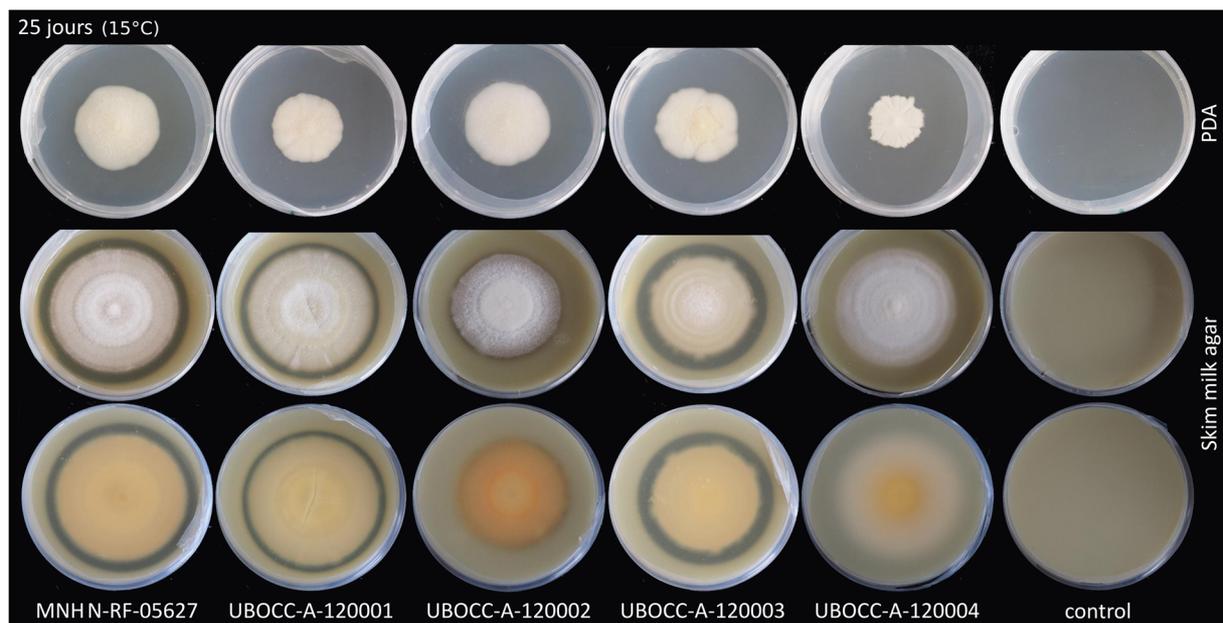


Figure 23 : Test préliminaire d'activité protéolytique effectué pour *B. domesticum*, après 25 jours de croissance à 15°C. Sont représentées sur la première ligne les croissances sur milieu PDA photographiées en vue du dessus, tandis que les seconde et troisième lignes correspondent aux croissances sur "skim milk agar" en vue du dessus et du revers respectivement. Chaque culture a été réalisée par un inoculum de 2 μL à 5×10^5 spores/mL. Ce test préliminaire a été réalisé avec trois réplicats techniques.

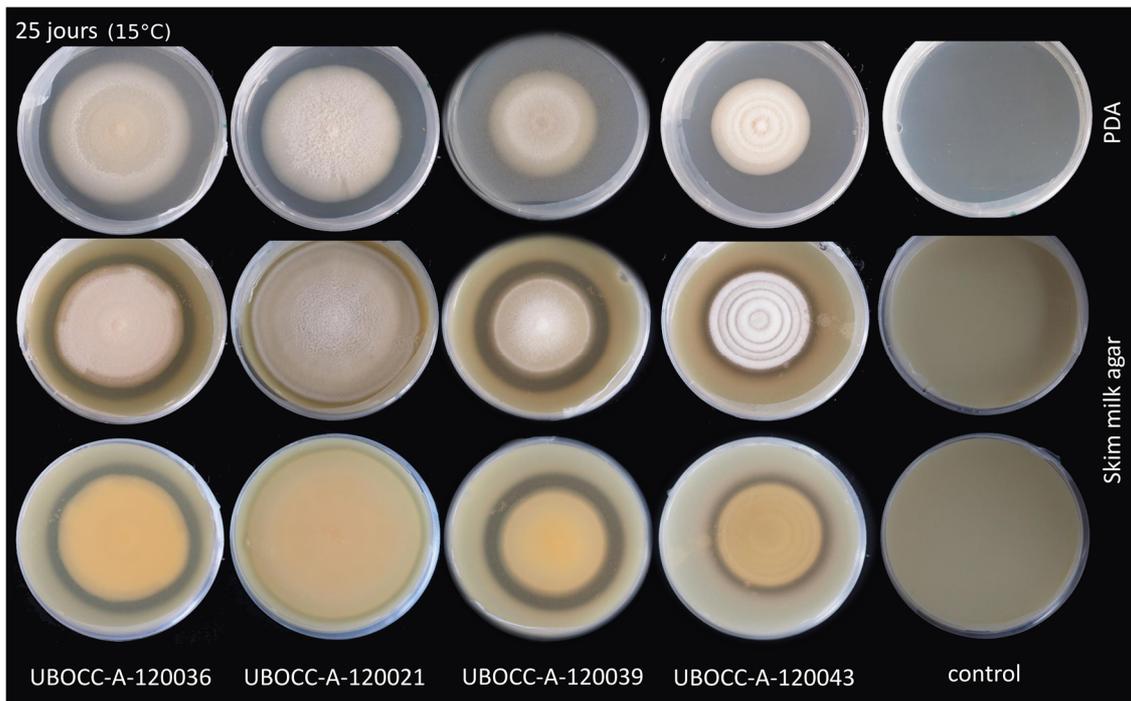


Figure 24 : Test préliminaire d'activité protéolytique effectué pour les quatre néotypes des *Nectriaceae* spp. nov. associées au fromage, après 25 jours de croissance à 15°C. Sont représentées sur la première ligne les croissances sur milieu PDA photographiées en vue du dessus tandis que les seconde et troisième lignes correspondent aux croissances sur "skim milk agar" en vue du dessus et du revers respectivement. Les quatre premières colonnes correspondent respectivement aux isolats *B. allantoides* UBOCC-A-120036, *B. penicilloides* UBOCC-A-120021, *L. lagenoides* UBOCC-A-120039, *L. verticilliforme* UBOCC-A-120043 et la dernière colonne au contrôle. Chaque culture a été réalisée par un inoculum de 2 μL à 5×10^5 spores/mL.

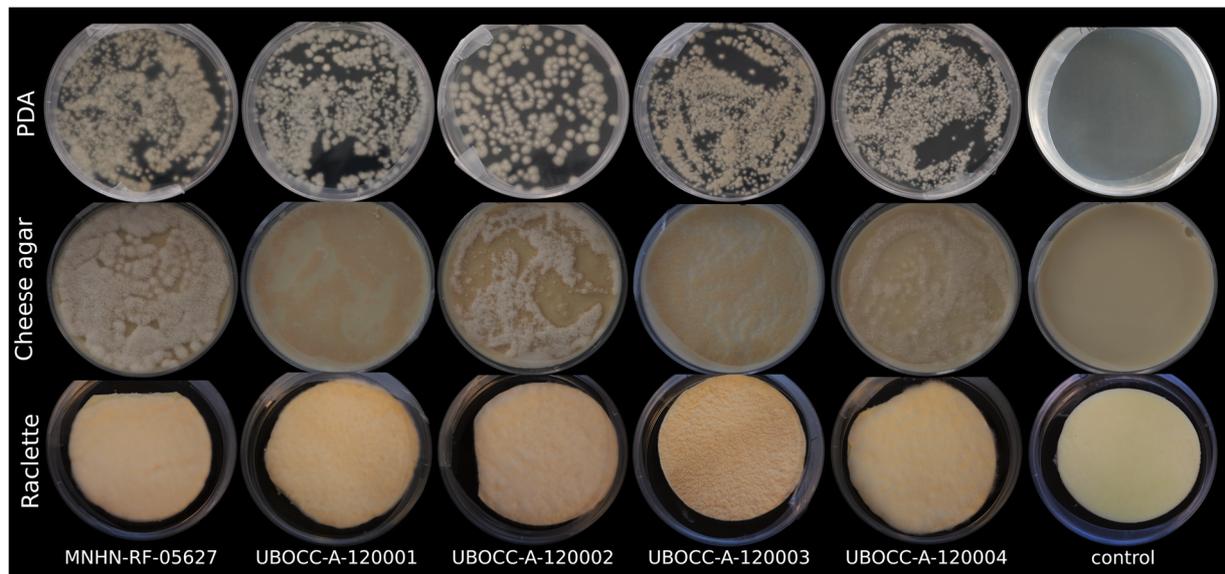


Figure 25 : Aspect macroscopique des cultures de *B. domesticum* pour l'analyse de production de composés volatils. Sont représentées sur la première ligne les croissances sur milieu PDA, tandis que les seconde et troisième lignes correspondent aux croissances sur "cheese agar" et sur Raclette de Savoie, respectivement, après une incubation de 25 jours à 12°C. Cette étude a été réalisée avec trois réplicats techniques. Chaque culture a été réalisée par un inoculum par un tapis de 100 μL à 10^5 spores/mL.

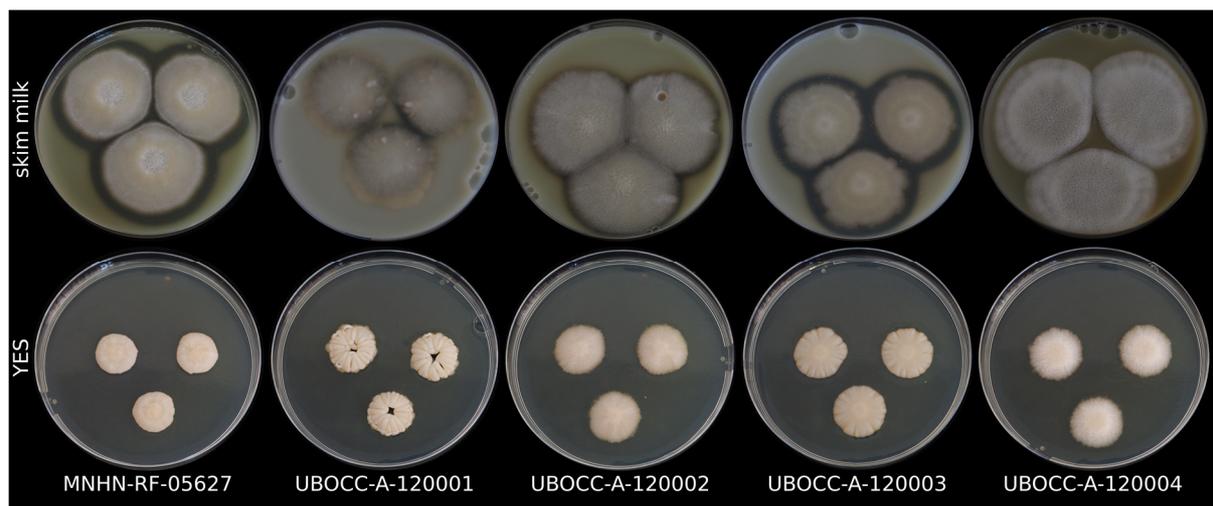


Figure 26 : Cultures de *B. domesticum* sur “skim milk agar” et “YES agar” après 14 jours d’incubation à 25°C. Sont représentées sur chaque ligne les croissances sur milieux “skim milk agar” et YES agar pour chacun des isolats de *B. domesticum*. Les croissances ont été effectuées par trois dépôts d’un inoculum de 5 μL à 10^6 spores/mL et une incubation de 14 jours à 25°C. Cette étude a été réalisée avec trois réplicats techniques.

III.2. Analyses complémentaires

III.2.1. Évaluation du potentiel de bioprotection de *B. domesticum*

L’utilisation de *B. domesticum* en production fromagère est largement répandue, toutefois comme précédemment décrit, son rôle sur le fromage n’est que très peu documenté hormis son rôle “*anticollanti*”. Sur la base des travaux de Bachman et al. (2003 & 2005) qui indiquent que la problématique de la morge collante est d’origine microbienne, cette propriété “*anticollanti*” correspondrait donc à une faculté bioprotectrice de *B. domesticum*. Dans ce contexte, on peut donc s’interroger sur son potentiel de bioprotection à l’encontre de contaminants fongiques. Pour évaluer ce potentiel, une étude a été menée (dans le cadre de deux stages réalisés par Charles Le Bras -Master 2- et Myriam Ferblantier -Master 1-) en confrontant *B. domesticum* (trois isolats) et trois espèces fongiques *G. candidum*, *P. biforme* (précédemment *P. commune*) et *P. roqueforti* (trois isolats également pour chacune de ces espèces). Brièvement, l’étude a été réalisée grâce à des cultures de *B. domesticum* effectuées à 25°C sur PDA et “cheese agar” (tapis de 100 μL à 10^6 spores/mL) sur lesquelles après un, quatre ou huit jours d’incubation a été inoculé l’isolat du contaminant à tester (2 μL à 10^5 spores/mL). La croissance radiale des différents contaminants a ensuite été suivie jusqu’à 25 jours (trois réplicats). De façon très intéressante, il a pu être observé que *B. domesticum* induisait une diminution de la croissance de tous les isolats testés et cela dès un seul jour de culture pré-challenge. Toutefois, des différences d’efficacité ont pu être notées aussi bien en fonction i) des isolats de *B.*

domesticum, MNHN-RF-05627 étant la plus efficace à l'inverse de UBOCC-A-120004, *ii*) des espèces cibles, *P. roqueforti* étant l'espèce la plus apte à croître dans les conditions testées et *iii*) en fonction du milieu, la bioprotection étant favorisée sur milieu cheese agar révélant ainsi des propriétés de *B. domesticum* en lien avec son habitat fromager (**Figure 27**).

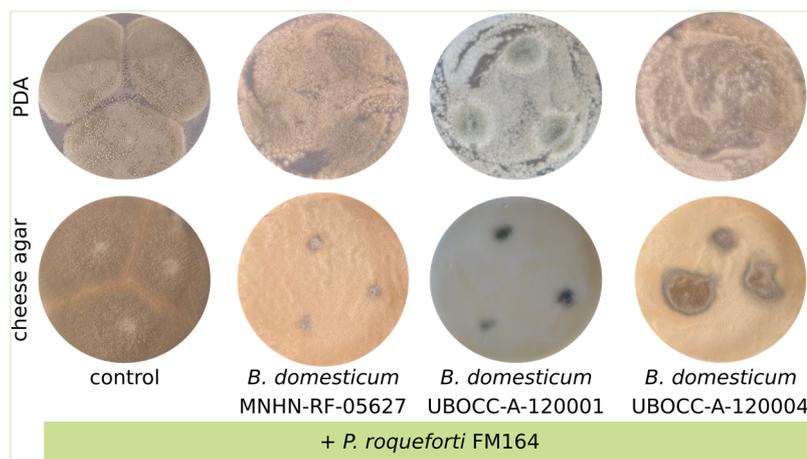


Figure 27 : Observation d'un test de bioprotection de *B. domesticum* contre *P. roqueforti* FM164. Sont représentées les cultures de *P. roqueforti* après dix jours d'une croissance d'un inoculum déposé après un jour de croissance de *B. domesticum*.

III.2.2. Recherche de production de composés d'intérêts

Dans le cadre des investigations de production de métabolites secondaires, lors des analyses HPLC-DAD effectuées par le Pr. Jens C. Frisvad, des extrolites ont été identifiés selon leurs groupements chromophores, toutefois certains composés n'ont pas pu être identifiés plus précisément malgré l'utilisation d'une base de données très complète, suggérant ainsi la présence de nouveaux composés encore jamais décrits. De plus, d'après ses observations, certains de ces composés pourraient correspondre à des lipopeptides cycliques (incluant de la tyrosine), or cette famille de molécule est connue pour présenter des propriétés antimicrobiennes. Ainsi, la présence d'un tel composé pourrait expliquer le potentiel de bioprotection précédemment observé c'est pourquoi, il nous a semblé très intéressant de chercher à identifier ce(s) composé(s) lipopeptidique(s) putatif(s). Pour cela, diverses analyses RMN et MALDI-TOF ont été effectuées par Nelly Kervarec à la plateforme "spectrométrie de masse" de l'UBO afin de mettre en évidence ces composés. Des signaux caractéristiques de la tyrosine et des acides gras ont ainsi pu être observés ; cependant, malgré des analyses poussées, il n'a pas été possible de formellement confirmer l'existence d'une liaison et ainsi l'identification de ces composés n'a pas pu aboutir.

D'autre part, toujours dans le cadre des analyses HPLC-DAD et LC-Q-TOF, une production d'acide gras a pu être observée avec également des molécules présentant des masses supérieures à 1000 Da,

ce qui est en accord avec les analyses RMN et MALDI-TOF. De ce fait, des analyses sont actuellement en cours menées par la plateforme LIPIDOCEAN du laboratoire LEMAR (UBO), afin de générer des profils de production d'acides gras chez *B. domesticum*, *B. allantoides*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* et *L. verticilliforme* à partir d'extraits obtenus dans les mêmes conditions que pour les analyses LC-Q-TOF à partir de trois cultures effectuées sur skim milk agar et YES agar.

IV. Etude *in silico* du potentiel mycotoxigénique

IV.1. Contexte et approche expérimentale

Afin d'évaluer le potentiel de production de métabolites secondaires, et plus spécifiquement de mycotoxines, par les espèces de *Nectriaceae* associées au fromage, une étude génomique ciblée a été entreprise via l'application de l'outil "*Fungal antiSMASH*" (v6.0) (Blin et al., 2021). Celui-ci recherche la présence de signatures connues associées à des clusters de gènes portant des voies de biosynthèse de métabolites secondaires (e.g. non-ribosomal peptide synthase -NRPS-, polyketide synthase -PKS-, terpene synthase -TPS-) au sein d'un génome. Ainsi, sur la base des génomes séquencés présentés dans le chapitre I de ce manuscrit, une étude a été réalisée sur les génomes de *B. domesticum* (n=5), *B. allantoides* (n=1), *B. penicilloides* (n=1), *L. lagenoides* (n=2) et *L. verticilliforme* (n=1). Par ailleurs, à titre comparatif, les génomes de deux autres espèces de *Bisifusarium* (*B. dimerum* et *B. penzigii*), récemment accessibles dans les bases de données, ont également été inclus dans cette même analyse ainsi que celui de *Fusarium venenatum*, en tant que "outgroup" étant utilisé pour la production de Quorn (substitut de viande à base de mycoprotéines), autorisé dans certains pays pour la consommation humaine (King et al., 2018). Du fait de l'ajout de la description des nouvelles espèces aux travaux de thèse, l'obtention des génomes a eu lieu tardivement, il ne s'agit donc ici que des résultats exploratoires qui mériteraient d'être approfondis.

