

UNIVERSITE SAINT-JOSEPH

FACULTE DES SCIENCES

THÈSE DE DOCTORAT

DISCIPLINE : CHIMIE

SPÉCIALITÉ : Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Sujet de la thèse :

**Patuline, mycotoxine de *Penicillium expansum*, principal pathogène
post-récolte des pommes:
Nouvelles données sur sa biosynthèse et développement d'approches
préventives**

Présentée par :

TANNOUS Joanna

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN CHIMIE

Soutenue le 27 Mars 2015

Devant le jury composé de :

| | |
|---------------------|--------------------|
| Pr. Bassam BADRAN | Rapporteur |
| Dr. Lieve HERMAN | Rapporteur |
| Dr. Olivier PUEL | Examineur |
| Dr. André EL KHOURY | Examineur |
| Dr. Ali ATOUI | Examineur |
| Dr. Isabelle OSWALD | Directeur de thèse |
| Pr. Roger LTEIF | Directeur de thèse |

**Unités de Recherche : INRA Toxalim UMR 1331, Equipe biosynthèse et Toxicité des
Mycotoxines, 180 chemin de Tournefeuille, 31300 Toulouse, France.**

**Laboratoire de Mycologie et de Sécurité des Aliments (LMSA), Faculté des Sciences,
Campus des sciences et technologies, Université Saint-Joseph, Mar Roukoz, Liban.**

**Patuline, mycotoxine de *Penicillium expansum*, principal pathogène post-récolte des pommes:
Nouvelles données sur sa biosynthèse et développement d'approches préventives**

Sous la direction de : Dr. Isabelle OSWALD et Pr. Roger LTEIF

La pourriture bleue causée par *Penicillium expansum* est l'une des maladies les plus dommageables des fruits *pomaceae* (pommes et poires). Outre des dégâts directs, cette maladie pose un problème de santé publique car l'agent pathogène produit des mycotoxines nocives pour l'homme et les animaux dont la plus sérieuse est la patuline. La croissance du champignon pathogène et la production de patuline requièrent des conditions physico-chimiques particulières. Les informations existantes à ce propos demeurent cependant modestes et insuffisantes pour envisager de développer des moyens de lutte contre l'apparition du champignon. Par ailleurs, la patuline reste avec l'ochratoxine A, les seules toxines dont la voie de biosynthèse n'a pas encore été complètement établie, tant sur le plan chimique que moléculaire. Cette étude apporte dans un premier temps des données complémentaires sur les facteurs physico-chimiques (température, pH...) qui conditionnent la croissance de *P. expansum* de même que sa capacité à produire la patuline. La connaissance de ces besoins et de ces conditions conduit en pratique à lutter et contrôler la contamination par la patuline tout le long de la chaîne alimentaire. Dans un deuxième temps, cette thèse apporte des améliorations spectaculaires sur le plan fondamental, en termes d'élucidation de la voie de biosynthèse de la patuline. Le cluster des gènes impliqués dans la biosynthèse de cette mycotoxine chez l'espèce la plus préoccupante *P. expansum* a été entièrement identifié et caractérisé. Pour lever encore plus le voile sur la biosynthèse de cette mycotoxine, la caractérisation du facteur de régulation spécifique de cette voie (*patL*) a été également établie. Une perturbation de ce gène a provoqué une incapacité de production de patuline et une sévère diminution de l'expression des gènes *Pat*. De même, grâce à ce mutant déficient, il a été montré que la patuline pourrait agir comme facteur de virulence lors du développement de la moisissure dans les pommes. La caractérisation de la dernière étape de la voie de biosynthèse de la patuline a ensuite été entreprise par mutagenèse dirigée du gène *patE* du cluster de la patuline, chez la même espèce. Ce dernier code pour une Glucose méthanol Choline (GMC) oxydoréductase responsable de la conversion de l'ascladiol en patuline. L'ascladiol est également une molécule clé de la dégradation de la patuline par diverses espèces bactériennes ou de levures et plus particulièrement lors de la fermentation alcoolique. La non-toxicité de l'ascladiol accumulé chez le mutant $\Delta patE$ a été démontrée sur une lignée cellulaire intestinale humaine (Caco-2), suggérant que la patuline perd sa toxicité avec l'ouverture du deuxième cycle. Finalement, un système de détection et de quantification de *P. expansum* par PCR en temps réel a été développé en ciblant un gène hautement spécifique de la voie de biosynthèse de la patuline, *patF*. Cette approche préventive nous a ainsi permis d'avoir une estimation rapide de la contamination en patuline dans les pommes à partir de la quantification d'ADN de *P. expansum*. En conclusion, l'ensemble de ces travaux qui s'inscrivent dans le cadre de la gestion du risque « patuline » dans la filière fruit a permis d'amener des réponses tant sur le plan fondamental que sur le plan appliqué avec le séquençage du cluster, le développement d'un outil de diagnostic et la démonstration que l'ascladiol ne présentait aucune cytotoxicité.

