



**HAL**  
open science

# Transcriptomic study of the yeast *Yarrowia lipolytica* metabolism in a cheese ecosystem

Soulaf Mansour

► **To cite this version:**

Soulaf Mansour. Transcriptomic study of the yeast *Yarrowia lipolytica* metabolism in a cheese ecosystem. Life Sciences [q-bio]. AgroParisTech, 2009. English. NNT : 2009AGPT0035 . pastel-00005341

**HAL Id: pastel-00005341**

**<https://pastel.hal.science/pastel-00005341>**

Submitted on 10 Sep 2009

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

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

## THÈSE

pour obtenir le grade de

**Docteur**

de

**l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement  
(Agro Paris Tech)**

Spécialité : Science des Aliments

*présentée et soutenue publiquement  
par*

MANSOUR Soulaf

le 29 Juin 2009

**ETUDE DE LA LEVURE *YARROWIA LIPOLYTICA* DANS UN  
ECOSYSTEME FROMAGER PAR UNE APPROCHE  
TRANSCRIPTOMIQUE**

Directeur de thèse : Pascal BONNARME

*Travail réalisé à : Agro Paris Tech, INRA, UMR782 Génie et Microbiologie des Procédés  
Alimentaires F-78850 Thiverval-Grignon*

Devant le jury :

**Mme. Sylvie DEQUIN,  
M. Alain SARNIGUET,  
M. Colin TINSLEY,  
M. Jean-Marie BECKERICH,  
Mme. Joëlle RETZ,  
Mme. Françoise IRLINGER,  
M. Pascal BONNARME,**

Directeur de recherches, **INRA, Montpellier**  
Chargé de recherches, **INRA, Le Rheu**  
Professeur, **Agro Paris Tech**  
Directeur de recherche, **INRA, Grignon**  
Responsable biotechnologies, **Bongrain**  
Ingénieur d'étude, **INRA, Grignon**  
Directeur de recherches, **INRA, Grignon**

**Rapporteur  
Rapporteur  
Président  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse**

## Remerciements

Je tiens à remercier par avance ceux dont le nom n'apparaît pas dans cette page et qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre durant ces cinq années passées au laboratoire.

Je remercie Georges Corrieu, Michel Marin et Isabelle Souchon, les directeurs respectifs, pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires de Grignon.

Je tiens à remercier Pascal Bonnarme, mon directeur de Thèse, pour avoir encadré ce projet de recherche. Je tiens à te remercier pour ton aide précieuse, tes conseils, ton « objectivité » et ta manière bien à toi d'interpréter les résultats, ce qui m'a permis d'avancer dans mon travail de recherche. Il m'est aussi d'un agréable devoir de t'adresser un grand merci pour la sympathie, la confiance et la liberté d'action dont j'ai bénéficié tout au long de cette Thèse.

Je remercie profondément Françoise Irlinger pour avoir co-diriger cette Thèse, et pour qui j'exprime toute ma reconnaissance pour son aide, son soutien, sa disponibilité et ses conseils pertinents tout au long de ce projet. Je te remercie également pour tous tes conseils lors de la rédaction de la partie bibliographique de ce manuscrit.

Mes remerciements s'adressent également à Jean-Marie Beckerich, pour ses conseils et sa connaissance du monde fabuleux de la levure. Je vous remercie également pour avoir bien voulu réviser le manuscrit de thèse.

Mes remerciements s'adressent aussi à Sophie Landaud pour m'avoir ouvert les portes du LGMPA un jour de janvier 2005. Je tiens aussi à te remercier pour tes conseils et ta rigueur scientifique, qui ont fait progresser le travail.

Je tiens à remercier Micloth, pour m'avoir formé à la microbiologie, et pour avoir su m'entraîner vers le monde de la recherche.

Je remercie Christophe Monnet, pour sa manière bien à lui de pousser continuellement à la remise en question et la perfection, qui m'a été d'une aide précieuse.

Mes remerciements s'adressent aussi à Eric Spinnler. Je te remercie de la confiance dont tu m'as témoignée en m'offrant la possibilité d'effectuer mon stage de Master 2 au sein du laboratoire. Merci pour ton humanité.

Je tiens à remercier mes rapporteurs de Thèse Madame Sylvie Dequin et Monsieur Alain Sarniguet. Je suis touchée de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. Veuillez accepter mes plus vifs remerciements pour votre présence dans ce jury.

Mes remerciements s'adresse aussi à Madame Joelle Retz, Monsieur Jean-Marie Beckerich et Monsieur Collin Tinsley. Veuillez accepter mes profonds remerciements pour votre présence dans ce jury.