IV.2. Résultats

La présence de clusters de gènes a ainsi été identifiée au sein des différents génomes (**Tableau 8**) avec, dans certains cas, une proposition d'identification selon la base de données "*MIBiG*" qui n'est cependant qu'indicative, et avec même parfois, un pourcentage de similarité très éloigné. Au sein des génomes étudiés, une présence majoritairement de NRPS ou "NRPS-like" (7–17), de PKS (3–8), de TPS (3–6) a été notée, et en moindre mesure des clusters associés à des sidérophores, la bétalactone ou le phosphonate. De manière intéressante, on notera que *B. domesticum* et *B. penicilloides* sont les espèces ayant le moins de clusters de gènes (n=15–17 et n=23 respectivement), par rapport à *B. allantoides* (n=23), *L. lagenoides* (n=28–29), *L. verticilliforme* (n=34) ou encore *B. dimerum* (n=29), *B. penzigii* (n=27) et *F. venenatum* (n=36).

Parmi les différents clusters détectés, seuls quelques-uns ont pu avoir une proposition d'identification. Ainsi le cluster de gènes associé à la squalestatine S1 a été « identifiée » pour les treize génomes étudiés avec une identification du cluster évaluée à 40 % de similarité par rapport à la base de donnée "*MIBiG*", tandis que les clusters de gènes associés au diméthylcoprogène et à la duclauxine

ont été identifiés dans les douze génomes *Bisifusarium* spp. et *Longinectria* spp. étudiés avec une identification à 100 % et entre 14 et 42 % respectivement. Concernant la squaléstatine S1 et la duclauxine, de par leurs faibles pourcentages d'identification, il est très probable que ces clusters ne correspondent pas en réalité à ceux proposés mais à un cluster proche associé à la production d'un même composé chez tous ces isolats. D'autre part, au niveau intraspécifique, il a pu être relevé pour *B. domesticum* qu'un cluster de gènes associé à la sorbicilline identifié à 28 % était présent pour quatre des cinq isolats mais non détecté pour l'isolat UBOCC-A-120004. Il conviendra donc de s'assurer que cette absence est bien réelle et non associée à un souci d'assemblage du génome. Concernant *L. lagenoides*, représentée par deux génomes, tandis qu'une proposition d'identification commune à 30 % pour le cluster de l'acetylaranotine a été notée, seul UBOCC-A-120039 donne la présence de la destruxine A mais à seulement 9 % de similarité avec la base de données. Le fait le plus notable est que malgré quelques identifications présomptives, aucun cluster de gènes associés aux mycotoxines n'a été détecté pour les espèces associées au fromages et seul celui associé à la mycotoxine fusarine l'a été chez *B. dimerum* et *B. penzigii*. Enfin, il est intéressant de noter concernant l'analyse du génome de *F. venenatum*, commercialisé en tant qu'aliment (Quorn : mycoprotéine), qu'il présenterait un potentiel mycotoxinogénique supérieur. En effet, au sein de ce dernier, le cluster de gènes associé à une enniatine synthétase a été détecté avec un pourcentage de 100 % de similarité avec les bases de données, mais aussi les clusters de gènes des mycotoxines "fusarine" et "deoxynivalenol" à 66% et 44%, respectivement. Ces résultats préliminaires sont donc en accord avec les résultats d'études des extrolites réalisées et plaident donc en faveur de l'innocuité de ces espèces. Cependant, un certain nombre de clusters de gènes et d'extrolites n'étant pas encore connus, il faut rester prudent. Dans ce contexte, des études toxicologiques directement avec des surnageants de cultures ou des extraits d'extrolites seraient d'intérêt.

Tableau 8. Nombres et types de clusters de gènes identifiés au sein des génomes de *Bisifusarium* spp. et *Longinectria* spp.. Sont indiqués le nombre de clusters de gènes identifiés pour chaque isolat sur la base de l'analyse antiSMASH. L'analyse du génome de *F. venenatum* est également présente en "outgroup".

Species	<i>B. domesticum</i>			<i>B. allantoides</i>		<i>B. penicilloides</i>	<i>L. lagenoides</i>	<i>L. verticilliforme</i>	<i>B. dimerum</i>	<i>B. penzigii</i>	<i>F. venenatum</i>		
	ESE00042	ESE00064	LMA 587	NRRL 29976	UBOCC-A-120004	UBOCC-A-1200036	UBOCC-A-1200021	UBOCC-A-1200039	ESE00140	UBOCC-A-1200043	NRRL 20691	NRRL 20711	NRRL 66329
NRPS, NRPS-like	8	8	8	7	8	13	10	15	15	17	10	12	15
PKS	5	5	5	5	3	5	5	5	5	8	8	8	6
TPS	4	4	4	3	4	3	3	6	6	6	5	5	9
NRPS, PKS	-	-	-	-	-	2	-	1	1	-	6	2	4
Siderophore	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
Betalactone	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2	-	-	2
Phosphonate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
Total	17	17	17	15	15	23	18	29	28	34	29	27	36

V. Résultats majeurs du chapitre III

Pour ce troisième chapitre, on peut résumer les résultats majeurs comme suit :

- Mise en évidence d'**activités lipolytiques** et **protéolytiques** des espèces *Nectriaceae* associées au fromage, variant selon les espèces, isolats et température
- Activité protéolytique **supérieure à 12°C** par rapport à 25°C pour certains isolats de *B. domesticum*, *B. penicilloides* et *L. lagenoides*.
- Production de **composés volatils** sur "cheese agar" supérieure pour *B. domesticum* et *B. penicilloides*
- **Pas de production de mycotoxines connues** mais production de métabolites secondaires *a priori* jamais décrits, dont des **lipopeptides** aux propriétés potentiellement **antimicrobienne**
- **Pas de cluster de gènes** correspondant à des **mycotoxines connues** au sein des génomes de *B. domesticum*, *B. allantoides*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* et *L. verticilliforme*
- Potentiel de **bioprotection** de *B. domesticum* par une diminution ou inhibition de la croissance de *G. candidum*, *P. biforme* et *P. roqueforti*

Discussion générale et perspectives

Les champignons filamenteux, au même titre que les bactéries, sont intimement associés à la production de nombreux aliments fermentés tels que les fromages. Si certains sont des contaminants des matrices alimentaires pouvant avoir un rôle altérant ou pathogène, d'autres, au contraire, ont un rôle bénéfique voire primordial, sous les angles nutritionnels, organoleptiques et de conservation. Parmi ces micro-organismes d'intérêt, on retrouve certaines moisissures qui sont particulièrement actives au moment de l'affinage, participant alors à la richesse des variétés de fromage existantes en contribuant, *in fine*, aux caractéristiques de ceux-ci, en termes d'aspect, de couleur, de texture, de saveurs et d'arômes. De ce fait, certaines espèces fongiques, dont l'impact a largement été démontré, sont ajoutées volontairement au cours de la production du fromage (e.g. inoculation dans le lait, solution de lavage). Certaines espèces jouent un rôle majeur dans la production fromagère pour obtenir la typicité attendue du produit final, comme c'est le cas des espèces emblématiques très étudiées *P. camemberti* et *P. roqueforti* (Coton et al., 2020; Ropars et al., 2020), d'autres peuvent être utilisées pour l'optimisation d'un processus industriel ou pour contrer un défaut, comme c'est le cas de *B. domesticum*, alias *anticollanti* (Bachmann et al., 2003, 2005), qui est proposé aux professionnels par les fournisseurs de ferments industriels pour prévenir les cas de fromages à morge collante. Cependant, comme mis en avant tout au long de ce manuscrit, malgré une utilisation fréquente de cette espèce par les industriels, et un isolement régulier dans divers fromages a priori non inoculés, il n'y avait que très peu de connaissances scientifiques concernant cette espèce. En effet, en amont de ces travaux de thèse, hormis les articles décrivant cette espèce ou rapportant sa présence dans certains fromages, aucune étude de connaissance fine de cette espèce n'avait été entreprise. Ainsi, divers questionnements demeuraient, tant d'ordres génétique et génomique que d'ordres physiologique et fonctionnel. Chacun de ces axes ayant un intérêt considérable dans le cadre de l'approfondissement des connaissances actuelles de l'espèce *B. domesticum*, l'organisation de cette thèse s'est alors tout naturellement orientée selon trois axes d'études (i.e. étude génétique, étude physiologique et étude fonctionnelle).

Mise en place de la collection de culture : qu'elle est l'occurrence de *B. domesticum* au sein de divers fromages ?

Dans un premier temps, une collection d'isolats de *B. domesticum* a été mise en place à partir *i)* des souches disponibles dans les collections de cultures internationales (n=13) et *ii)* des souches commercialisées ou utilisées en tant que ferments industriels (n=3). Ce nombre paraissant restreint pour envisager de répondre aux questionnements scientifiques de la thèse, en particulier ceux

concernant les diversités et les variabilités intraspécifiques, une campagne d'isolements sur des fromages susceptibles d'être colonisés par cette espèce (n=46 fromages, e.g. Saint-Nectaire, Reblochon, Mont d'Or, Raclette d'alpage, Appenzeller) a été réalisée sur une période d'environ quatre mois portant le total à 25 isolats. Il est à noter que du fait de l'accessibilité de souches commerciales et sans connaissance des procédés de production des fromages analysés, il se peut que certains isolats correspondent en fait à des ferments industriels. De prime abord, le dimensionnement de la collection peut paraître faible, en particulier si on le compare par exemple à la collection de travail mise en place et utilisée précédemment au laboratoire pour *P. roqueforti* (n > 200 isolats en provenance du monde entier) et dont les objectifs étaient proches. Cependant, cette différence s'explique par une des caractéristiques même de *B. domesticum*, à savoir son association a priori exclusive à la matrice fromagère, ce qui n'est pas le cas de l'espèce *P. roqueforti* pour laquelle il existe des isolats fromagers mais aussi d'autres associés au bois de coupe, à l'ensilage ou à divers produits alimentaires (Coton et al, 2020; Dumas et al., 2020). Ainsi, de ce point de vue, *B. domesticum* se rapproche du cas de *P. camemberti*, récemment différenciée génétiquement en deux variétés *P. camemberti* var. *camemberti* et var. *caseifulvum*, et qui est une espèce également inféodée à la matrice fromagère et très clonale (Ropars et al., 2020). Malgré sa taille réduite, cette collection d'isolats de *B. domesticum* est à notre connaissance, la plus large collection existante à ce jour. A l'avenir, il pourrait être d'intérêt d'étendre les isolements à des fromages artisanaux et fermiers provenant de différents pays pour essayer d'enrichir cette collection.

Diversité inattendue d'isolats fromagers de *Nectriaceae* : quel est le positionnement taxonomique des isolats non identifiés à l'espèce ?

La campagne d'isolement couplée au séquençage du gène *tef1* ("code-barres" préconisé pour l'identification taxonomique des champignons fusarioïdes) des isolats obtenus par nos soins a permis également d'aboutir à deux constats. Le premier est que des espèces déjà connues mais généralement associées à d'autres environnements (i.e. *Fusarium babinda*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *F. solani sensu lato* qui sont ordinairement isolées de sols et débris de plantes) étaient retrouvées sur des fromages mais de manière ponctuelle et correspondraient a priori à des contaminants environnementaux. Le second, et de manière très intéressante dans le cadre cette thèse, concerne le fait que certains isolats, fréquemment présents et présentant un aspect que l'on peut qualifier de "*Fusarium-like*", n'ont pas pu être directement assignés à des espèces décrites à ce jour. En effet, une première analyse sur la base des séquences du gène *tef1* suggérait que ces isolats pourraient correspondre à de nouvelles espèces appartenant au genre *Fusarium sensu lato* et pour certains

isolats, plus précisément au genre *Bisifusarium*. Sachant que jusqu'à présent, au sein du genre *Bisifusarium*, et plus largement de la famille *Nectriaceae*, seule *B. domesticum* était décrite comme associée au fromage, il nous a semblé d'intérêt de poursuivre l'étude des isolats correspondants. Pour ce faire, une étude combinant des approches phénotypique et phylogénétique, réalisée grâce aux séquençages des dix même *loci* que ceux précédemment utilisés par Lombard et al. (2015), ont conduit à l'identification de nouvelles espèces appartenant, d'une part, au genre *Bisifusarium*, pour *B. allantoides* et *B. penicilloides*, et, d'autre part, à un nouveau genre nommé *Longinectria* comportant actuellement deux espèces, *L. lagenoides* et *L. verticilliforme*. Ce volet supplémentaire a permis la description de ces quatre nouvelles espèces (dont les génomes ont été séquencés) et a démontré une diversité inattendue des moisissures "*Fusarium-like*" dans les fromages (**publication n°1**).

Comme présenté dans le chapitre I., à l'exception d'un isolat de *B. penicilloides*, provenant d'une surface extérieure de ruines d'une abbaye, tous les isolats proviennent de l'environnement fromager. De plus, il est intéressant de rappeler que le but de la démarche adoptée à partir des cultures "de broyats de croûtes" était de sélectionner les isolats pouvant être des *B. domesticum*, et ce uniquement sur des fromages susceptibles d'héberger cette espèce, et non à donner une vision exhaustive du microbiote fongique ou bien même de découvrir de nouvelles espèces. On peut alors penser qu'avec une approche moins restrictive, davantage d'isolats appartenant aux nouvelles espèces auraient pu être isolés. Dans ce sens, on notera qu'un des quatre isolats de *L. lagenoides* nous a été également fourni directement par des collègues sur la base d'une approche identique d'exploration du microbiote de surface des fromages et récemment, un cinquième isolat, isolé par leurs soins, semble correspondre à cette même espèce, sur la base d'un seul gène (*tub2*) ce qui peut laisser penser que cette nouvelle espèce serait effectivement fréquemment associée à la matrice fromagère. Une hypothèse qui serait d'autant plus plausible au regard d'une récente étude métagénétique de grande envergure menée sur un grand nombre d'échantillons de fromages AOP qui présenteraient une fréquence notable de cette espèce (Cécile Neuvéglise, communication personnelle). De ce fait, l'identification des quatre nouvelles espèces parmi un panel de fromages relativement restreint révèle que, bien que très étudiés, les fromages, comme probablement de nombreux aliments fermentés, abritent une diversité microbienne bien plus étendue que ce qui est à ce jour décrit. Par ailleurs, avec l'ajout de dix gènes dans les bases de données, l'investigation de fromages dans les années à venir, en particulier via des approches de métagénétique et de métagénomique, pourrait permettre d'évaluer l'occurrence de ces espèces nouvellement décrites dans le contexte fromager et donc confirmer leur association à cette matrice. En effet, il convient de rappeler que ces nouvelles espèces n'ont été isolées jusqu'à présent qu'au sein des fromages (à l'exception d'un isolat de *B. penicilloides*), et bien que les études tendent vers des caractéristiques en lien avec le contexte fromager (e.g. production de

composés volatils aux notes aromatiques d'intérêt, capacité de croissance compatibles avec les conditions fromagères, etc.), cette association strictement au fromage reste encore à ce jour à confirmer, leur présence spontanée au sein des fromages pourrait être également associée à un ordre de contaminants d'altérations.

Les génomes des souches types des nouvelles espèces ont également pu être séquencés dans le cadre de la thèse afin d'effectuer des analyses de génomiques comparatives. Dans un premier temps, une analyse génomique complète reprenant le maximum d'espèces *Nectriaceae* utilisées pour la phylogénie descriptive des nouvelles espèces, et dont les génomes étaient accessibles, a pu être réalisée avec une très bonne concordance des deux. A titre d'exemple, un article publié très récemment (Crous et al., 2021) mettait en évidence l'existence de deux nouveaux genres (i.e. *Luteonectria* et *Nothofusarium*) qui auraient pu potentiellement correspondre au nouveau genre que nous avons décrit, à savoir *Longinectria*. Une analyse sur la base de sept gènes dans le cadre de la **publication n°1** avait permis de réfuter cette hypothèse, qui s'est également vu réfutée par la phylogénie obtenue à partir des génomes complets incluant deux espèces de *Luteonectria*. D'autre part, la recherche de groupes orthologues a mis en évidence des protéines communes spécifiquement entre souches de *B. domesticum* et/ou entre espèces *Bisifusarium* et/ou *Longinectria*, ainsi que des protéines spécifiques à chacune de ces souches types. A titre d'exemple, ont été mises en évidence certaines protéines communes aux cinq isolats de *B. domesticum* correspondant à des transporteurs de sucres, des transporteurs de sodium, des sidérophores transporteurs de fer ou encore des protéines du stress qui pourraient potentiellement leur permettre une adaptation à la matrice fromagère. On notera que les effets combinés de la pandémie COVID-19 et le travail de description des nouvelles espèces non prévu initialement, ont conduit à une obtention tardive des génomes dans la thèse. De ce fait, la totalité des analyses n'ont pas pu être finalisées à ce jour et il serait d'intérêt d'analyser plus finement ces génomes pour mettre en évidence une possible adaptation de ces espèces à leur environnement en recherchant notamment la présence d'éléments transposables et des gènes codant les "Carbohydrate Active enZymes" (CAZymes; e.g. carbohydrate esterases, glycoside hydrolases, glycoside transferases, polysaccharide lyases) qui représentent d'excellent marqueurs du mode de vie (Pain and Hertz-Fowler, 2008; Zhao et al, 2013), comme déjà effectué sur les *Mucor* spp. dans l'étude de Lebreton et al. (2020), au cours de laquelle une contraction des CAZymes avait été notée pour les espèces associées au fromage. De plus, une analyse des expansions/réductions de familles gènes qui peuvent participer au développement de répertoires protéiques spécialisés (Sharpton et al., 2009) est une des perspectives immédiates, le but étant une valorisation de ces travaux de génomique comparative (**publication n°4 en préparation**).

Enfin, il est important de rappeler que, d'un point de vue visuel et aromatique, les fromages analysés ne présentaient pas de signes d'altération, on peut alors s'interroger sur l'impact de ces nouvelles espèces sur les qualités organoleptiques des fromages mais également sur leur innocuité (e.g. production de mycotoxines). Ainsi, des questionnements scientifiques similaires à ceux évoqués pour *B. domesticum* existent pour ces nouvelles espèces et il nous est donc apparu cohérent d'ajouter ces dernières à la plupart de nos axes d'étude.

Existe-t'il une diversité génétique au sein de *B. domesticum* ?