Mots clés

Mycotoxines, patuline, ascladiol, *Penicillium expansum*, voie de biosynthèse, cluster de gènes, *patL*, *patE*, pommes, qPCR.

Discipline

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Intitulé et adresse du laboratoire

Institut National de la Recherche Agronomique - INRA
Unité Toxalim - UMR 1331
Laboratoire Biosynthèse et Toxicologie des Mycotoxines
180, chemin de Tournefeuille - B.P. 93173
31027 Toulouse cedex 9 - France.

Patulin, a mycotoxin of *Penicillium expansum*, the main apples postharvest pathogen: New data on its biosynthesis and development of preventive approaches

Supervised by: Dr. Isabelle OSWALD and Pr. Roger LTEIF

Among diseases affecting apples, blue mold caused by *Penicillium expansum* is a major concern causing yield and quality losses due to the production of mycotoxins, of which patulin is the most alarming one. This mycotoxin was proven to be harmful for humans and animals. The pathogen growth and the patulin production occur under specific physico-chemical conditions (temperature, pH...). However, the description of these conditions in literature remains largely insufficient for the development of strategies to fight the development of the fungus. Furthermore, patulin remains, along with ochratoxin A, the only toxins for which the biosynthetic pathway is not fully established yet at both chemical and molecular levels. Firstly, this study provides supplementary data on the physico-chemical factors that modulate *P. expansum* growth and its ability to produce patulin. The acquaintance of these conditions leads, in practice, to the control of the patulin contamination along the food chain. Secondly, significant improvements were brought on the fundamental level, especially by elucidating the patulin biosynthetic pathway. The cluster of genes involved in the biosynthesis of this mycotoxin was fully identified and characterized in the species of greatest concern *P. expansum*. In order to reveal additional info on the biosynthesis of this mycotoxin, the specific factor of the pathway (*patL*) was characterized. The disruption of this gene has led to failure in patulin production and an important decrease in *Pat* genes expression. Furthermore, pathogenesis studies, using this same deficient strain showed that patulin potentially acts as a virulence factor during *P. expansum* development on apples. The last step of the patulin biosynthetic pathway was later characterized by site-directed mutagenesis of the *patE* gene in the same species. This gene encodes a Glucose Methanol Choline (GMC) oxidoreductase that is responsible for the conversion of ascladiol to patulin. Ascladiol is not only the last intermediate in the patulin pathway but also the main product of patulin degradation during the alcoholic fermentation of apple juice. The non-toxicity of ascladiol accumulated by the $\Delta patE$ strain was proved against the human Caco-2 cell line. Finally a Real time PCR assay was developed to specifically detect and quantify *P. expansum*. This was done by targeting a highly specific gene from the patulin gene cluster in *P. expansum*, *patF*. This predictive approach allowed the quick estimation of the patulin content via the quantification of the *P. expansum* DNA in apples. To conclude, this thesis is part of the patulin's risk management study in the fruit sector; it provides significant improvements on both fundamental and practical levels. These advances are mainly characterized by the sequencing of the patulin gene cluster, the development of a molecular diagnostic tool and the demonstration of the non-cytotoxicity of ascladiol.

Keywords

Mycotoxins, patulin, ascladiol, *Penicillium expansum*, Biosynthetic pathway, gene cluster, *patL*, *patE*, apples, qPCR.

Discipline

Pathology, Toxicology, Genetic and Nutrition

Heading and address of the laboratory

National Institute for Agricultural Research - INRA
Research unit Toxalim - UMR 1331
Laboratory Biosynthesis and toxicity of mycotoxins
180, chemin de Tournefeuille - B.P. 93173
31027 Toulouse cedex 9 - France

Faculty of Sciences - Campus of Science and Technology, USJ
Analysis and Research Center
Riad El Solh - B.P. 11-514
2050 - 1107 Beirut Lebanon.