J'exprime toute mon amitié à Agnès, Anne-Sophie, Angélique, Armelle, Cécile, (Mme La Baronne), David, Fernanda S., Fernanda F., Inès, Marie-Pierre (merci d'avoir supporter mes « humeurs »), Monsérathe, Pawinee, Reem, Sophie C., Jérôme, Thomas et Sandra H., pour le soutien que vous m'avez apporté au cours de cette Thèse. Merci aussi à tous mes collègues du laboratoire qui se reconnaîtront ici. Je leur exprime ma profonde sympathie et leur souhaite beaucoup de bien.

Je tiens surtout à remercier Roselyne (ma Rosy), Reine (Khaliké awiwé ou dé2iman oulé Mouqawama ! merci 3a kil chi...), Alain (M. A. Sourabié, 3<sup>ème</sup> du nom je précise !), et Lova (Mme Valette) pour leurs amitiés et leurs soutiens. Merci pour tous les moments passés ensemble.

A Julie, sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est, allant des discussions psychologiques au monde de la biologie moléculaire... Merci d'avoir supporter mes « humeurs » en cette fin d'année de Thèse.

A Carine, ma psychologue personnelle, du collège à l'université, tu as toujours été là pour me soutenir dans mes galères, me remonter le moral, et m'encourager. Je tiens aussi à remercier Roula, ma tante préférée (Habibi khalto !). Merci pour tout.

A Rifah, mon éternelle « Binôme » et amie, de l'USJ aux galères de Jussieu, sous le rythme de la zoologie, l'immuno-physio-pathologie, sans oublier la génétique du développement de « Torso-like » ! Je te remercie d'avoir été là et de me supporter.

A Haythem (katoussi), je te remercie pour ton soutien. Merci d'avoir été là.

A mes sœurs et mon frère qui m'ont soutenu tout au long de cette thèse. Je tiens surtout à remercier ma sœur Goufrane pour avoir mise au monde Lamia, mon rayon de soleil (Fosso ghalé !).

Mes remerciements s'adressent particulièrement à mes parents, à leur soutien et leurs sacrifices. Je ne peux les récompenser de cette longue attente par ces quelques mots de remerciements.

*A mon père, Ali*

*A ma mère, Hana*

*A la résistance...à toutes les résistances*





INTRODUCTION.....	7
<b>I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>11</b>
I. 1. Un écosystème microbien complexe: le fromage .....	11
I. 1. 1. Principes généraux de la technologie fromagère.....	11
I. 1. 2. Les fromages à pâtes molles.....	11
I. 2. La microbiologie de l'affinage.....	12
I. 2. 1. Les levures.....	12
I. 2. 1. 1. <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	13
I. 2. 1. 1. 1. Taxonomie.....	14
I. 2. 1. 1. 2. Caractéristiques physiologiques.....	14
I. 2. 1. 1. 3. Caractéristiques génomiques.....	15
I. 2. 1. 1. 4. Outils génétiques.....	15
I. 2. 1. 1. 5. <i>Y. lipolytica</i> 1E07.....	16
I. 2. 2. La flore bactérienne.....	16
I. 2. 2. 1. Les bactéries lactiques.....	16
I. 2. 2. 1. 1. <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> LD61.....	18
I. 2. 2. 2. Les bactéries de surface.....	18
I. 2. 2. 2. 1. Les bactéries corynéformes.....	19
I. 2. 2. 2. 2. Les Staphylocoques.....	23
I. 3. Voies métaboliques importantes pour l'affinage des fromages.....	24
I. 3. 1. Métabolisme du lactose et du lactate.....	24
I. 3. 2. Protéolyse et transformation des acides aminés.....	25
I. 3. 2. 1. Micro-organismes protéolytiques du fromage .....	25
I. 3. 2. 2. Métabolismes des acides aminés, produits de dégradation des protéines.....	26
I. 3. 2. 3. L'ammonium/ammoniac, produit de dégradation des acides aminés .....	30
I. 3. 3. Lipolyse et transformation des acides gras .....	33
I. 4. Les interactions microbiennes.....	33
I. 4. 1. Définitions.....	33
I. 4. 1. 1. Amensalisme .....	34
I.4.1.1.1. Les bactériocines.....	35
I.4.1.1.2. L'ammoniac.....	36
I.4.1.1.3. L'acide lactique et acide acétique.....	36
I. 4. 1. 2. Compétition.....	36