Après la finalisation de notre collection de travail de *B. domesticum* et la phase de description de nouvelles espèces, nous nous sommes intéressés à la diversité génétique au sein de cette espèce. L'équipe de recherche de l'ESE venait d'effectuer le séquençage de trois génomes de *B. domesticum* d'origines variées. Cependant, une analyse préliminaire comparative sur la base des SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) n'avait pas permis la détection de variations notables entre ces trois isolats (i.e. environ 100 SNPs mis en évidence sur 34 MB). De prime abord, ce résultat pouvait signifier que l'espèce *B. domesticum* correspondait dans les faits à une espèce clonale avec donc peu de variabilité intraspécifique comme c'est le cas de *P. camemberti*, et de ses deux variétés *P. camemberti* var. *camemberti* et var. *caseifulvum* (Ropars et al., 2020). Cependant, le fait qu'il existe des souches accessibles commercialement dans le monde et que nous n'avions pas d'information sur leur potentielle utilisation dans les fromages sélectionnés n'excluait pas la possibilité que les trois isolats pouvaient correspondre à une culture commerciale. Dans ce contexte, et de façon préliminaire, nous avons effectué plusieurs analyses RAPD en testant différentes amorces (n=9) afin d'identifier la présence de profils génétiques distincts parmi les isolats de notre collection. Les résultats obtenus suggèrent une très faible diversité au sein de l'espèce mais ce résultat est à nuancer car la collection de travail est de petite taille et, comme indiqué, des souches commerciales largement diffusées sont accessibles. Ainsi, il serait d'intérêt, comme proposé précédemment, d'analyser des fromages artisanaux et fermiers provenant de différents pays pour essayer d'enrichir cette collection. Malgré tout, une certaine diversité a été observée sur la base des profils RAPD et nous a permis de sélectionner cinq isolats, dont trois cultures commerciales, pour la suite de nos analyses. Parmi ces isolats, un présentait un profil RAPD clairement différent des isolats dont le génome avait été précédemment séquencé. Ainsi, il nous a été possible de réaliser le séquençage de ce quatrième génome (UBOCC-A-120004). Une nouvelle recherche de SNPs sur la base des quatre génomes de *B. domesticum* a pu être réalisée et a mis en évidence des différences nucléotidiques associées au quatrième génome ajouté, confirmant ainsi notre suspicion de divergence de cette souche. Par ailleurs, il peut être noté que cette

divergence de 8386 nucléotides sur 34 MB est proche de ce qui est observé entre les deux variétés de *P. camemberti*. En bilan, sur la base des connaissances acquises et en tenant compte des possibles biais évoqués précédemment (i.e collection de faible taille, existence de cultures commerciales), la diversité génétique de *B. domesticum* semble très faible avec *a minima* deux souches aux profils génétiques distincts suggérant une population clonale. Nous sommes ici bien loin de la complexité génétique de *P. roqueforti* pour laquelle quatre populations ont été identifiées et représentées par de nombreuses souches (Dumas et al., 2020). Le fait que nous ne connaissions pas à ce jour le réservoir naturel de cette espèce est également un frein à une meilleure connaissance de la diversité intraspécifique de *B. domesticum*.

Quel est l'impact de facteurs abiotiques sur la croissance de *B. domesticum*, *B. allantoides*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* et *L. verticilliforme* et reflètent-ils une adaptation aux matrices fromagères ?

L'axe d'étude suivant a porté sur la physiologie de *B. domesticum*, et plus largement des autres espèces de *Nectriaceae* associées aux fromages (i.e. *B. allantoides*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* et *L. verticilliforme*). Dans un but de comparaison à des espèces non-fromagères, les autres espèces du genre *Bisifusarium*, à savoir *B. biseptatum*, *B. delphinoides*, *B. dimerum*, *B. lunatum*, *B. nectrioides* et *B. penzigii* (*B. tonghuanum* n'étant pas accessible) ont également été étudiées via l'utilisation des souches types. L'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'impact de facteurs abiotiques sur la croissance de ces espèces, afin d'estimer via des outils de mycologie prévisionnelle, les valeurs cardinales de croissance qui n'avaient jamais été décrites pour ces espèces, hormis quelques exceptions (Schroers et al., 2009). Pour ce faire, une approche "haut-débit", par néphélométrie laser, ayant fait ses preuves pour le suivi de croissance fongique (Joubert et al., 2010; Lecomte et al., 2012), a été utilisée afin de déterminer l'effet de trois facteurs abiotiques en lien avec la matrice et les conditions fromagères (température, pH, NaCl). De plus, considérant l'association forte entre *B. domesticum*, et a priori de *B. allantoides*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* et *L. verticilliforme*, avec le fromage, le second objectif de l'étude était de mettre en évidence une potentielle adaptation de ces espèces à la matrice fromagère. Pour cela, une méthode de croissance radiale a été adoptée en effectuant des cultures, d'une part, sur milieu mimant le fromage ("cheese agar") et, d'autre part, sur Raclette de Savoie. L'utilisation de cette seconde méthodologie permet d'évaluer indirectement l'impact de la combinaison de facteurs abiotiques (e.g. la température, le pH, le taux de NaCl) mais aussi de mimer un développement du mycélium plus proche d'une inoculation en surface des fromages via l'utilisation d'un milieu solide *a contrario* d'un milieu liquide permettant le passage d'un faisceau

laser, plus éloigné de ces conditions. L'ensemble de ces suivis de croissance a été modélisé par des outils de modélisation primaire, pour estimer des vitesses de croissance à partir des cinétiques, puis secondaires, pour l'estimation *in fine* des valeurs cardinales de croissance (i.e. valeurs minimale, optimale et maximale de chaque paramètre étudié ainsi que la vitesse de croissance optimale). Il est à noter que cette étude a mis en évidence des différences interspécifiques, avec des profils de croissances différents entre espèces. D'autre part, il est fréquent que les études de modélisations soient effectuées sur une seule souche ou isolat ce qui soulève des questions quant à la représentativité des résultats obtenus. C'est pourquoi, afin de s'assurer de la robustesse de notre étude, nous avons inclus un volet intraspécifique (pour les méthodes néphélométrique et de croissance radiale) en sélectionnant des isolats selon leur profil génétique ou substrat d'origine. Ainsi, nous avons pu témoigner d'une bonne représentativité des données à l'échelle d'une espèce de par les faibles variations observées entre isolats.

Ces travaux ont permis, d'une part, de générer des données jusqu'alors jamais décrites pour les onze espèces étudiées au total et, d'autre part, de mettre en avant des caractéristiques de croissances compatibles avec les conditions fromagères pour les espèces considérées comme « associées au fromages ». En effet, à titre d'exemple, bien que ces dernières ne soient pas les espèces les plus halotolérantes au sein du genre *Bisifusarium* ou encore comparativement aux espèces *Mucor* spp. et *Penicillium* spp. associées aux fromages (Morin-Sardin et al., 2016; Nguyen Van Long et al., 2017a), leur croissance pourrait s'effectuer en présence de taux de NaCl jusqu'à 6 à 9 % (et même jusqu'aux environs de 14,5 à 17 % de NaCl pour *B. allantoides* et *B. penicilloides*), ce qui est bien supérieur à ce qui est rencontré dans les fromages. D'autre part, celles-ci ont présenté des températures optimales de croissance plus basses que les sept autres espèces étudiées "non associées au fromages" (19,1–23,1 °C vs. 26,1–36,2 °C) mais également au niveau des températures minimales et maximales. Cela illustre une meilleure croissance à de plus basses températures pour ces espèces tandis que les espèces considérées comme pathogènes opportunistes humains présentaient des températures préférentielles plus élevées signe d'une thermophilie compatible avec la colonisation du corps animal/humain et donc une notion d'adaptation à ces habitats respectifs. Toutefois, ces paramètres (i.e. température, pH et NaCl) ont été évalués indépendamment, or il est connu qu'ils peuvent interagir entre eux (Samapundo et al., 2007). Il serait alors intéressant d'évaluer l'impact de différentes combinaisons pH/NaCl/températures, sur la croissance fongique, comme cela a pu être effectué pour *M. racemosus* où il a été démontré des conditions optimales à 22°C, pH 4,5 et un taux de sel inférieur à 1,5 % (Bekada et al., 2008). En ce sens, l'étude sur matrices fromagères constitue un exemple de combinaison de facteurs, une approche également suivie dans une étude menée sur les *Mucor* spp. (Morin-Sardin et al., 2016) dans laquelle une meilleure croissance des souches

technologiques a clairement été mise en évidence sur Tomme de Savoie par rapport au milieu synthétique PDA ou même par rapport à un autre type de fromage (i.e. bûche de chèvre). De même, nous avons observé au cours de notre étude que toutes les espèces et isolats de *Bisifusarium* et *Longinectria* testés ont été capables de se développer sur matrices fromagères. Et, bien que *B. domesticum* n'était pas l'espèce la plus tolérante au sel et au pH acides lors de l'étude des facteurs abiotiques, celle-ci s'est avérée être l'espèce la plus adaptée à la matrice fromagère. En effet, sur les cinq isolats de *B. domesticum* étudiés, pas ou peu de différences au niveau de la vitesse de croissance optimale n'ont été observées entre les matrices synthétiques et fromagères (à l'exception de l'isolat UBOCC-A-120004 dont la croissance est ralentie sur Raclette de Savoie comparativement au milieu PDA) tandis que pour les espèces de *Bisifusarium* non associées à cette matrice, la diminution de la vitesse de croissance était notable. En lien, avec les résultats de l'étude précédemment évoquée, et la distinction des vitesses de croissances entre "cheese agar" et Raclette de Savoie, il pourrait être d'intérêt d'évaluer ces caractéristiques de croissance d'une part, sur d'autres fromages tels que Reblochon ou Saint-Nectaire, auxquels *B. domesticum* est fréquemment associé, et d'autre part, d'évaluer ce potentiel par des croissances sur la surface d'un fromage en cours d'affinage afin de mimer une croissance par *B. domesticum* et des nouvelles espèces, qui aurait lieu au moment de l'affinage, de façon volontaire ou spontanée. Par ailleurs, il peut être noté que dans cette étude, d'une façon générale, les espèces de *Bisifusarium* non associées au fromage ont présenté des vitesses de croissances plus élevées que les espèces *Nectriaceae* associées au fromage. On peut penser que cette caractéristique pourrait être un mécanisme d'adaptation mis en place permettant ainsi une bonne implantation et développement de ces espèces sur des matrices complexes. L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une valorisation sous forme d'article (**publication n°2**). Cette étude physiologique suggère ainsi une adaptation de ces espèces à la matrice fromagère, une question qui peut également être étudiée par le biais d'une étude génomique comme abordée au début de cette discussion.

Quelles sont les propriétés fonctionnelles présentées par *B. domesticum*, *B. allantoides*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* et *L. verticilliforme* ?

→ Les activités lipolytique et protéolytique

Nous nous sommes ensuite interrogés sur la diversité fonctionnelle de *B. domesticum* ainsi que des quatre nouvelles espèces isolées à partir de fromages. En effet, *B. domesticum* est proposée par les fournisseurs de ferments pour sa capacité "anticollant" pour fromages à morge collante (Agroscope) mais également recommandée pour la surface des Saint-Nectaire, Tommes de Montagnes et Reblochon pour un aspect "moisissure Saint-Nectaire" (Danisco, LIP) et pourrait alors apporter

d'autres propriétés organoleptiques aux fromages. De même, les nouvelles espèces ayant été isolées à partir de fromages d'apparence "normale" pourraient également jouer un rôle bénéfique dans la production du fromage. Dans ce contexte, les capacités lipolytique et protéolytique ont été étudiées car, comme décrit dans l'introduction de ce manuscrit, elles ont un rôle majeur dans la production de molécules aromatiques mais ont également un effet direct sur la texture du fromage. Des tests qualitatifs nécessitant des cultures effectuées en tubes, respectivement sur milieu tributyrine agar et "skim milk" agar, ont été utilisés pour évaluer ces deux propriétés qui se visualisent par l'apparition d'une zone d'éclaircissement. Tous les isolats étudiés de *B. domesticum* (n=5), *B. allantoides* (n=3), *B. penicilloides* (n=3), *L. lagenoides* (n=4) et *L. verticilliforme* (n=1) ont présenté ces deux activités aux deux températures testées (12°C et 25°C). De façon intéressante, bien que ce test ne puisse pas être considéré comme quantitatif, l'activité lipolytique semble être peu impactée par la température tandis que pour certains isolats de *B. domesticum* et les trois isolats de *B. penicilloides*, il semblerait que l'activité protéolytique soit plus importante à 12°C qu'à 25°C. Ainsi, bien qu'une activité protéolytique soit observée à 25°C, ces isolats seraient alors plus actifs à une température similaire à celle des caves d'affinage (e.g. Saint-Nectaire, affinage entre 8 et 12°C; Raclette de Savoie entre 8 et 13°C), ce qui est en faveur d'un caractère d'adaptation aux conditions d'affinage. On notera que parmi les isolats étudiés, seuls *P. roqueforti* FM164, pourtant décrit pour ses propriétés protéolytiques (Caron et al., 2021) et *B. domesticum* UBOCC-A-120004 ont présenté une faible activité protéolytique à 25°C et pour cette dernière, ne débutant que très tardivement à 12°C (après 26 jours). La protéolyse étant une voie métabolique importante pour la production d'arômes et jouant sur la texture finale du fromage (Ardö et al., 2017), cette faible activité protéolytique serait à prendre en considération pour une sélection de souches qui serait alors en faveur des isolats précédemment cités. De plus, il est intéressant de constater que l'isolat montrant une faible activité protéolytique avait également démontré, comparativement aux autres isolats de *B. domesticum*, une plus faible tolérance au NaCl, une absence de croissance observée à 5°C mais aussi une croissance plus impactée sur Raclette de Savoie. Cet isolat correspond aussi à celui génétiquement différent des autres isolats aussi bien via RAPD que séquençage. Pour évaluer ces différences entre isolats et entre espèces, il serait intéressant d'effectuer des dosages quantitatifs de ces activités. En effet, si de nombreuses études emploient des méthodes qualitatives ou semi-quantitatives pour déterminer ces activités enzymatiques via l'utilisation de milieux de cultures adéquats (Domingos-Lopes et al., 2017; Dumas et al., 2020; Esteves et al., 2014; Félix et al., 2018), d'autres méthodes permettent une quantification de ces résultats. Si le dosage des protéines peut être effectué par la "méthode Kjeldahl", méthode de référence appliquée dans le domaine agro-alimentaire dosant plus précisément l'azote total, d'autres alternatives sont souvent employées en laboratoire (McSweeney and Fox, 1997; X. Zhao et al., 2019). Parmi celles-ci peuvent être cités le dosage par 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS) des groupements aminés libres

(Freedman and Radda, 1968), qui a été notamment employé pour étudier la diversité fonctionnelle de *P. roqueforti*, (Gillot et al., 2017b) ou bien encore le dosage utilisant de l'acide trichloroacétique (TCA) (Esteves et al., 2014; Félix et al., 2018; McSweeney and Fox, 1997). Concernant l'activité lipolytique, un dosage des acides gras libres peut également être effectué par chromatographie gazeuse (Caron et al., 2021; Collins et al., 2003; Thierry et al., 2017) mais aussi par des dosages spectrophotométrique ou fluorimétrique avec des réactions au *p*-nitrophenyl palmitate (Félix et al., 2018; Kotogán et al., 2014). Enfin, ont également été développés des kits de dosage d'activités "lipases" (Lipase Activity Assay Kit; Sigma-Aldrich) et "protéases" (Pierce Fluorescent Protease Assay Kit; Thermo Fisher Scientific) comme utilisés par Ozturkoglu-Budak et al., 2016).

→ Le potentiel de production de composés volatils

Par ailleurs, dans le cadre de cette étude fonctionnelle, une investigation approfondie a également été menée sur le volatilome de cultures de ces mêmes isolats sur "cheese agar" (culture de 24 jours à 12°C) par HS-Trap/GC-MS, avec un focus supplémentaire sur le volatilome de *B. domesticum* après culture sur Raclette de Savoie. Des profils distincts ont pu être observés entre espèces avec un bon regroupement des isolats appartenant à une même espèce. En effet, certains composés ont été produits par plusieurs espèces tels que l'oct-1-en-3-ol, produit par les cinq espèces étudiées mais qui est très fréquent au sein du règne fongique présentant un arôme typique "champignon de Paris" (Cronin and Ward, 1971), tandis que d'autres n'ont été associés qu'à une seule espèce tels que le propan-2-one (acetone), un composé classiquement retrouvé dans les Bleus, uniquement produit par *B. penicilloides* (Kilcawley, 2017). Ainsi, des différences ont pu être notées notamment en termes de nombre et types de composés produits (i.e. 12–18 et 9–17 composés produits par *B. domesticum* et *B. penicilloides* respectivement vs. 5–6 et 9–12 par *B. allantoides* et *L. lagenoides* contre un seul par *L. verticilliforme*) mais aussi des différences d'abondance de certains composés entre isolats et/ou espèces. De plus, d'un point de vue diversité fonctionnelle intraspécifique, l'isolat *B. domesticum* UBOCC-A-120001 s'est particulièrement distingué des autres en produisant nettement moins de composés volatils sur "cheese agar" que les autres isolats (n=4 vs. 12–18). De prime abord, nous aurions pu penser que cet isolat présentait une activité lipolytique et/ou protéolytique moindre mais, aucun lien de ce type n'a pu être établi. De plus, de façon intéressante, concernant le volatilome sur Raclette de Savoie, les profils entre isolats étaient relativement similaires en termes de composés produits et d'abondances, y compris pour l'isolat UBOCC-A-120001. Pour ce dernier, la différence de production entre "cheese agar" et Raclette de Savoie démontre également que la production de composés aromatiques peut être différente en fonction du "milieu de culture". Pour aller plus loin

dans le potentiel fonctionnel de ces espèces, il pourrait alors être intéressant d'évaluer le volatilome (toujours par HS-Trap/GC-MS) sur différents types de fromages, bien que l'on sache que d'autres éléments entrent en jeu lors de l'affinage avec notamment des interactions biotiques complexes (Irlingler and Mounier, 2009; Mounier, 2015). En effet, des interactions entre espèces (et/ou groupes microbiens) peuvent avoir lieu au cours de l'affinage, de façon bénéfique ou non pour une des deux espèces, qualifiées d'interactions « commensalistes », « compétitives » ou encore « d'amensalisme » (Mounier, 2009). Par ailleurs, ces analyses pourraient être couplées à des analyses sensorielles incluant dans un premier temps un examen visuel (e.g. appréciation de l'aspect de la croûte et cœur du fromage en évaluant la couleur, l'épaisseur, la texture lisse ou granuleuse, etc.) et olfactif (e.g. appréciation de l'intensité aromatique et observation de notes aromatiques telles que l'arôme champignon, fruité ou à l'inverse piquant, rance etc.).

→ Le potentiel de production d'extrolites

Enfin, dans cet axe fonctionnel, la production d'extrolites produits par les souches types de *B. domesticum* et des quatre nouvelles espèces décrites a tout d'abord été analysée à partir d'extraits obtenus de cultures sur quatre milieux différents (afin d'avoir des profils les plus complets possible). Cette investigation a confirmé, dans ces conditions, l'absence de mycotoxines connues et classiquement décrites dans les genres *Fusarium* mais aussi *Penicillium* et *Aspergillus*. Cette information serait en faveur de l'innocuité de cette espèce en accord avec le statut européen "Qualified Presumption of Safety" (ou QPS, défini par l'EFSA). De plus, parmi les extrolites détectés certains n'ont pas pu être identifiés et laissent penser à la présence de molécules jamais décrites dont certaines semblent avoir des structures lipopeptidiques comportant potentiellement une tyrosine. Ce dernier point est d'intérêt puisque l'on sait que si les lipopeptides peuvent avoir des propriétés de biosurfactants, certains présentent également des propriétés antimicrobiennes (Mnif & Ghribi, 2015) qui peuvent ainsi être d'intérêt dans le contexte fromager. En effet, bien que dans la littérature, les lipopeptides soient souvent produits par des espèces bactériennes *Bacillus* spp. avec des activités antifongiques (Jin et al., 2018; Nanjundan et al., 2019; Toral et al., 2018), on compterait depuis 2000, environ 30 genres fongiques (e.g. *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*) produisant des lipopeptides qui pourraient présenter ce type d'activité (Li et al., 2016; P. Zhao et al., 2019). Il serait donc intéressant, de mettre en avant ce potentiel, en identifiant formellement la présence de ces molécules ainsi que leur activité antimicrobienne pour être appliqué en fromagerie en outil de bioprotection contre des contaminants fongiques ou bactériens. Dans ce contexte, on notera que les mécanismes du caractère "anticollant" n'étant pas élucidés à ce jour, ces molécules pourraient y participer. D'autre part, le

potentiel de biopréservation a clairement été mis en évidence pour trois isolats de *B. domesticum* contre *P. roqueforti*, *P. bifforme* et *G. candidum* (n=3 pour chaque espèce), avec par ailleurs une activité supérieure de MNHN-RF-05627. Avec une telle suggestion de molécules d'intérêt, il nous a semblé pertinent d'entamer des premiers travaux visant à identifier ces composés. De ce fait, des analyses fines en MALDI-TOF et RMN ont été effectuées à partir de ces mêmes extraits (milieux YES et "skim milk" agar). D'une part, les analyses MALDI-TOF ont confirmé la présence de composés avec des masses détectées entre 700 et 1 500 Da. D'autre part, parmi les signaux obtenus en RMN, des motifs caractéristiques d'acides gras (saturés et insaturés) et de composés aromatiques ont été observés ainsi que ceux de la tyrosine. Cependant, malgré des analyses approfondies, la connexion entre les signaux "Tyrosine" et ceux des acides gras, bien que fortement suspectée, n'a pas pu être formellement validée et l'identification exacte de ces composés n'a pu être réalisée. Ainsi, de plus amples investigations seraient à effectuer. Pour cela, différents milieux pourraient être testés pour optimiser la production de lipopeptides dont l'extraction pourrait être également optimisée avec une précipitation à l'acide chlorhydrique (pH 2) et extraction au méthanol pour extraire et analyser spécifiquement la fraction lipopeptidique (Ibrar and Zhang, 2020; Ma et al., 2012). Par ailleurs, il pourrait être intéressant d'évaluer l'activité antimicrobienne de cette fraction lipopeptidique en effectuant des suivis de croissances (bactériennes et/ou fongiques) par néphélométrie laser dans un milieu liquide et/ou par croissance radiale sur un milieu "skim milk" comportant cette fraction. De plus, pour approfondir l'étude de bioprotection de *B. domesticum*, qui pourrait être, par ailleurs, étendue aux nouvelles espèces, lesdits tests pourraient être appliqués à partir de surnageants de cultures. Il serait également intéressant d'effectuer, des tests supplémentaires sur "cheese agar" et éventuellement sur des fromages en effectuant des croissances à 12°C (plus proche des conditions des caves d'affinage) suivis d'une inoculation mimant une contamination par davantage d'isolats d'espèces fongiques et/ou bactériennes indépendamment. D'autre part, la production de métabolites secondaires par *B. domesticum* et les quatre nouvelles espèces associées au fromage (pour un total de 16 isolats) a également été évalué de façon exploratoire par nos soins en LC-Q-TOF (uniquement dans des conditions d'ionisation positive et en utilisant une extraction acétate d'éthyle/isopropanol (3:1)) à partir d'extraits issus de cultures effectuées sur "skim milk" agar et YES agar. Ne disposant pas d'une base de données autre que la "METLIN-PCD", nous n'avons pas été en mesure d'identifier avec précision et certitude la totalité des métabolites produits par les différents isolats. Cependant, nous avons pu constater, d'une part, que davantage de composés étaient produits sur milieu "skim milk" par rapport au milieu YES. Cela est concordant avec le fait que le milieu "skim milk" est très riche permettant ainsi un développement optimal des isolats, tandis que le milieu YES possède un rapport C/N élevé induisant un stress, d'où son utilisation préférentielle pour la production de certaines mycotoxines. Il a en effet été clairement observé un diamètre des thalles plus important et un aspect

du mycélium plus aérien et développé sur le milieu “skim milk” comparativement non seulement au milieu YES mais aussi au milieu PDA qui est, pourtant, un milieu utilisé classiquement pour une croissance optimale des champignons filamenteux (**Figure 28**).

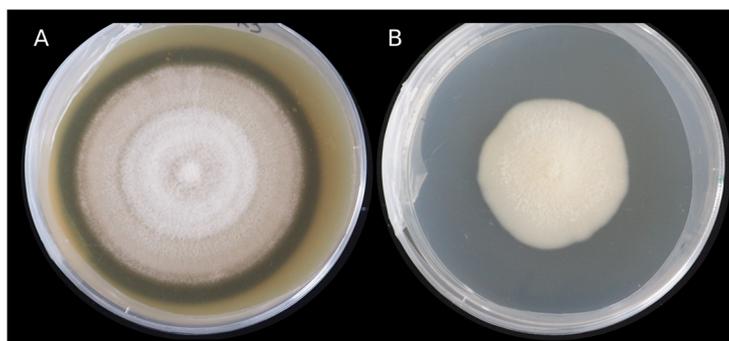


Figure 28 : Culture de *B. domesticum* MNHN-RF-05627 sur skim milk agar (A) et PDA (B) avec 25 jours de croissance à 15°C (inoculum 2µL à 5x10⁵ spores/mL)

D'autre part, sur la totalité des analyses LC-Q-TOF, une production moindre de composés par *B. domesticum* a été constaté par rapport aux autres espèces (e.g. 40 et 22 métabolites produits par plus de 50% des réplicats de *B. domesticum* sur “skim milk” agar et YES respectivement, contre 72 et 55 métabolites, respectivement pour *B. penicilloides*). Malgré l'absence d'utilisation de standards, la base de données “Metlin-AMRT-PCD” du logiciel MassHunter a permis de détecter certaines productions. Avec notamment l'identification d'une production commune à tous les isolats étudiés, sur milieu “skim milk” agar et/ou YES agar, d'acide alpha-linolénique et acide linoléique, des acides gras ayant par ailleurs déjà été associés à des *Mucor* spp., *G. candidum* ou *Y. lipolytica* (Chan et al., 2018; Cordova and Alper, 2018; Luo et al., 2018; Mohamed et al., 2020), mais aussi un analogue de base sphingoïde nommé “enigmol”, non associé à d'autres espèces fongiques mais étudié pour des propriétés anti-cancéreuses (Symolon et al., 2011), et enfin les sphingolipides phytosphingosine et phytosphingosine-1-P dont la production a été notamment décrite chez *Y. lipolytica* (Han et al., 2021). Puis, de manière plus espèce-dépendante, diverses molécules telles que des acides gras et des sphingolipides (i.e. céramides et sphingosines), une classe de molécules communes aux différents règnes et qui pourraient entre autres avoir des propriétés antimicrobiennes (Schorsch et al., 2013), ont été mises en évidence avec des identifications putatives qui seraient à confirmer par des analyses utilisant les standards correspondants. De ce fait, l'identification de ces composés, à partir des mêmes extraits, en collaboration avec une plateforme d'analyses disposant d'une base de données plus riche serait alors une perspective évidente, en plus de l'identification de nouveaux composés tels que les lipopeptides par les approches précédemment détaillées. Dans ce contexte, après l'observation

intéressante de molécules de haut poids moléculaires et sur la base des résultats obtenus en HPLC-DAD et LC-Q-TOF, des analyses ont été amorcées afin de générer des profils d'acides gras sur ces cinq espèces associées aux fromages (ces analyses sont en cours au moment de la rédaction de ce manuscrit). L'ensemble de ces études sur la diversité fonctionnelle font l'objet d'une valorisation sous forme d'article (**publication n°3**).

Quid du caractère considéré atoxinogène de *B. domesticum* et des nouvelles espèces de *Nectriaceae* isolées des fromages ?

Enfin, toujours en lien avec la production de métabolites secondaires, nous nous sommes intéressés au caractère considéré atoxinogène de *B. domesticum*, initialement décrit par Bachmann et al. (2005). Comme évoqué précédemment, ni les analyses réalisées en collaboration avec le Pr. Jens Frisvad, ni celles effectuées au laboratoire par LC-Q-ToF, n'ont révélé la production de mycotoxines connues, ce qui est en accord avec les travaux initiaux sur *B. domesticum*. Afin d'appréhender ce potentiel de production sous un autre angle, sur la base des génomes obtenus, une étude génomique ciblée a également été entreprise. Nous avons ainsi mené des recherches non ciblées des voies de biosynthèses de métabolites secondaires, via le logiciel Fungal antiSMASH (v6.0) sur les génomes de *B. domesticum* disponibles au cours de cette thèse dont un génome récemment publié (Geiser et al., 2021). Nous avons constaté tout d'abord, parmi les cinq génomes de *B. domesticum*, la mise en évidence de 15 à 17 clusters de gènes associés à la production de métabolites secondaires. Ces clusters de gènes biosynthétiques ont pour enzymes clés des polyketide synthases, des terpene synthases et des non-ribosomal peptide synthetases. De plus, les génomes des quatre nouvelles espèces associées au fromage ont également été inclus dans cette étude. Il a été observé que *B. penicilloides* possédait un nombre (n=18) et une répartition des clusters de gènes en NRPS, PKS et TPS similaire à ceux de *B. domesticum* tandis que les autres espèces de l'étude en présenteraient quant à eux davantage, avec 23, 28-29 et 34 clusters présents chez *B. allantoides*, *L. lagenoides* et *L. verticilliforme* respectivement ou encore à titre comparatif, 29, 27 et 36 clusters pour *B. dimerum*, *B. penzigii* et *F. venenatum*, respectivement. En plus des mêmes types de clusters que retrouvés pour les isolats de *B. domesticum* et *B. penicilloides*, il a été noté des clusters types bétalactone, sidérophores et/ou phosphonate au sein des génomes de *L. lagenoides* et *L. verticilliforme*. D'autre part, quelques identifications ont été proposées pour certains clusters de gènes, avec un pourcentage de similarité plus ou moins proche de la base de données MIBiG. Il a ainsi été noté la présence des clusters associés au diméthylcoprogène (100 %), duclauxin (14-42 %) et squalostatine S1 (40 %) pour tous les isolats de *Bisifusarium* et *Longinectria*. Et de façon intéressante aucun cluster de gènes connus associé à des mycotoxines n'a

été détecté pour les espèces associées au fromage. A l'inverse, celui associé à la fusarine a été détecté au sein du génome de *B. dimerum* et de *B. penzigii* avec un pourcentage de similarité de 100 % (et à 66 % chez *F. venenatum*) et alors que la production d'enniatiines par *B. dimerum* est connue (Buchtová et al., 2014; Firáková et al., 2008), ce cluster n'a été détecté que chez *F. venenatum*, pourtant utilisée pour la production de Quorn (une mycoprotéine produite et autorisée pour la consommation humaine). Concernant ce dernier point, il est important de rappeler qu'une présence d'un tel cluster ne correspond pas systématiquement à une production de ce composé, celle-ci dépendant *i)* de l'intégrité des gènes constitutifs et *ii)* des conditions de cultures (e.g. température, composition du substrat). Ainsi, ces résultats génomiques préliminaires sont en accord avec les résultats d'études des extrolites réalisées et plaident donc en faveur de l'innocuité de ces espèces. Cependant, lors de l'analyse génomique, peu de clusters se sont vu attribuer une proposition d'identification par le logiciel antiSMASH et certains extrolites produits ne sont pas encore connus. Dans ce contexte, au-delà de l'identification de ces extrolites, des études toxicologiques pourraient être réalisées à partir de ces derniers ou de surnageants de cultures.

Conclusion générale

En conclusion, en amont de cette thèse, nous ne disposions que de très rares connaissances sur l'espèce *B. domesticum* et nous avons pu constater, par ailleurs, que les connaissances scientifiques sur les autres espèces du genre *Bisifusarium*, étaient également relativement limitées. Aussi, l'objectif de cette thèse, au sens large, était d'enrichir les connaissances sur *B. domesticum*, auquel sont venues s'ajouter la description et l'étude de quatre nouvelles espèces de *Nectriaceae* associées au fromage. L'ensemble de ces études a permis d'aborder des notions d'écologie fongique des fromages par la mise en évidence d'une diversité fongique importante et seulement partiellement décrite et exploitée à ce jour, mais également d'apporter des nouvelles données taxonomiques et phylogénétiques au sein du genre *Bisifusarium* et plus largement de la famille *Nectriaceae* (**Figure 29**). Sous l'angle physiologique, les caractéristiques de croissances détaillées de *B. domesticum* mais aussi de *B. allantoides*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* et *L. verticilliforme* suggèrent une possible adaptation à l'environnement fromager, alors que l'axe "étude fonctionnelle" illustre un potentiel organoleptique qu'il serait d'intérêt de continuer à explorer. Cette étude a, par ailleurs, mis en évidence des caractéristiques qui pourraient être utilisées pour une sélection de souches. Concernant la production de composés volatils, hormis *L. verticilliforme*, les quatre autres espèces, et en particulier les espèces *B. domesticum* et *B. penicilloides* ont présenté une production de composés volatils d'intérêt pour un contexte fromager, ayant des descriptifs d'odeur fruités et doux (e.g. heptan-2-one, pentan-2-one) ou

encore une production notable de nonan-2-ol et heptan-2-ol qui sont très associés au profil aromatique du Camembert (Thierry et al., 2017). D'autre part, le potentiel antifongique observé de *B. domesticum* combiné à un caractère a priori atoxinogène, même si celui-ci reste à confirmer du fait de la production de métabolites inconnus, est d'un intérêt considérable et mériterait d'être également approfondi par de plus amples études. Enfin, l'obtention des génomes des espèces étudiées, dans le cadre des travaux de thèse, constitue également une source d'études futures importantes qui pourront permettre de mettre en évidence des gènes impliqués dans l'adaptation au fromage. Par ailleurs, au-delà de l'approfondissement des caractéristiques mises en évidence au cours de cette thèse, l'aspect *anticollanti*, dont le mécanisme n'est toujours pas connu à ce jour, mériterait d'être étudié à part entière. Ainsi, cet enrichissement des connaissances scientifiques actuelles de *B. domesticum* a également été accompagnée de nouveaux questionnements scientifiques qu'il conviendra d'étudier et nous pouvons raisonnablement penser que l'espèce *B. domesticum* pourrait être le sujet de plus amples études voire même d'applications autres que celle d'*anticollanti*.

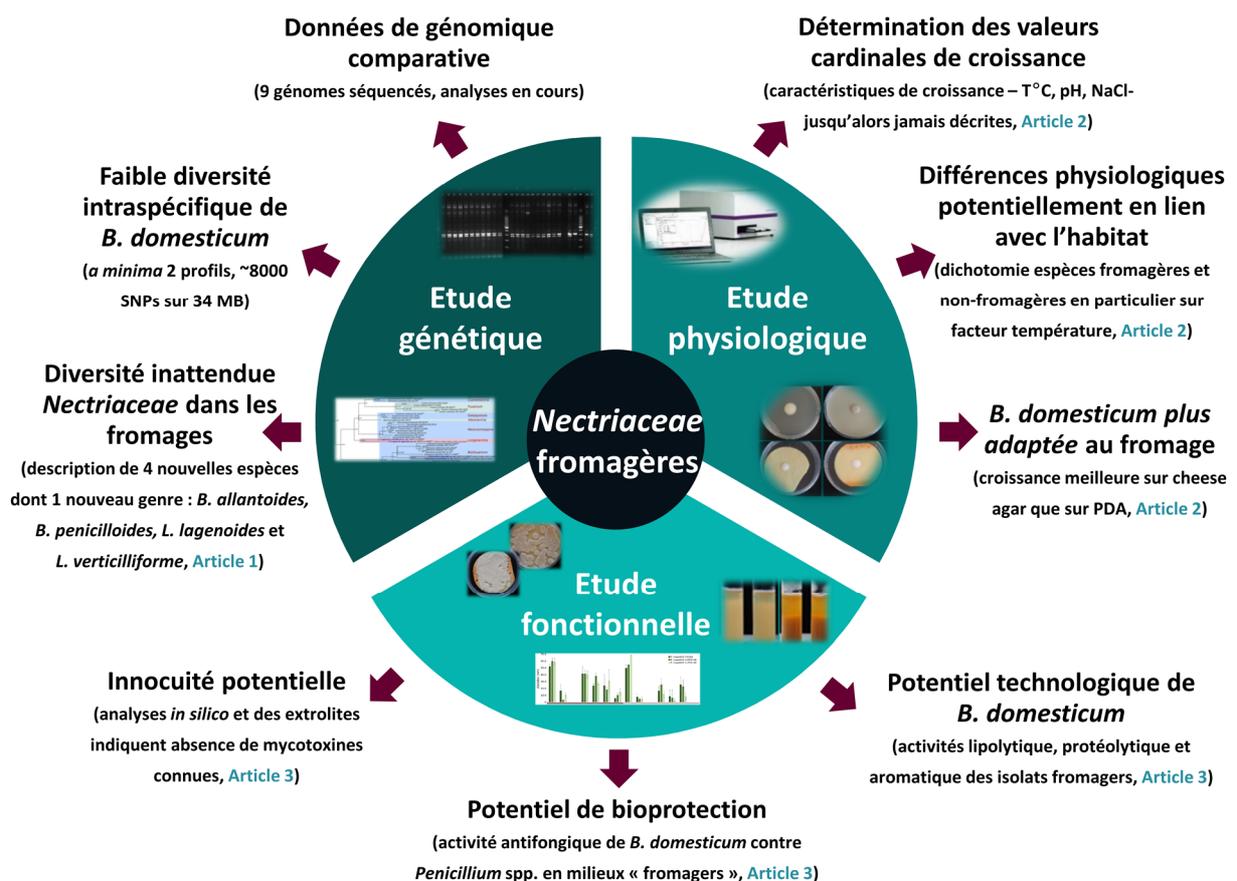


Figure 29 : Représentation schématisée des points saillants obtenus au cours de la thèse.