I.4.1.2.1.	Compétition pour les micronutriments.....	37
I.4.1.2.2.	L'effet Jameson.....	37
I. 4. 1. 3.	Commensalisme .....	38
I. 4. 1. 4.	Parasitisme .....	38
I. 4. 1. 5.	Mutualisme.....	39
I. 5.	Méthodes d'études dynamiques et fonctionnelles d'un écosystème fromager.	40
I. 5. 1.	Etude dynamique des espèces microbiennes.....	40
I. 5. 1. 1.	Approche classique (culture dépendante) .....	40
I. 5. 1. 2.	Approche moléculaire directe (culture indépendante) .....	41
I. 5. 2.	Etude fonctionnelle des espèces microbiennes .....	44
I. 5. 2. 1.	Techniques moléculaires .....	45
I. 5. 2. 2.	RT-PCR quantitative .....	45
I. 5. 2. 2. 1.	Introduction.....	45
I. 5. 2. 2. 2.	Les étapes de la RT-PCR quantitative.....	45
I. 5. 2. 2. 3.	L'amplification et la quantification.....	46
I. 5. 2. 2. 4.	La technologie de détection.....	47
I. 5. 2. 2. 5.	Les stratégies de quantifications.....	48
I.5.2.2.6.	La quantification relative.....	48
I. 5. 2. 2. 7.	La quantification absolue.....	50
I. 5. 2. 3.	Puce à ADN.....	50
I. 5. 2. 3. 1.	Introduction.....	50
I. 5. 2. 3. 2.	Principe des puces à ADN.....	51
I. 5. 2. 3. 3.	Conception des puces à ADN.....	52
I. 5. 2. 3. 4.	Les sondes.....	52
I. 5. 2. 3. 5.	Hybridation des puces à ADN.....	53
I. 5. 3.	Approche protéomique .....	55
II.	RESULTATS ET DISCUSSION.....	57
II. 1.	Mise au point de la méthode transcriptomique d'étude : La PCR quantitative en temps réel .....	57
II. 1. 1	Spécificité des amorces .....	57
II. 1. 2.	Quantification.....	59
I. 1. 2. 1.	Mécanismes et modèles mathématiques de la quantification relative.....	59
II. 1. 3.	Conditions requises .....	60

II. 1. 3. 1.	Sélection et validation du gène de référence.....	60
II. 1. 3. 2.	Efficacité de la PCR des gènes cibles et de celle des gènes de référence.....	63
II. 2.	Etude du catabolisme du lactate et des acides aminés chez la levure d'affinage <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	65
II. 2. 1.	Etudes microbiologiques, biochimiques et transcriptomiques.....	65
II. 2. 1. 1.	Résumé.....	65
II. 2. 1. 2.	Publication n°1 : “Lactate and amino acids catabolism in the cheese-ripening yeast <i>Yarrowia lipolytica</i> ”.....	66
II. 2. 2.	Etude Protéomique de la levure <i>Y. lipolytica</i> 1E07.....	75
II. 2. 2. 1.	Résumé.....	75
II. 2. 2. 2.	Publication n°2: “A joint proteomic and transcriptomic analysis of the amino acids catabolism in the yeast <i>Yarrowia lipolytica</i> ”.....	76
II. 2. 3.	Bilan de l'étude de <i>Yarrowia lipolytica</i> en mono-culture.....	100
II. 3.	Etude transcriptomique de la levure <i>Y. lipolytica</i> 1E07 en association avec deux bactéries : <i>L. lactis</i> LD61 et <i>S. xylosus</i> C2a.....	102
II. 3. 1.	Etude de l'association dans un milieu chimiquement défini (MCD).....	102
II. 3. 1. 1.	Résumé.....	102
II. 3. 1. 2.	Publication n°3: “Study of culture associations of <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i> and <i>Lactococcus lactis</i> : a first step towards microbial interaction analysis”.....	104
II. 3. 2.	Etude de l'association dans une matrice fromagère, le rétentat.....	132
II. 3. 2. 1.	Résumé.....	132
II. 3. 2. 2.	Publication n°4: “Transcriptomic study of culture association in model cheese”.....	133
II. 3. 3.	Bilan de l'étude de <i>Yarrowia lipolytica</i> en co-culture.....	161
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....		163
FICHES TECHNIQUES.....		167
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		195

## Figures

Figure 1 : Protéolyse et catabolisme des acides aminés durant l'affinage du fromage (d'après Yvon et Rijnen, 2001) .....	27
Figure 2 : Principales voies cataboliques des acides aminés (d'après Yvon et Rijnen, 2001).	28
Figure 3 : Schéma de fonctionnement des différents types de transporteurs membranaires, responsables de l'entrée ou de la sortie des acides aminés, des ions ammonium ou de l'ammoniac.....	32
Figure 4 : Diagramme des différentes approches moléculaires permettant d'évaluer la diversité génétique des communautés microbiennes (d'après (Dorigo et coll., 2005).....	42
Figure 5: Principe d'amplification par PCR en temps réel.....	47
Figure 6 : Description des protocoles de marquage direct (à gauche) et indirect (à droite) pour l'incorporation des fluorochromes Cy3 et Cy5. ....	54
Figure 7 : Courbe de dissociation (Melting curve) du produit PCR de l'aminotransférase Bat2 chez <i>Y. lipolytica</i> . ....	58
Figure 8 : Cinétique de l'amplification par PCR quantitative de l'aminotransférase (2X acides aminés-BAT2) et de l'actine (2X acides aminés -Act) chez <i>Y. lipolytica</i> . ....	60
Figure 9 : Choix du gène de référence de <i>S. xylosus</i> C2a. ....	62
Figure 10 : Choix du gène de référence de <i>Lactococcus Lactis</i> LD61. ....	63
Figure 11 : Etalonnage obtenu lors de l'amplification par PCR en temps réel de l'ADN génomique de <i>Y. lipolytica</i> 1E07.....	64