Références bibliographiques

A

- Al-Maqtoofi, M., Thornton, C.R., 2016. Detection of human pathogenic *Fusarium* species in hospital and communal sink biofilms by using a highly specific monoclonal antibody. *Environ Microbiol* 18, 3620–3634. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13233>
- Alshannaq, A., Yu, J.-H., 2017. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14, 632. <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>
- Altafini, A., Roncada, P., Guerrini, A., Minkoumba Sonfack, G., Fedrizzi, G., Caprai, E., 2021. Occurrence of ochratoxin A in different types of cheese offered for sale in Italy. *Toxins* 13, 540. <https://doi.org/10.3390/toxins13080540>
- Anderson, J.B., Ullrich, R.C., 1979. Biological species of *Armillaria mellea* in North America. *Mycologia* 71, 402–414. <https://doi.org/10.2307/3759160>
- Aniya, Y., Ohtani, I.I., Higa, T., Miyagi, C., Gibo, H., Shimabukuro, M., Nakanishi, H., Taira, J., 2000. Dimerumic acid as an antioxidant of the mold, *Monascus Anka*. *Free Radical Biology and Medicine* 28, 999–1004. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00188-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00188-X)
- Ardö, Y., McSweeney, P.L.H., Magboul, A.A.A., Upadhyay, V.K., Fox, P.F., 2017. Chapter 18 - Biochemistry of cheese ripening: proteolysis, in: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W. (Eds.), *Cheese (Fourth Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 445–482. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00018-1>
- Aunbjerg, S.D., Andersen, K.R., Knøchel, S., 2015. Real-time monitoring of fungal inhibition and morphological changes. *J Microbiol Methods* 119, 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.10.024>

B

- Bachmann, H.P., Bobst, C., Bütikofer, U., Casey, M.G., Dalla Torre, M., Fröhlich-Wyder, M.T., Fürst, M., 2005. Occurrence and significance of *Fusarium domesticum* alias *Anticollanti* on smear-ripened cheeses. *LWT - Food Science and Technology* 38, 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.05.018>
- Bachmann, H.-P., Bobst, C., Bütikofer, U., Dalla, M., Fröhlich-Wyder, M.-T., Fuerst, M., 2003. Sticky cheese smear and natural white mould. *Milchwissenschaft* 58, 117–232.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A.V., Sirotkin, A.V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2012. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19, 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Bardou, P., Mariette, J., Escudié, F., Djemiel, C., Klopp, C., 2014. jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics* 15, 293. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-293>
- Bekada, A.M.A., Benakriche, B., Hamadi, K., Bensoltane, A., 2008. Modelling of effects of water activity, pH and temperature on the growth rate of *Mucor racemosus* isolated from soft camembert cheese. *World J. Agric. Sci.* 6.
- Bertuzzi, A.S., Walsh, A.M., Sheehan, J.J., Cotter, P.D., Crispie, F., McSweeney, P.L.H., Kilcawley, K.N., Rea, M.C., 2018. Omics-based insights into flavor development and microbial succession within surface-ripened cheese. *mSystems* 3, e00211-17. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00211-17>

- Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A.M., Charlop-Powers, Z., van Wezel, G.P., Medema, M.H., Weber, T., 2021. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research* 49, W29–W35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab335>
- Bodinaku, I., Shaffer, J., Connors, A., Steenwyk, J., Biango-Daniels, M., Kastman, E., Rokas, A., Robbat, J., A., Wolfe, B., 2019. Rapid phenotypic and metabolomic domestication of wild *Penicillium* molds on cheese. *mBio* 10, e02445-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02445-19>
- Bois, G., Bertrand, A., Piché, Y., Fung, M., Khasa, D.P., 2006. Growth, compatible solute and salt accumulation of five mycorrhizal fungal species grown over a range of NaCl concentrations. *Mycorrhiza* 16, 99–109. <https://doi.org/10.1007/s00572-005-0020-y>
- Bokulich, N.A., Collins, T.S., Masarweh, C., Allen, G., Heymann, H., Ebeler, S.E., Mills, D.A., 2016. Associations among wine grape microbiome, metabolome, and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics. *mBio* 7, e00631-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00631-16>
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* btu170.
- Bonham, K.S., Wolfe, B.E., Dutton, R.J., 2017. Extensive horizontal gene transfer in cheese-associated bacteria. *Elife* 6, e22144. <https://doi.org/10.7554/eLife.22144>
- Bourdichon, F., Morelli, L., Zuliani, V., Laulund, S., 2018. Inventory of microbial food cultures with safety demonstration in fermented food products. Update of the Bulletin the IDF No 455-2012.
- Bourrie, B.C.T., Willing, B.P., Cotter, P.D., 2016. The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir. *Front Microbiol* 7, 647. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00647>
- Buchfink, B., Xie, C., Huson, D.H., 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat Methods* 12, 59–60. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>
- Buchtová, E., Hercegová - Firáková, S., Šturdíková, M., Ondrejickova, P., 2014. Optimization of enniatins production by an endophytic strain *Fusarium dimerum*. *J Microbiol Biotechnol Food Sci* 04, 122–127. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2014.4.2.122-127>
- Burki, F., Roger, A.J., Brown, M.W., Simpson, A.G.B., 2020. The new tree of Eukaryotes. *Trends Ecol Evol* 35, 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.08.008>

C

- Camardo Leggieri, M., Decontardi, S., Battilani, P., 2018. Modelling the sporulation of some fungi associated with cheese, at different temperature and water activity regimes. *Int J Food Microbiol* 278, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.023>
- Camardo Leggieri, M., Pietri, A., Battilani, P., 2020. Modelling fungal growth, mycotoxin production and release in Grana cheese. *Microorganisms* 8, E69. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010069>
- Caron, T., Piver, M.L., Péron, A.-C., Lieben, P., Lavigne, R., Brunel, S., Roueyre, D., Place, M., Bonnarme, P., Giraud, T., Branca, A., Landaud, S., Chassard, C., 2021. Strong effect of *Penicillium roqueforti* populations on volatile and metabolic compounds responsible for aromas, flavor and texture in blue cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 354, 109174. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109174>

- Cavalier-Smith, T., 2001. What are Fungi?, in: McLaughlin, D.J., McLaughlin, E.G., Lemke, P.A. (Eds.), Systematics and Evolution, The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research). Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 3–37. https://doi.org/10.1007/978-3-662-10376-0_1
- Cerning, J., Gripon, J.C., Lamberet, G., Lenoir, J., 1987. Les activités biochimiques des *Penicillium* utilisés en fromagerie. Lait 67, 3–39. <https://doi.org/10.1051/lait:198711>
- Cervini, C., Gallo, A., Piemontese, L., Magistà, D., Logrieco, A.F., Ferrara, M., Solfrizzo, M., Perrone, G., 2020. Effects of temperature and water activity change on ecophysiology of ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* in field-simulating conditions. International Journal of Food Microbiology 315, 108420. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108420>
- Chan, L.G., Cohen, J.L., Ozturk, G., Hennebelle, M., Taha, A.Y., L. N. de Moura Bell, J.M., 2018. Bioconversion of cheese whey permeate into fungal oil by *Mucor circinelloides*. J Biol Eng 12, 25. <https://doi.org/10.1186/s13036-018-0116-5>
- Cheeseman, K., Ropars, J., Renault, P., Dupont, J., Gouzy, J., Branca, A., et al., 2014. Multiple recent horizontal transfers of a large genomic region in cheese making fungi. Nat Commun 5, 2876. <https://doi.org/10.1038/ncomms3876>
- Chethana, K.W.T., Manawasinghe, I.S., Hurdeal, V.G., Bhunjun, C.S., Appadoo, M.A., Gentekaki, E., Raspé, O., Promputtha, I., Hyde, K.D., 2021. What are fungal species and how to delineate them? Fungal Diversity 109, 1–25. <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00483-9>
- CNIEL, 2021. « L’Economie Laitière en Chiffres » - Edition 2021. URL <https://presse.filiere-laitiere.fr/assets/leconomie-laitiere-en-chiffres-edition-2021-57c4-ef05e.html?lang=fr>
- CNIEL, 2021b. La filière laitière française - Les Fromages. URL <https://www.filiere-laitiere.fr/fr/fromages>
- Collado, C., Medina, L., Zorraquino, A., Baeza, T., Ferrer, C., Plazas, J., Colom, M.F., 2013. Cutaneous fusariosis by a species of the *Fusarium dimerum* species complex in a patient with acute myeloblastic leukemia. Revista Iberoamericana de Micología 30, 119–121. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2012.11.001>
- Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G., 2003. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. International Dairy Journal 13, 841–866. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00109-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00109-2)
- Cordova, L.T., Alper, H.S., 2018. Production of α -linolenic acid in *Yarrowia lipolytica* using low-temperature fermentation. Appl Microbiol Biotechnol 102, 8809–8816. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9349-y>
- Coton, E., Coton, M., Hymery, N., Mounier, J., Jany, J.-L., 2020. *Penicillium roqueforti*: an overview of its genetics, physiology, metabolism and biotechnological applications. Fungal Biology Reviews 34, 59–73. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2020.03.001>
- Coton, M., Pawtowski, A., Taminau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume-Labarthe, L., Fall, A., Daube, G., Coton, E., 2017. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. FEMS Microbiol Ecol 93. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix048>
- Cotter, P.D., Beresford, T.P., 2017. Chapter 15 - Microbiome changes during ripening, in: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W. (Eds.), Cheese (Fourth Edition). Academic Press, San Diego, pp. 389–409. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00015-6>

- Cronin, D.A., Ward, M.K., 1971. The characterisation of some mushroom volatiles. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 22, 477–479. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740220912>
- Crous, P.W., Lombard, L., Sandoval-Denis, M., Seifert, K.A., Schroers, H.-J., Chaverri, P., et al., 2021. *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. *Studies in Mycology* 98, 100116. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2021.100116>

D

- Dagnas, S., Membré, J.-M., 2013. Predicting and preventing mold spoilage of food products. *J. Food Prot.* 76, 538–551. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-349>
- Dantigny, P., Guilmart, A., Bensoussan, M., 2005. Basis of predictive mycology. *Int. J. Food Microbiol.* 100, 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.013>
- de Queiroz, K., 2005. Ernst Mayr and the modern concept of species. *PNAS* 102, 6600–6607. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502030102>
- de Queiroz, K., 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation, in: Howard, D.J., Berlocher, S.H. (Eds.), *Endless Forms: Species and Speciation*. Oxford University Press, pp. 57–75.
- Declerck, S., D’Or, D., Cranenbrouck, S., Le Boulengé, É., 2001. Modelling the sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi in monoxenic culture. *Mycorrhiza* 11, 225–230. <https://doi.org/10.1007/s005720100124>
- Deng, W., Maust, B.S., Nickle, D.C., Learn, G.H., Liu, Y., Heath, L., Kosakovsky Pond, S.L., Mullins, J.I., 2010. DIVEIN: a web server to analyze phylogenies, sequence divergence, diversity, and informative sites. *Biotechniques* 48, 405–408. <https://doi.org/10.2144/000113370>
- Diekmann, H., 1970. Metabolic products of microorganisms. 81. Occurrence and structures of coprogen B and dimerum acid. *Arch Mikrobiol* 73, 65–76.
- Dimidi, E., Cox, S.R., Rossi, M., Whelan, K., 2019. Fermented Foods: Definitions and characteristics, impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal health and disease. *Nutrients* 11, E1806. <https://doi.org/10.3390/nu11081806>
- do Carmo, A., Costa, E., Marques, M., Quadrado, M.J., Tomé, R., 2016. *Fusarium dimerum* species complex (*Fusarium penzigii*) keratitis after corneal trauma. *Mycopathologia* 181, 879–884. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0060-1>
- Domingos-Lopes, M.F.P., Stanton, C., Ross, P.R., Dapkevicius, M.L.E., Silva, C.C.G., 2017. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiology* 63, 178–190. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.014>
- Dugat-Bony, E., Bonnarme, P., Fraud, S., Catellote, J., Sarthou, A.-S., Loux, V., et al., 2019. Effect of sodium chloride reduction or partial substitution with potassium chloride on the microbiological, biochemical and sensory characteristics of semi-hard and soft cheeses. *Food Research International* 125, 108643. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108643>
- Dugat-Bony, E., Garnier, L., Denonfoux, J., Ferreira, S., Sarthou, A.-S., Bonnarme, P., Irlinger, F., 2016. Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. *International Journal of Food Microbiology* 238, 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.026>
- Dugat-Bony, E., Straub, C., Teissandier, A., Onésime, D., Loux, V., Monnet, C., Irlinger, F., Landaud, S., Leclercq-Perlat, M.-N., Bento, P., Fraud, S., Gibrat, J.-F., Aubert, J., Fer, F., Guédon, E., Pons,

N., Kennedy, S., Beckerich, J.-M., Swennen, D., Bonnarne, P., 2015. Overview of a surface-ripened cheese community functioning by meta-omics analyses. *PLoS One* 10, e0124360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124360>

Dumas, E., Feurtey, A., Rodríguez de la Vega, R.C., Le Prieur, S., Snirc, A., Coton, M., Thierry, A., Coton, E., Le Piver, M., Roueyre, D., Ropars, J., Branca, A., Giraud, T., 2020. Independent domestication events in the blue-cheese fungus *Penicillium roqueforti*. *Mol. Ecol.* <https://doi.org/10.1111/mec.15359>

Dupont, J., Dequin, S., Giraud, T., Tacon, F.L., Marsit, S., Ropars, J., Richard, F., Selosse, M.-A., 2017. Fungi as a Source of Food. *Microbiology Spectrum* 5. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0030-2016>

E

Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32, 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>

EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), Schrenk, D., Bodin, L., Chipman, J.K., del Mazo, J., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., et al., 2020. Risk assessment of ochratoxin A in food. *EFSA Journal* 18, 6113. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6113>

Ekseth, O.K., Kuiper, M., Mironov, V., 2014. orthAgogue: an agile tool for the rapid prediction of orthology relations. *Bioinformatics* 30, 734–736. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt582>

Elmassry, M.M., Farag, M.A., Preissner, R., Gohlke, B.-O., Piechulla, B., Lemfack, M.C., 2020. Sixty-one volatiles have phylogenetic signals across bacterial domain and fungal kingdom. *Frontiers in Microbiology* 11, 2380. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.557253>

Eskola, M., Kos, G., Elliott, C.T., Hajšlová, J., Mayar, S., Krska, R., 2020. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited “FAO estimate” of 25. *Crit Rev Food Sci Nutr* 60, 2773–2789. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1658570>

Esteves, A., Saraiva, M., Correia, A., Alves, A., 2014. Botryosphaeriales fungi produce extracellular enzymes with biotechnological potential. *Canadian journal of microbiology* 60, 332–42. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0134>

F

Félix, C., Libório, S., Nunes, M., Félix, R., Duarte, A.S., Alves, A., Esteves, A.C., 2018. *Lasiodiplodia theobromae* as a producer of biotechnologically relevant enzymes. *Int J Mol Sci* 19, E29. <https://doi.org/10.3390/ijms19020029>

Firáková, S., Sturdíková, M., Liptaj, T., Prónayová, N., Bezákova, L., Proksa, B., 2008. Enniatins produced by *Fusarium dimerum*, an endophytic fungal strain. *Pharmazie* 63, 539–541.

Flores-Flores, R., Velázquez-del Valle, M.G., León-Rodríguez, R., Flores-Moctezuma, H.E., Hernández-Lauzardo, A.N., 2013. Identification of fungal species associated with cladode spot of Prickly Pear and their sensitivity to chitosan. *Journal of Phytopathology* 161, 544–552. <https://doi.org/10.1111/jph.12104>

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

- Fox, P.F., Guinee, T.P., 2020. Cheese: Overview, in: Reference Module in Food Science. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00093-3>
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H., 2017. Principal Families of Cheese, in: Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H. (Eds.), *Fundamentals of Cheese Science*. Springer US, Boston, MA, pp. 27–69. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_3
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., 2017. Chapter 1 - Cheese: An overview, in: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W. (Eds.), *Cheese (Fourth Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 5–21. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00001-6>
- Freedman, R.B., Radda, G.K., 1968. The reaction of 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid with amino acids, peptides and proteins. *Biochem J* 108, 383–391.
- Frisvad, J.C., 2014. *Penicillium/Penicillia* in food production, in: Batt, C.A., Tortorello, M.L. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*. Academic Press, Oxford, pp. 14–18. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00249-4>
- Frisvad, J.C., Hubka, V., Ezekiel, C.N., Hong, S.-B., Nováková, A., Chen, A.J., Arzanlou, M., Larsen, T.O., Sklenář, F., Mahakarnchanakul, W., Samson, R.A., Houbraeken, J., 2019. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Stud Mycol* 93, 1–63. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.06.001>
- Frisvad, J.C., Thrane, U., 1993. Chapter 8 Liquid column chromatography of mycotoxins, in: Betina, V. (Ed.), *Journal of Chromatography Library, Chromatography of Mycotoxins*. Elsevier, pp. 253–372. [https://doi.org/10.1016/S0301-4770\(08\)60568-0](https://doi.org/10.1016/S0301-4770(08)60568-0)
- Frisvad, J.C., Thrane, U., 1987. Standardized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone retention indices and UV-VIS spectra (diode array detection). *J Chromatogr* 404, 195–214. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)86850-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)86850-3)

G

- Ganesan, B., Weimer, B.C., 2017. Chapter 19 - Amino acid catabolism and its relationship to cheese flavor outcomes, in: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W. (Eds.), *Cheese (Fourth Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 483–516. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00019-3>
- Garnier, L., Valence, F., Pawtowski, A., Auhustsinava-Galerie, L., Frotté, N., Baroncelli, R., Deniel, F., Coton, E., Mounier, J., 2017. Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 241, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.026>
- Geisen, R., Cantor, M.D., Hansen, T.K., Holzapfel, W.H., Jakobsen, M., 2001. Characterization of *Penicillium roqueforti* strains used as cheese starter cultures by RAPD typing. *Int. J. Food Microbiol.* 65, 183–191. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00514-6](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00514-6)
- Geiser, D.M., Al-Hatmi, A.M.S., Aoki, T., Arie, T., Balmas, V., Barnes, I., et al., 2021. Phylogenomic analysis of a 55.1-kb 19-Gene dataset resolves a monophyletic *Fusarium* that includes the *Fusarium solani* species complex. *Phytopathology* PHYTO08200330LE. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-20-0330-LE>
- Geiser, D.M., Aoki, T., Bacon, C.W., Baker, S.E., Bhattacharyya, M.K., Brandt, M.E., et al., 2013. One fungus, one name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves

longstanding use. *Phytopathology* 103, 400–408. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-12-0150-LE>

Gerlach, W., Nirenberg, H., 1982. The genus *Fusarium* -- a pictorial atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem* 209: 1–406

Gillot, G., Jany, J.-L., Coton, M., Le Floch, G., Debaets, S., Ropars, J., López-Villavicencio, M., Dupont, J., Branca, A., Giraud, T., Coton, E., 2015. Insights into *Penicillium roqueforti* Morphological and Genetic Diversity. *PLoS ONE* 10, e0129849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129849>

Gillot, G., Jany, J.-L., Dominguez-Santos, R., Poirier, E., Debaets, S., Hidalgo, P.I., Ullán, R.V., Coton, E., Coton, M., 2017a. Genetic basis for mycophenolic acid production and strain-dependent production variability in *Penicillium roqueforti*. *Food Microbiology* 62, 239–250. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.013>

Gillot, G., Jany, J.-L., Poirier, E., Maillard, M.-B., Debaets, S., Thierry, A., Coton, E., Coton, M., 2017b. Functional diversity within the *Penicillium roqueforti* species. *Int J Food Microbiol* 241, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.001>

Greco, E., El-Aguizy, O., Ali, M.F., Foti, S., Cunsolo, V., Saletti, R., Ciliberto, E., 2018. Proteomic Analyses on an Ancient Egyptian Cheese and Biomolecular Evidence of Brucellosis. *Anal. Chem.* 90, 9673–9676. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02535>

Gryzenhout, M., Fouche, H.J., Swart, W.J., 2017. First report of a serious cladode disease of *Opuntia ficus-indica* (Prickly Pear) in South Africa caused by *Bisifusarium lunatum*. *Plant Disease* 101, 2148–2148. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-17-0377-PDN>

Guinee, T.P., 2004. Salting and the role of salt in cheese. *Int J Dairy Technol* 57, 99–109. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00145.x>

Guinee, T.P., Fox, P.F., 2017. Chapter 13 - Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects, in: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W. (Eds.), *Cheese (Fourth Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 317–375. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00013-2>

Gurkan, H., Yilmaztekin, M., Cakmakci, S., Hayaloglu, A.A., 2018. Volatile compounds and biogenic amines during the ripening of mold-ripened Civil cheese manufactured using three different strains of *Penicillium roqueforti*. *Journal of Food Safety* 38, e12568. <https://doi.org/10.1111/jfs.12568>

H

Han, C., Jang, M., Kim, M.J., Han, M.-H., Lee, K.-R., Hahn, J.-S., Ahn, J., 2021. Engineering *Yarrowia lipolytica* for de novo production of tetraacetyl phytosphingosine. *J Appl Microbiol* 130, 1981–1992. <https://doi.org/10.1111/jam.14931>

Harlé, O., Falentin, H., Niay, J., Valence, F., Courselaud, C., Chuat, V., Maillard, M.-B., Guédon, É., Deutsch, S.-M., Thierry, A., 2020. Diversity of the metabolic profiles of a broad range of lactic acid bacteria in soy juice fermentation. *Food Microbiol* 89, 103410. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103410>

Hassan, A.S., Al-Hatmi, A.M.S., Shobana, C.S., van Diepeningen, A.D., Kredics, L., Vágvölgyi, C., Homa, M., Meis, J.F., de Hoog, G.S., Narendran, V., Manikandan, P., IHFK Working Group, 2016. Antifungal susceptibility and phylogeny of opportunistic members of the genus *Fusarium* causing Human keratomycosis in South India. *Med. Mycol.* 54, 287–294. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv105>

- Hawksworth, D.L., Lücking, R., 2017. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiol Spectr* 5. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016>
- Hermet, A., Méheust, D., Mounier, J., Barbier, G., Jany, J.-L., 2012. Molecular systematics in the genus *Mucor* with special regards to species encountered in cheese. *Fungal Biology* 116, 692–705. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.04.002>
- Hermet, A., Mounier, J., Keravec, M., Vasseur, V., Barbier, G., Jany, J.L., 2014. Application of capillary electrophoresis single-stranded conformation polymorphism (CE-SSCP) analysis for identification of fungal communities in cheese. *Food Microbiology* 41, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.01.013>
- Hilário, S., Gonçalves, M.F.M., Alves, A., 2021. Using Genealogical Concordance and Coalescent-Based Species Delimitation to Assess Species Boundaries in the *Diaporthe* eres Complex. *Journal of Fungi* 7, 507. <https://doi.org/10.3390/jof7070507>
- Hoff, K., Lomsadze, A., Borodovsky, M., Stanke, M., 2019. Whole-genome annotation with BRAKER. *Methods Mol Biol* 1962, 65–95. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0_5
- Hymery, N., Vasseur, V., Coton, M., Mounier, J., Jany, J.-L., Barbier, G., Coton, E., 2014. Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 13, 437–456. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12069>
-

I

- Ibrar, M., Zhang, H., 2020. Construction of a hydrocarbon-degrading consortium and characterization of two new lipopeptides biosurfactants. *Science of The Total Environment* 714, 136400. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136400>
- Irlinger, F., Layec, S., Hélinck, S., Dugat-Bony, E., 2015. Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. *FEMS Microbiol Lett* 362, 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnu015>
- Irlinger, F., Monnet, C., 2021. Temporal differences in microbial composition of Époisses cheese rinds during ripening and storage. *J Dairy Sci* 104, 7500–7508. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20123>
- Irlinger, F., Mounier, J., 2009. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology, Food biotechnology / Plant biotechnology* 20, 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.02.016>
-

J

- James, T.Y., Stajich, J.E., Hittinger, C.T., Rokas, A., 2020. Toward a fully resolved fungal tree of life. *Annu Rev Microbiol* 74, 291–313. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-022020-051835>
- Jin, P., Wang, H., Liu, W., Fan, Y., Miao, W., 2018. A new cyclic lipopeptide isolated from *Bacillus amyloliquefaciens* HAB-2 and safety evaluation. *Pesticide Biochemistry and Physiology, Special Issue: Fungicide Toxicology in China* 147, 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.08.015>
- Jollivet, N., Chataud, J., Vayssier, Y., Bensoussan, M., Belin, J.-M., 1994. Production of volatile compounds in model milk and cheese media by eight strains of *Geotrichum candidum* Link. *Journal of Dairy Research* 61, 241–248. <https://doi.org/10.1017/S0022029900028259>

Joubert, A., Calmes, B., Berruyer, R., Pihet, M., Bouchara, J.-P., Simoneau, P., Guillemette, T., 2010. Laser nephelometry applied in an automated microplate system to study filamentous fungus growth. *Biotechniques* 48, 399–404. <https://doi.org/10.2144/000113399>

K

Kailasapathy, K., 2016. Chemical composition, physical, and functional properties of milk and milk ingredients, in: *Dairy Processing and Quality Assurance*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 77–105. <https://doi.org/10.1002/9781118810279.ch04>

Kalinina, S.A., Jagels, A., Hickert, S., Mauriz Marques, L.M., Cramer, B., Humpf, H.-U., 2018. Detection of the cytotoxic penitrems A-F in cheese from the european single market by HPLC-MS/MS. *J Agric Food Chem* 66, 1264–1269. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b06001>

Katoh, K., Rozewicki, J., Yamada, K.D., 2019. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* 20, 1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>

Kilcawley, K.N., 2017. Cheese Flavour, in: Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H. (Eds.), *Fundamentals of Cheese Science*. Springer US, Boston, MA, pp. 443–474. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_13

Kildgaard, S., Mansson, M., Dosen, I., Klitgaard, A., Frisvad, J.C., Larsen, T.O., Nielsen, K.F., 2014. Accurate dereplication of bioactive secondary metabolites from marine-derived fungi by UHPLC-DAD-QTOFMS and a MS/HRMS library. *Mar Drugs* 12, 3681–3705. <https://doi.org/10.3390/md12063681>

Klitgaard, A., Iversen, A., Andersen, M.R., Larsen, T.O., Frisvad, J.C., Nielsen, K.F., 2014. Aggressive dereplication using UHPLC-DAD-QTOF: screening extracts for up to 3000 fungal secondary metabolites. *Anal Bioanal Chem* 406, 1933–1943. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7582-x>

King, R., Brown, N.A., Urban, M., Hammond-Kosack, K.E., 2018. Inter-genome comparison of the Quorn fungus *Fusarium venenatum* and the closely related plant infecting pathogen *Fusarium graminearum*. *BMC Genomics* 19, 269. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4612-2>

Kohn, L.M., 2005. Mechanisms of fungal speciation. *Annu Rev Phytopathol* 43, 279–308. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135958>

Kosegarten, C.E., Ramírez-Corona, N., Mani-López, E., Palou, E., López-Malo, A., 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. *Int. J. Food Microbiol.* 240, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.024>

Kotogán, A., Németh, B., Vágvölgyi, C., Papp, T., Takó, M., 2014. Screening for Extracellular Lipase Enzymes with Transesterification Capacity in Mucoromycotina Strains. *Food Technology and Biotechnology* 52, 73–82.

Kulkarni, G., Sajjan, S., Karegoudar, T.B., 2011. Pathogenicity of indole-3-acetic acid producing fungus *Fusarium delphinoides* strain GPK towards chickpea and pigeon pea. *European Journal of Plant Pathology* 131, 355–369. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9813-3>

Kulkarni, G.B., Sanjeevkumar, S., Kirankumar, B., Santoshkumar, M., Karegoudar, T.B., 2013. Indole-3-acetic acid biosynthesis in *Fusarium delphinoides* strain GPK, a causal agent of Wilt in

Chickpea. *Appl Biochem Biotechnol* 169, 1292–1305. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-0037-6>

Kuraku, S., Zmasek, C.M., Nishimura, O., Katoh, K., 2013. aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity. *Nucleic Acids Research* 41, W22–W28. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt389>

L

Lai, J.-R., Ke, B.-J., Hsu, Y.-W., Lee, C.-L., 2019. Dimerumic acid and deferricoprogen produced by *Monascus purpureus* attenuate liquid ethanol diet-induced alcoholic hepatitis via suppressing NF- κ B inflammation signalling pathways and stimulation of AMPK-mediated lipid metabolism. *Journal of Functional Foods* 60, 103393. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.05.049>

Landis, E.A., Oliverio, A.M., McKenney, E.A., Nichols, L.M., Kfoury, N., Biango-Daniels, M., Shell, L.K., Madden, A.A., Shapiro, L., Sakunala, S., Drake, K., Robbat, A., Booker, M., Dunn, R.R., Fierer, N., Wolfe, B.E., 2021. The diversity and function of sourdough starter microbiomes. *Elife* 10, e61644. <https://doi.org/10.7554/eLife.61644>

Lavoie, K., Touchette, M., St-Gelais, D., Labrie, S., 2012. Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Sci Technol* 92, 455–468. <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0051-4>

Lebreton, A., Corre, E., Jany, J.-L., Brillet-Guéguen, L., Pèrez-Arques, C., Garre, V., Monsoor, M., Debuchy, R., Le Meur, C., Coton, E., Barbier, G., Meslet-Cladière, L., 2020. Comparative genomics applied to *Mucor* species with different lifestyles. *BMC Genomics* 21. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6256-2>

Lecomte, M., Berruyer, R., Latifa, H., Boedo, C., Hudhomme, P., Bersihand, S., Arul, J., Nguyen Quang, G., Gatto, J., Guilet, D., Richomme, P., Simoneau, P., Briard, M., Le Clerc, V., Poupard, P., 2012. Inhibitory effects of the carrot metabolites 6-methoxymellein and falcarindiol on development of the fungal leaf blight pathogen *Alternaria dauci*. *Physiol Mol Plant Pathol* 80, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2012.10.002>

Legg, A.K., Carr, A.J., Bennett, R.J., Johnston, K.A., 2017. Chapter 26 - General aspects of cheese technology, in: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W. (Eds.), *Cheese* (Fourth Edition). Academic Press, San Diego, pp. 643–675. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00026-0>

Leslie, J.F., Summerell, B.A., 2006. *The Fusarium laboratory manual*, Blackwell Publishing. ed.

Li, G., Kusari, S., Golz, C., Strohmman, C., Spiteller, M., 2016. Three cyclic pentapeptides and a cyclic lipopeptide produced by endophytic *Fusarium decemcellulare* LG53. *RSC Adv.* 6, 54092–54098. <https://doi.org/10.1039/C6RA10905E>

Liu, D., Zhang, P., Chen, D., Howell, K., 2019. From the vineyard to the winery: How microbial ecology drives regional distinctiveness of wine. *Front Microbiol* 10, 2679. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02679>

Lombard, L., van der Merwe, N.A., Groenewald, J.Z., Crous, P.W., 2015. Generic concepts in *Nectriaceae*. *Stud Mycol* 80, 189–245. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.12.002>

Luo, X., Shi, H., Wu, R., Wu, J., Pi, Y., Zheng, Y., Yue, X., 2018. $\Delta 12$ fatty acid desaturase gene from *Geotrichum candidum* in cheese: molecular cloning and functional characterization. *FEBS Open Bio* 9, 18–25. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12553>

M

- Ma, Z., Wang, N., Hu, J., Wang, S., 2012. Isolation and characterization of a new iturinic lipopeptide, mojavensin A produced by a marine-derived bacterium *Bacillus mojavensis* B0621A. *J Antibiot* 65, 317–322. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.19>
- Marino, M., Dubsky de Wittenau, G., Saccà, E., Cattonaro, F., Spadotto, A., Innocente, N., Radovic, S., Piasentier, E., Marroni, F., 2019. Metagenomic profiles of different types of Italian high-moisture Mozzarella cheese. *Food Microbiology* 79, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.007>
- Martín, J.F., Coton, M., 2017. Chapter 12 - Blue Cheese: Microbiota and Fungal Metabolites, in: Frias, J., Martinez-Villaluenga, C., Peñas, E. (Eds.), *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*. Academic Press, Boston, pp. 275–303. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802309-9.00012-1>
- McSweeney, P.L.H., 2017. Chapter 14 - Biochemistry of cheese ripening: Introduction and overview, in: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W. (Eds.), *Cheese (Fourth Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 379–387. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00014-4>
- McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., 1997. Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Lait* 77, 41–76. <https://doi.org/10.1051/lait:199713>
- McSweeney, P.L.H., Ottogalli, G., Fox, P.F., 2017. Chapter 31 - Diversity and classification of cheese varieties: An overview, in: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W. (Eds.), *Cheese (Fourth Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 781–808. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00031-4>
- Medina, A., Lambert, R.J.W., Magan, N., 2012. Rapid throughput analysis of filamentous fungal growth using turbidimetric measurements with the Bioscreen C: a tool for screening antifungal compounds. *Fungal Biology* 116, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.11.001>
- Milgroom, M.G., 2017. *Population Biology of Plant Pathogens: Genetics, Ecology, and Evolution, General Plant Pathology*. The American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/9780890544525>
- Minh, B.Q., Schmidt, H.A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M.D., von Haeseler, A., Lanfear, R., 2020. IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol. Biol. Evol.* 37, 1530–1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
- Mnif, I., Ghribi, D., 2015. Review lipopeptides biosurfactants: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. *Biopolymers* 104, 129–147. <https://doi.org/10.1002/bip.22630>
- Mohamed, H., El-Shanawany, A.-R., Shah, A.M., Nazir, Y., Naz, T., Ullah, S., Mustafa, K., Song, Y., 2020. Comparative analysis of different isolated oleaginous Mucoromycota fungi for their γ -linolenic acid and carotenoid production. *Biomed Res Int* 2020, 3621543. <https://doi.org/10.1155/2020/3621543>
- Molimard, P., Spinnler, H.E., 1996. Review: Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. *Journal of Dairy Science* 79, 169–184. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76348-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76348-8)
- Mongiardino Koch, N., Soto, I.M., Galvagno, M., Hasson, E., Iannone, L., 2015. Biodiversity of cactophilic microorganisms in western Argentina: community structure and species

composition in the necroses of two sympatric cactus hosts. *Fungal Ecology* 13, 167–180. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.10.001>

- Monnet, C., Dugat-Bony, E., Swennen, D., Beckerich, J.-M., Irlinger, F., Fraud, S., Bonnarme, P., 2016. Investigation of the activity of the microorganisms in a Reblochon-style cheese by metatranscriptomic analysis. *Frontiers in Microbiology* 7, 536. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00536>
- Monnet, C., Landaud, S., Bonnarme, P., Swennen, D., 2015. Growth and adaptation of microorganisms on the cheese surface. *FEMS Microbiol Lett* 362, 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnu025>
- Monnet, C., Loux, V., Gibrat, J.-F., Spinnler, E., Barbe, V., Vacherie, B., Gavory, F., Gourbeyre, E., Siguier, P., Chandler, M., Elleuch, R., Irlinger, F., Vallaeys, T., 2010. The arthrobacter arilaitensis Re117 genome sequence reveals its genetic adaptation to the surface of cheese. *PLoS One* 5, e15489. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015489>
- Morin-Sardin, S., Rigalma, K., Coroller, L., Jany, J.-L., Coton, E., 2016. Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor* spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese. *Food Microbiol.* 56, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.11.019>
- Morita, H., Yoshikawa, H., Suzuki, T., Hisamatsu, S., Kato, Y., Sakata, R., Nagata, Y., Yoshimura, T., 2004. Anti-microbial action against verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 of nitric oxide derived from sodium nitrite. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1027–1034. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.1027>
- Mounier, J., 2015. Microbial interactions in smear-ripened cheeses, in: Bora, N., Dodd, C., Desmasures, N. (Eds.), *Diversity, Dynamics and Functional Role of Actinomycetes on European Smear Ripened Cheeses*. Springer International Publishing, Cham, pp. 155–166. https://doi.org/10.1007/978-3-319-10464-5_6
- Mounier, J., Coton, M., Irlinger, F., Landaud, S., Bonnarme, P., 2017. Chapter 38 - Smear-Ripened Cheeses, in: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W. (Eds.), *Cheese* (Fourth Edition). Academic Press, San Diego, pp. 955–996. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00038-7>

N

- Nanjundan, J., Ramasamy, R., Uthandi, S., Ponnusamy, M., 2019. Antimicrobial activity and spectroscopic characterization of surfactin class of lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* SR1. *Microbial Pathogenesis* 128, 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.037>
- Naranjo-Ortiz, M.A., Gabaldón, T., 2019. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews* 94, 2101–2137. <https://doi.org/10.1111/brv.12550>
- Nguyen Van Long, N., Rigalma, K., Coroller, L., Dadure, R., Debaets, S., Mounier, J., Vasseur, V., 2017a. Modelling the effect of water activity reduction by sodium chloride or glycerol on conidial germination and radial growth of filamentous fungi encountered in dairy foods. *Food Microbiol.* 68, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.06.014>
- Nguyen Van Long, N., Rigalma, K., Jany, J.-L., Mounier, J., Vasseur, V., 2021. Intraspecific variability in cardinal growth temperatures and water activities within a large diversity of *Penicillium roqueforti* strains. *Food Research International* 148, 110610. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110610>

- Nguyen Van Long, N., Vasseur, V., Coroller, L., Dantigny, P., Le Panse, S., Weill, A., Mounier, J., Rigalma, K., 2017b. Temperature, water activity and pH during conidia production affect the physiological state and germination time of *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology* 241, 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.022>
- Nielsen, K.F., Månsson, M., Rank, C., Frisvad, J.C., Larsen, T.O., 2011. Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. *J NAT PROD* 74, 2338–2348. <https://doi.org/10.1021/np200254t>
-

O

- O'Donnell, K., Al-Hatmi, A.M.S., Aoki, T., Brankovics, B., Cano-Lira, J.F., Coleman, J.J., et al., 2020. No to *Neocosmospora*: Phylogenomic and practical reasons for continued inclusion of the *Fusarium solani* species complex in the genus *Fusarium*. *mSphere* 5, e00810-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00810-20>
- O'Donnell, K., Sarver, B.A.J., Brandt, M., Chang, D.C., Noble-Wang, J., Park, B.J., et al., 2007. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic fusaria, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. *J Clin Microbiol* 45, 2235–2248. <https://doi.org/10.1128/JCM.00533-07>
- O'Donnell, K., Sutton, D.A., Rinaldi, M.G., Sarver, B.A.J., Balajee, S.A., Schroers, H.-J., et al., 2010. Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *J Clin Microbiol* 48, 3708–3718. <https://doi.org/10.1128/JCM.00989-10>
- Ottogalli, G., 2000. A global comparative method for the classification of world cheeses (with special reference to microbiological criteria). *Annali di Microbiologia ed Enzimologia (Italy)*.
- Ozturkoglu-Budak, S., Wiebenga, A., Bron, P.A., de Vries, R.P., 2016. Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 237, 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.007>
-

P

- Pain, A., Hertz-Fowler, C., 2008. Genomic adaptation: a fungal perspective. *Nat Rev Microbiol* 6, 572–573. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1964>
- Park, J.-H., Oh, J., Song, J.-S., Kim, J., Sung, G.-H., 2019. *Bisifusarium delphinoides*, an emerging opportunistic pathogen in a burn patient with diabetes mellitus. *Mycobiology* 47, 340–345. <https://doi.org/10.1080/12298093.2019.1628521>
- Paziani, M.H., Tonani Carvalho, L., Carvalho Melhem, M. de S., Gottardo de Almeida, M.T., Nadaletto Bonifácio da Silva, M.E., Martinez, R., Santos, C., Kress, M.R. von Z., 2019. First comprehensive report of clinical *Fusarium* strains isolated in the state of Sao Paulo (Brazil) and identified by MALDI-TOF MS and molecular biology. *Microorganisms* 8, E66. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010066>
- Penland, M., Deutsch, S.-M., Falentin, H., Pawtowski, A., Poirier, E., Visenti, G., Le Meur, C., Maillard, M.-B., Thierry, A., Mounier, J., Coton, M., 2020. Deciphering microbial community dynamics and biochemical changes during Nyons black olive natural fermentations. *Front Microbiol* 11, 586614. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.586614>
- Penland, M., Falentin, H., Parayre, S., Pawtowski, A., Maillard, M.-B., Thierry, A., et al., 2021. Linking Pélardon artisanal goat cheese microbial communities to aroma compounds during cheese-making and ripening. *International Journal of Food Microbiology* 345, 109130. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109130>

Pinon, A., Zwietering, M., Perrier, L., Membré, J.-M., Leporq, B., Mettler, E., Thuault, D., Coroller, L., Stahl, V., Vialette, M., 2004. Development and validation of experimental protocols for use of cardinal models for prediction of microorganism growth in food products. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1081–1087. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.1081-1087.2004>

Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2009. *Fungi and Food Spoilage*. Springer Science & Business Media.

Pogačić, T., Maillard, M.-B., Leclerc, A., Hervé, C., Chuat, V., Yee, A.L., Valence, F., Thierry, A., 2015. A methodological approach to screen diverse cheese-related bacteria for their ability to produce aroma compounds. *Food Microbiology* 46, 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.018>

Q

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., 2019. Development and application of MALDI-TOF MS for identification of food spoilage fungi. *Food Microbiology, Microbial Spoilers in Food 2017 Symposium* 81, 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.05.001>

R

Rambaut, A., 2006. FigTree. URL <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.

Rambaut, A., Drummond, A.J., Xie, D., Baele, G., Suchard, M.A., 2018. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst Biol* 67, 901–904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>

Ranwez, V., Douzery, E.J.P., Cambon, C., Chantret, N., Delsuc, F., 2018. MACSE v2: Toolkit for the alignment of coding sequences accounting for frameshifts and stop codons. *Molecular Biology and Evolution* 35, 2582–2584. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy159>

Ratomahenina, R., Boom, S., Galzy, P., Dieu, B., 1995. Study of growth parameters of *Cylindrocarpou* sp., a mould isolated from Saint-Nectaire cheese. undefined.

Rattray, F.P., Eppert, I., 2011. Cheese | Secondary Cultures, in: Fuquay, J.W. (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Second Edition). Academic Press, San Diego, pp. 567–573. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00068-6>

Ray, R., Ghosh, M., Chatterjee, M., Chatterjee, N., Banerjee, M., 2016. Onychomycosis caused by *Fusarium dimerum*. *Journal of Clinical and Scientific Research* 5, 44–48. <https://doi.org/10.15380/2277-5706.JCSR.14.062>

Richards, T.A., Leonard, G., Wideman, J.G., 2017. What defines the “Kingdom” fungi? *Microbiol Spectr* 5. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0044-2017>

Rico-Munoz, E., Samson, R.A., Houbraken, J., 2019. Mould spoilage of foods and beverages: Using the right methodology. *Food Microbiol* 81, 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.016>

Ropars, J., Cruaud, C., Lacoste, S., Dupont, J., 2012. A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. *Int. J. Food Microbiol.* 155, 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.005>

Ropars, J., Didiot, E., Rodríguez de la Vega, R.C., Bennetot, B., Coton, M., Poirier, E., Coton, E., Snirc, A., Le Prieur, S., Giraud, T., 2020. Domestication of the emblematic white cheese-making fungus *Penicillium camemberti* and its diversification into two varieties. *Current Biology* 30, 4441–4453.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.08.082>

- Ropars, J., Lo, Y.-C., Dumas, E., Snirc, A., Begerow, D., Rollnik, T., Lacoste, S., Dupont, J., Giraud, T., López-Villavicencio, M., 2016. Fertility depression among cheese-making *Penicillium roqueforti* strains suggests degeneration during domestication. *Evolution* 70, 2099–2109. <https://doi.org/10.1111/evo.13015>
- Ropars, J., López-Villavicencio, M., Dupont, J., Snirc, A., Gillot, G., Coton, M., Jany, J.-L., Coton, E., Giraud, T., 2014. Induction of sexual reproduction and genetic diversity in the cheese fungus *Penicillium roqueforti*. *Evol Appl* 7, 433–441. <https://doi.org/10.1111/eva.12140>
- Ropars, J., López-Villavicencio, M., Snirc, A., Lacoste, S., Giraud, T., 2017. Blue cheese-making has shaped the population genetic structure of the mould *Penicillium roqueforti*. *PLoS One* 12, e0171387. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171387>
- Ropars, J., Rodríguez de la Vega, R.C., López-Villavicencio, M., Gouzy, J., Sallet, E., Dumas, É., Lacoste, S., Debuchy, R., Dupont, J., Branca, A., Giraud, T., 2015. Adaptive horizontal gene transfers between multiple cheese-associated fungi. *Curr Biol* 25, 2562–2569. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.08.025>
- Rosso, L., Lobry, J., Charles (Bajard), S., Flandrois, J.-P., 1995. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Appl Environ Microbiol* 61, 610–6. <https://doi.org/10.1128/AEM.61.2.610-616.1995>
- Rosso, L., Lobry, J.R., Flandrois, J.P., 1993. An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. *J Theor Biol* 162, 447–463. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1993.1099>
- Ruggiero, M.A., Gordon, D.P., Orrell, T.M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R.C., Cavalier-Smith, T., Guiry, M.D., Kirk, P.M., 2015. A higher level classification of all living organisms. *PLoS One* 10, e0119248. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119248>
- Ruse, M., 1969. Definitions of species in biology. *The British Journal for the Philosophy of Science* 20, 97–119.

S

- Salah, H., Al-Hatmi, A., Theelen, B.J.F., Abukamar, M., Hashim, S., van Diepeningen, A., Las-Floerl, C., Boekhout, T., Almaslamani, M., Taj-Aldeen, S., 2015. Phylogenetic diversity of human pathogenic *Fusarium* and emergence of uncommon virulent species. *The Journal of Infection* 71. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.08.011>
- Samapundo, S., De Meulenaer, B., Atukwase, A., Debevere, J., Devlieghere, F., 2007. The influence of modified atmospheres and their interaction with water activity on the radial growth and fumonisin B1 production of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. Part II: The effect of initial headspace oxygen concentration. *International Journal of Food Microbiology* 113, 339–345. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.006>
- Samson, R., Seifert, K., Kuijpers, A., Houbaken, J., Frisvad, J., 2004. Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial B-tubulin sequences. *Studies in Mycology* 2004, 175–200.
- Sandoval-Denis, M., Guarnaccia, V., Polizzi, G., Crous, P.W., 2018. Symptomatic *Citrus* trees reveal a new pathogenic lineage in *Fusarium* and two new *Neocosmospora* species. *Persoonia* 40, 1–25. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.40.01>
- Sandoval-Denis, M., Lombard, L., Crous, P.W., 2019. Back to the roots: a reappraisal of *Neocosmospora*. *Persoonia* 43, 90–185. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2019.43.04>

- Sardella, D., Gatt, R., Valdramidis, V.P., 2018. Assessing the efficacy of zinc oxide nanoparticles against *Penicillium expansum* by automated turbidimetric analysis. *Mycology* 9, 43–48. <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1369187>
- Sautour, M., Soares Mansur, C., Divies, C., Bensoussan, M., Dantigny, P., 2002. Comparison of the effects of temperature and water activity on growth rate of food spoilage moulds. *J Ind Microbiol Biotechnol* 28, 311–315. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000248>
- Savary, O., Coton, M., Frisvad, J.C., Nodet, P., Ropars, J., Coton, E., Jany, J.-L., 2021a. Unexpected *Nectriaceae* species diversity in cheese, description of *Bisifusarium allantoides* sp. nov., *Bisifusarium penicilloides* sp. nov., *Longinectria* gen. nov. *lagenoides* sp. nov. and *Longinectria verticilliforme* sp. nov. *Mycosphere* 12(1), 1077–1100. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/12/1/13>
- Savary O., Mounier J., Thierry A., Poirier E., Jourden J., Maillard M.-B., Penland M., Decamps C., Coton E., Coton M., 2021b. Tailor-made microbial consortium for Kombucha fermentation: Microbiota-induced biochemical changes and biofilm formation. *Food Research International*. 147, 110549. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110549>
- Savary, O., Coton, M., Jany, J.L., Coroller, L., Coton, E., 2022. Effect of abiotic factors and culture media on the growth of cheese-associated *Nectriaceae* species. *International Journal of Food Microbiology*. 364, 109509. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109509>
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Consortium, F.B., 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS* 109, 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Schorsch, C., Boles, E., Schaffer, S., 2013. Biotechnological production of sphingoid bases and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 4301–4308. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4878-x>
- Schroers, H.-J., O'Donnell, K., Lamprecht, S.C., Kammeyer, P.L., Johnson, S., Sutton, D.A., Rinaldi, M.G., Geiser, D.M., Summerbell, R.C., 2009. Taxonomy and phylogeny of the *Fusarium dimerum* species group. *Mycologia* 101, 44–70. <https://doi.org/10.3852/08-002>
- Schulz, M.E., 1952. Klassifizierung von Kasë. *Milchwissenschaft*.
- Sharpton, T.J., Stajich, J.E., Rounsley, S.D., Gardner, M.J., Wortman, J.R., Jordan, V.S., et al., 2009. Comparative genomic analyses of the human fungal pathogens *Coccidioides* and their relatives. *Genome Res* 19, 1722–1731. <https://doi.org/10.1101/gr.087551.108>
- Short, D.P.G., O'Donnell, K., Zhang, N., Juba, J.H., Geiser, D.M., 2011. Widespread occurrence of diverse Human pathogenic types of the fungus *Fusarium* detected in plumbing drains. *Journal of Clinical Microbiology* 49, 4264–4272. <https://doi.org/10.1128/JCM.05468-11>
- Simon, L., Gastaud, L., Martiano, D., Bailleux, C., Hasseine, L., Gari-Toussaint, M., 2018. First endogenous fungal endophthalmitis due to *Fusarium dimerum*: A severe eye infection contracted during induction chemotherapy for acute leukemia. *Journal de Mycologie Médicale* 28, 403–406. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.01.002>
- Simpson, G.G., 1951. The species concept. *Evolution* 5, 285–298. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1951.tb02788.x>
- Spatafora, J.W., Aime, M.C., Grigoriev, I.V., Martin, F., Stajich, J.E., Blackwell, M., 2017. The fungal tree of life: from molecular systematics to genome-scale phylogenies. *Microbiol Spectr* 5. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0053-2016>

- Spinnler, H.-E., 2017. Chapter 36 - Surface Mold–Ripened Cheeses, in: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W. (Eds.), *Cheese (Fourth Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 911–928. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00036-3>
- Spitaels, F., Wieme, A.D., Janssens, M., Aerts, M., Van Landschoot, A., De Vuyst, L., Vandamme, P., 2015. The microbial diversity of an industrially produced lambic beer shares members of a traditionally produced one and reveals a core microbiota for lambic beer fermentation. *Food Microbiol* 49, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.01.008>
- Stamatakis, A., 2016. *The RAxML v8. 2. X Manual*. Heidelberg Institute for Theoretical Studies.
- Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30, 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Steinberg, C., Laurent, J., Edel-Hermann, V., Barbezant, M., Sixt, N., Dalle, F., et al., 2015. Adaptation of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium dimerum* to the specific aquatic environment provided by the water systems of hospitals. *Water Research* 76, 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.036>
- Stepaniak, L., Kornacki, K., Grabska, J., Rymaszewski, J., Cichosz, G., 1980. Lipolytic and proteolytic activity of *Penicillium roqueforti*, *Penicillium candidum* and *Penicillium camemberti* strains. *Acta alimentaria polonica* 6, 155–165.
- Suihko, M.-L., Alakomi, H.-L., Gorbushina, A., Fortune, I., Marquardt, J., Saarela, M., 2007. Characterization of aerobic bacterial and fungal microbiota on surfaces of historic Scottish monuments. *Syst Appl Microbiol* 30, 494–508. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2007.05.001>
- Summerell, B.A., 2019. Resolving *Fusarium*: Current Status of the Genus. *Annu Rev Phytopathol* 57, 323–339. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100204>
- Sun, B.-D., Zhou, Y.-G., Chen, A.-J., 2017. *Bisifusarium tonghuanum* (Nectriaceae), a novel species of *Fusarium* -like fungi from two desert oasis plants. *Phytotaxa* 317, 123–129. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.317.2.4>
- Sweeney, M.J., Dobson, A.D., 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int J Food Microbiol* 43, 141–158. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(98\)00112-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(98)00112-3)
- Swofford, D.L., 2003. *Paup**. Phylogenetic analysis using parsimony and other methods. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Symolon, H., Bushnev, A., Peng, Q., Ramaraju, H., Mays, S.G., Allegood, J.C., et al., 2011. Enigmol: A novel sphingolipid analog with anti-cancer activity against cancer cell lines and in vivo models for intestinal and prostate cancer. *Mol Cancer Ther* 10, 648–657. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0754>

T

- Tamang, J.P., Cotter, P.D., Endo, A., Han, N.S., Kort, R., Liu, S.Q., Mayo, B., Westerik, N., Hutkins, R., 2020. Fermented foods in a global age: East meets West. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 19, 184–217. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12520>
- Tamang, J.P., Holzapfel, W.H., Shin, D.H., Felis, G.E., 2017. Editorial: Microbiology of ethnic fermented foods and alcoholic beverages of the world. *Frontiers in Microbiology* 8, 1377. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01377>

- Tamang, J.P., Shin, D.-H., Jung, S.-J., Chae, S.-W., 2016. Functional properties of microorganisms in fermented foods. *Frontiers in Microbiology* 7, 578. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00578>
- Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S., Fisher, M.C., 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31, 21–32. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1228>
- Thierry, A., Collins, Y.F., Abeijón Mukdsi, M.C., McSweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G., Spinnler, H.E., 2017. Chapter 17 - Lipolysis and metabolism of fatty acids in cheese, in: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W. (Eds.), *Cheese (Fourth Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 423–444. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00017-X>
- Tjørve, K., Tjørve, E., 2017. The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: An addition to the Unified-Richards family. *PLOS ONE* 12, e0178691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178691>
- Toral, L., Rodríguez, M., Béjar, V., Sampedro, I., 2018. Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Microbiology* 9, 1315. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01315>
- Trunet, C., Mtimet, N., Mathot, A.-G., Postollec, F., Leguerinel, I., Sohier, D., Couvert, O., Carlin, F., Coroller, L., 2015. Modeling the recovery of heat-treated *Bacillus licheniformis* Ad978 and *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores at suboptimal temperature and pH using growth limits. *Appl Environ Microbiol* 81, 562–568. <https://doi.org/10.1128/AEM.02520-14>
- Tyakht, A., Kopeliovich, A., Klimenko, N., Efimova, D., Dovidchenko, N., Odintsova, V., Kleimenov, M., Toshchakov, S., Popova, A., Khomyakova, M., Merkel, A., 2021. Characteristics of bacterial and yeast microbiomes in spontaneous and mixed-fermentation beer and cider. *Food Microbiology* 94, 103658. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103658>

W

- Willis, K.J., 2018. *State of the World's Fungi 2018*. Report, Royal Botanic Gardens, Kew. ed.
- Wingfield, M.J., De Beer, Z.W., Slippers, B., Wingfield, B.D., Groenewald, J.Z., Lombard, L., Crous, P.W., 2012. One fungus, one name promotes progressive plant pathology. *Mol Plant Pathol* 13, 604–613. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00768.x>
- Wolfe, B., 2018. Webinar “Microbiology of cheese rinds by Benjamin Wolfe.” Australian Dairy Manufacturing Resource Centre, <https://www.youtube.com/watch?v=LgOsYpTve08>.
- Wolfe, B., 2014. Microbe Guide: *Fusarium domesticum*. MicrobialFoods.org. URL <http://microbialfoods.org/microbe-guide-fusarium-domesticum/>.
- Wolfe, B.E., Button, J.E., Santarelli, M., Dutton, R.J., 2014. Cheese rind communities provide tractable systems for *in situ* and *in vitro* studies of microbial diversity. *Cell* 158, 422–433. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.041>
- Wolfe, B.E., Dutton, R.J., 2015. Fermented foods as experimentally tractable microbial ecosystems. *Cell* 161, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.034>

Y

- Yang, Y., Shevchenko, Anna, Knaust, A., Abuduresule, I., Li, W., Hu, X., Wang, C., Shevchenko, Andrej, 2014. Proteomics evidence for kefir dairy in Early Bronze Age China. *Journal of Archaeological Science* 45, 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2014.02.005>

Yang, Z., 2006. Computational Molecular Evolution. Oxford: Oxford University Press.

Yeluri Jonnala, B.R., McSweeney, P.L.H., Sheehan, J.J., Cotter, P.D., 2018. Sequencing of the cheese microbiome and its relevance to industry. *Front Microbiol* 9, 1020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01020>

Z

Zhang, N., O'Donnell, K., Sutton, D.A., Nalim, F.A., Summerbell, R.C., Padhye, A.A., Geiser, D.M., 2006. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *J Clin Microbiol* 44, 2186–2190. <https://doi.org/10.1128/JCM.00120-06>

Zhao, P., Xue, Y., Li, X., Li, J., Zhao, Z., Quan, C., Gao, W., Zu, X., Bai, X., Feng, S., 2019. Fungi-derived lipopeptide antibiotics developed since 2000. *Peptides* 113, 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.02.002>

Zhao, X., Zheng, Z., Zhang, J., Sarwar, A., Aziz, T., Yang, Z., 2019. Change of proteolysis and sensory profile during ripening of Cheddar-style cheese as influenced by a microbial rennet from rice wine. *Food Sci Nutr* 7, 1540–1550. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1003>

Zhao, Z., Liu, H., Wang, C., Xu, J.-R., 2013. Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BMC Genomics* 14, 274. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-274>

Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., van 't Riet, K., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol* 56, 1875–1881.

Valorisations scientifiques

Publications

Savary O., Coton M., Frisvad J.C., Nodet P., Ropars J., Coton E. and Jany J-L. (2021). Unexpected *Nectriaceae* species diversity in cheese, description of *Bisifusarium allantoides* sp. nov., *Bisifusarium penicilloides* sp. nov., *Longinectria* gen. nov. *lagenoides* sp. nov. and *Longinectria verticilliforme* sp. nov. *Mycosphere* 12(1), 1077–1100, Doi 10.5943/mycosphere/12/1/13 (**publié**)

Savary O., Coton M., Jany J-L., Coroller L. and Coton E. (2022). Effect of abiotic factors and culture media on the growth of cheese-associated *Nectriaceae* species. *International Journal of Food Microbiology*. 364, 109509. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109509> (**publié**)

Savary O., Coton E., Maillard M-B., Gaucheron F., Thierry A., Jany J-L, Coton M., Functional diversity of *B. domesticum* and the newly described cheese-associated *Nectriaceae* species, *B. allantoides*, *B. penicilloides*, *L. lagenoides* and *L. verticilliforme*. **Manuscript en préparation pour soumission au journal Food Microbiology.**

***Publication réalisée durant la thèse sur les travaux de stage M2 :**

Savary O., Mounier J., Thierry A., Poirier E., Jourden J., Maillard M-B., Penland M., Decamps C., Coton E., Coton M. (2021). Tailor-made microbial consortium for Kombucha fermentation: Microbiota-induced biochemical changes and biofilm formation. *Food Research International*. 147, 110549. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110549>

Communications orales

Savary O., Coton M., Jany J-L. & Coton E. Comparative study of *Bisifusarium* spp. growth patterns by laser nephelometry automated microplate system – International Commission on Food Mycology, Conference 2019. 2-3 June 2019, Freising, Allemagne. (**présentation orale**)

Savary O., Coton M., Jany J-L. & Coton E. Impact des facteurs abiotiques sur la croissance des *Bisifusarium* spp. – Colloque de l'Institut Brestois Santé-Agro-Matière. Juin 2019, Brest. (**présentation orale**)

Savary O., Coton M., Jany J-L., Coroller L. & Coton E. Comparative study of *Bisifusarium* spp. growth patterns by laser nephelometry automated microplate system – Colloque de l'Institut Brestois Santé-Agro-Matière. Octobre 2019, Brest. (**présentation poster**)

Savary O., Coton M., Jany J-L., Coroller L. & Coton E. Effect of abiotic factors and culture media on the growth of cheese-associated *Nectriaceae* spp. – Journées scientifiques de l'Ecole Doctorale EGAAL, Rennes (visioconférence), 30 juin & 01 juillet 2021 (**présentation poster**)

Comparative study of *Bisifusarium* spp. growth patterns by laser nephelometry automated microplate system

Océane SAVARY¹, Monika COTON¹, Jean-Luc JANY¹, Louis COROLLER² and Emmanuel COTON¹

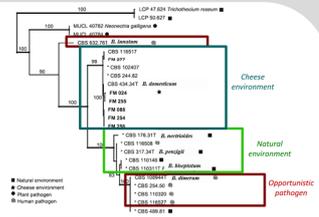
¹Univ Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, F-29280 Plouzané, France
²Univ Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, F-29280 Quimper, France

Email: oceane.savary@univ-brest.fr

Introduction

The *Bisifusarium* genus includes some filamentous fungi previously described as *Fusarium* (Lombard *et al.*, 2015). Species belonging to this genus have been described in various environments. *Bisifusarium nectrioides*, *B. penzigii*, *B. delphinoïdes* and *B. biseptatum* are associated to **natural environments** (e.g. plants), *B. lunatum* and *B. dimerum* are described as **opportunistic pathogens for humans** while *B. domesticum* has only been described in the **cheese environment** to date. The link between these species and their habitats raises questions in terms of how these fungal species adapt to their environment and how different factors (biotic or abiotic) can influence their growth.

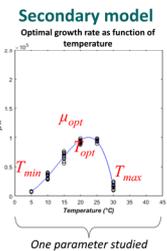
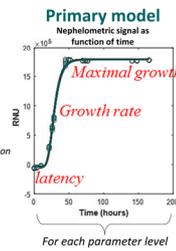
One way to evaluate this question is by **physiological studies**. The objective of this study was therefore to compare the impact of **abiotic factors** on the **fungal growth of *B. domesticum***, adapted to cheese, versus other *Bisifusarium* spp. to highlight potential species adaptation. To do so, a new high throughput method based on **laser nephelometry automated system** was used.



Methodology

* 7 species:

SPECIES
<i>B. biseptatum</i> : CBS 632.76
<i>B. delphinoïdes</i> : CBS 120718
<i>B. dimerum</i> : MNHN-RF-05625
<i>B. domesticum</i> : MNHN-RF-05627
<i>B. nectrioides</i> : CBS 176.31
<i>B. penzigii</i> : CBS 317.34
<i>B. lunatum</i> : CBS 632.76



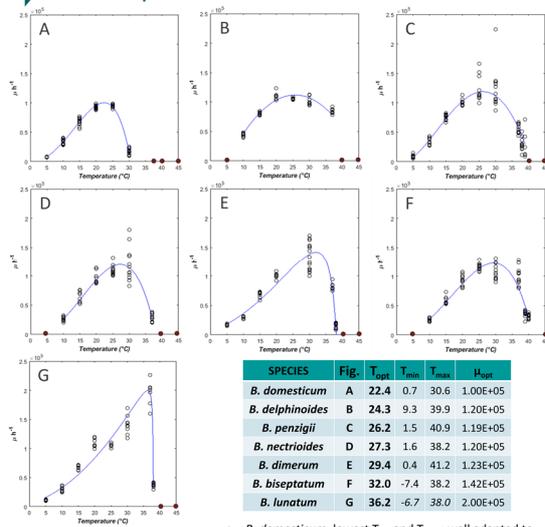
Cardinals Values:
Tmin, Topt, Tmax, μ_{opt}

* 4 abiotic factors:

Temperature: 5 to 45°C	pH: 2 to 14	Water activity: 0.99 to 0.86	NaCl: 2.9 to 20.9%
------------------------	-------------	------------------------------	--------------------

Results: Secondary models showing impact of abiotic factors on *Bisifusarium* spp. growth

Effect of temperature



Different behaviors:

- B. domesticum*: lowest T_{opt} and T_{max}: well adapted to cheese production conditions
- Human pathogens: prefer higher temperature: similar to those of human body

Effect of pH

- Low impact of pH from 5 to 10 for all *Bisifusarium* spp.
- B. domesticum*: highest pH_{opt} and pH_{min}

Effect of water activity (glycerol)

- Non significant differences between species
- a_wmin between 0.89 and 0.87

Effect of NaCl

(same water activities than with glycerol)

- 3 mains behaviors:
 - B. dimerum*, *B. delphinoïdes* and *B. penzigii*: until 14%
 - B. domesticum* and *B. nectrioides*: until 6%
 - B. biseptatum* and *B. lunatum*: until 3%
- B. domesticum*: not the most halotolerant although associated to salty products

Comparison of a_w impact modified by glycerol and NaCl:

SPECIES	a _w min (NaCl)	NaCl (%)	a _w min (glycerol)
<i>B. lunatum</i>	(0.99)	(2.9)	0.89
<i>B. biseptatum</i>	(0.99)	(2.9)	0.88
<i>B. delphinoïdes</i>	0.92	14.6	0.88
<i>B. penzigii</i>	0.93	13.7	0.87
<i>B. dimerum</i>	0.93	13.7	0.88
<i>B. nectrioides</i>	0.98	5.8	0.89
<i>B. domesticum</i>	0.98	5.8	0.89

For a same a_w: higher sensitivity with NaCl depressor (toxic effect of chloride ions)

Conclusions and perspectives

- Laser nephelometry automated microplate system**: high throughput method to quickly and accurately follow fungal growth versus the classical radial growth method (28 microplates vs. 2016 Petri dishes)
- Different behaviors between the seven *Bisifusarium***: provides new insight on these species and suggest adaptation of *B. domesticum* to cheese
- Perspectives**: to continue studying *B. domesticum* adaptation to cheese, by combination of different abiotic factors, for example, by growth on cheese or medium mimicking cheese and to determine potential markers of adaptation to cheese by comparative genomic analysis.

IBSAM 2019 – Brest, France

References:
 ◊ Lombard, L., van der Merwe, N.A., Groenewald, J.Z. & Crous, P.W. (2015) <http://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.12.002>
 ◊ Ropas, J., Cruaud, C., Lacombe, S. and Dupont, J. (2012) <https://doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2012.02.005>
 ◊ Zwietering, M. H., Jongenburger, J., Rombouts, F. M., Van't Riet, K., 1990. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC184525/>
 ◊ Rosso, L., Labry, J.R., Flandrois, J.P., 1993. <https://doi.org/10.1006/jb.1993.1099>

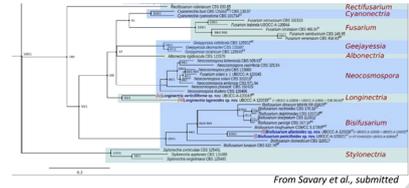
Financial support:



Introduction

- *Nectriaceae* spp. → associated to **natural environment**, or are plant or human **pathogens**
- *Bisifusarium domesticum* → **only Nectriaceae** described in **cheese environment**
- During this study, **4 new cheese-associated Nectriaceae spp.** identified based on multi-gene phylogenetic analyses: *B. allantoides* sp. nov., *B. penicilloides* sp. nov., *Longinetria lagenoides* sp. nov. gen. nov. and *L. verticilliforme* sp. nov. gen. nov.

➔ **Are cheese-associated *Nectriaceae* spp. better adapted to the cheese environment?**



Methodology

Cheese-associated spp.

- B. domesticum* (n=5)
- B. allantoides* (n=3)
- B. penicilloides* (n=3)
- L. lagenoides* (n=4)
- L. verticilliforme* (n=1)

- "Non-cheese" spp.**
- Bisifusarium* spp. (n= 6, type strains)

Impact of abiotic factors
(Laser nephelometry)



- T°C : 5–45°C
- pH : 2–14
- NaCl: 2.9–20.9 %

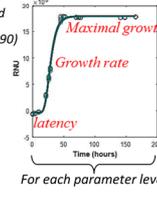
Impact of growth media
(Radial measurements)



- PDA
- Cheese agar
- Raclette de Savoie
- 12 & 25°C

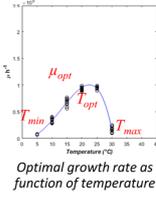
Gompertz modified equation (Zwietering et al., 1990)

Primary model



Cardinal model (Rosso et al., 1993)

Secondary model



Cardinal values
 $X_{min}, X_{opt}, X_{max}, \mu_{opt}$

Results: Physiological differences in growth characteristics

Temperature

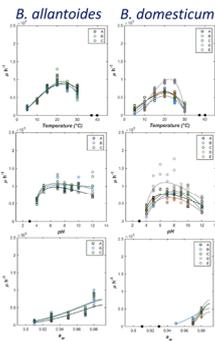
- ➔ *B. domesticum* & cheese-associated spp.: lowest T_{opt} (19.1–23.1 °C)
- "non-cheese" *Bisifusarium* spp.: highest T_{opt} (26.1–36.2 °C)

pH

- ➔ Low impact on growth: pH5–10

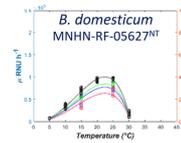
NaCl

- ➔ *B. domesticum*, not the most halotolerant but growth observed up to ~6 % NaCl



- ➔ PDA, cheese agar & Raclette de Savoie
- ➔ growth of all tested strains on the different media

- ➔ but *B. domesticum*: better growth on **cheese agar** and least affected on **Raclette de Savoie**



Conclusion: New physiological insights on cheese-associated *Nectriaceae* & *Bisifusarium* spp.

- Physiological differences in growth characteristics among the studied species
- **Cheese-associated species compatible with cheese making** → suggesting an adaptation to this food matrix
- *B. domesticum* → most adapted to cheese environment which is linked to its technological use ("anticollant")



Perspectives: Evaluation of the cheese-associated species functional diversity and impact on cheese matrices

Titre : Etude génétique et phénotypique de *Bisifusarium domesticum*

Mots clés : moisissure, fromage, diversité, physiologie, propriétés fonctionnelles, adaptation

Résumé : *Bisifusarium domesticum* est une moisissure associée uniquement aux fromages. Elle est utilisée pour un apport organoleptique dans les Saint-Nectaire et Reblochon et/ou pour sa propriété "anticollant", pour prévenir l'apparition de morges collantes. Malgré une utilisation fréquente en production et sa mise en évidence sur divers fromages, il n'y avait, jusqu'à ce jour, que très peu de connaissances scientifiques sur cette espèce. L'objectif de cette thèse était donc de combler ce déficit. Pour ce faire, une collection d'isolats de *B. domesticum* (n=25) a été réalisée et a conduit à l'observation d'une diversité inattendue de *Fusarium sensu lato* et à la description de quatre nouvelles espèces fongiques (*B. allantoides*, *B. penicilloides*, *Longinectria lagenoides* et *L. verticilliforme*), dont deux appartenant à un nouveau genre.

Une faible diversité génétique intraspécifique de *B. domesticum* a été notée. Puis, l'adaptation de *B. domesticum* au fromage, mais aussi des nouvelles espèces a été observée, avec des conditions de croissances compatibles avec les conditions fromagères (température, a_w , NaCl, croissance sur fromage), des capacités lipolytiques et protéolytiques dont certaines étaient favorisées par une température similaire à celle des caves d'affinage, une production de composés volatils d'intérêt et la mise en évidence de certains gènes qu'il conviendrait d'étudier plus finement (e.g. sidérophore, transporteur du sodium, transporteur de sucres). Enfin, aucune production de mycotoxine connue ou présence de clusters de gènes associés n'a été observée suggérant l'innocuité des espèces.

Title: Genetic and phenotypic study of *Bisifusarium domesticum*

Keywords: mould, cheese, diversity, physiology, functional properties, adaptation

Abstract: *Bisifusarium domesticum* is a cheese associated mold used for its organoleptic properties during Saint-Nectaire and Reblochon production and/or for its "anticollant" property to prevent cheese stickiness. Despite this frequent use during cheese-making and its prevalence on various cheeses, there is a major lack of scientific knowledge about this species. This PhD project aimed at filling this gap. To do so, a *B. domesticum* collection (n=25) was created and an unexpected diversity of *Fusarium sensu lato* isolates was observed which led to the description of four new fungal species (*B. allantoides*, *B. penicilloides*, *Longinectria lagenoides* and *L. verticilliforme*), including two belonging to a new genus. Low intraspecific

genetic diversity among *B. domesticum* isolates was noted. Then, the adaptation of *B. domesticum* as well as the novel species to cheese was studied and growth characteristics compatible with cheese-making conditions (temperature, a_w , NaCl, growth on cheese), lipolytic and proteolytic abilities of some isolates were favored by temperatures similar to those of ripening cellars. Also, volatile compound productions of interest were highlighted as well as several genes (e.g. siderophore, sodium transporter, sugar transported) potentially linked to adaptation to a cheese environment although further in-depth studies are needed. Finally, no known mycotoxins production or mycotoxin gene clusters were identified, reinforcing the safety status of *B. domesticum*.