## Tableaux

Tableau 1 : Nom et nature chimique des principaux composés d'arôme issus des acides aminés branchés, aromatiques ou de la méthionine (Yvon et Rijnen, 2001). .....	29
Tableau 2 : Interactions microbiennes inter-espèces, observées dans différents produits laitiers (d'après (Sieuwertz et coll., 2008). .....	34
Tableau 3 : Récentes applications de cultures bactériocinogéniques et de bactériocines contre <i>L. monocytogenes</i> dans les fromages frais ou à pâtes molles (Irlinger et coll. 2009). .....	35
Tableau 4 : Méthodes de culture-indépendante utilisées dans différentes études d'analyse des communautés microbiennes dans les fromages (d'après (Jany et Barbier, 2008). .....	43

## LISTE DES PUBLICATIONS

### Publications dans des revues à comité

S. Mansour, J.M. Beckrich, P. Bonnarne. Lactate and Amino Acid Catabolism in the Cheese-Ripening Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*. 74:6505-6512.

S. Mansour, J. Bailly, J. Delettre, P. Bonnarne. A joint proteomic and transcriptomic analysis of the amino acids catabolism in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Accepté pour publication dans Proteomics*.

S. Mansour, J. Bailly, S. Landaud, C. Monnet, A.S. Sarthou, M. Cocaign, S. Leroy, F. Irlinger and P. Bonnarne. Study of culture associations of *Yarrowia lipolytica*, *Staphylococcus xylosus* and *Lactococcus lactis*: a first step towards microbial interaction analysis. *Soumis à Applied and Environmental Microbiology*.

J. Bailly, S. Mansour, J. Aubert, P. Bonnarne, C. Monnet, S. Landaud and F. Irlinger. Transcriptomic study of culture association in model cheese. *A Soumettre à Applied and Environmental Microbiology*.

### Communications lors de congrès

#### *Communications affichées*

S. Mansour, J.M. Beckrich, P. Bonnarne. Lactate and amino acids catabolism in the cheese ripening yeast *Yarrowia lipolytica*. Cheese Ripening Symposium, Suisse, Berne. Mars 2008.

S. Mansour, J.M. Beckrich, P. Bonnarne. Catabolisme du lactate et des acides aminés chez la levure *Yarrowia lipolytica*. Journées de l'Ecole Doctorale ABIES, Paris, France, Mars 2008. Prix de meilleur poster.

S. Mansour, J. Bailly, S. Landaud, C. Monnet, A.S. Sarthou, M. Cocaign, S. Leroy, F. Irlinger and P. Bonnarne. Transcriptomic study of microbial interactions. American Symposium of Microbiology, Philadelphie, USA. Mai 2009. Financé par l'école doctorale ABIES.

#### *Communication orale*

S. Mansour, J. Bailly, S. Landaud, C. Monnet, A.S. Sarthou, M. Cocaign, S. Leroy, F. Irlinger, P. Bonnarne. Étude de transcriptomique de trois micro-organismes *Yarrowia lipolytica*, *Lactococcus lactis* et *Staphylococcus xylosus* en association. Levures modèles et outils, La colle Sur loup, France. Octobre 2008.

## INTRODUCTION

La France est l'un des seuls pays à avoir une aussi grande variété de fromages ; aujourd'hui plus de 1000 sortes sont dénombrées, dont 42 bénéficiant d'une appellation d'origine contrôlée (A.O.C). La France est réputée comme étant le "pays du fromage", tant au niveau de la production que de la consommation.

Selon le Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (C.N.I.E.L, 2005), en 2004, la France se situe au second rang de la production mondiale de fromages (en volume), après les USA et au premier rang européen (1,80 millions de tonnes de fromages soit 25 % de la production européenne). Pour la production de fromages à pâte molle, la France détient également la première place européenne, avec 473 000 tonnes, soit près de 60 % de la production européenne. Le chiffre d'affaires 2004 de l'industrie fromagère (hors fromages frais) s'élève à plus de 6,35 milliards d'euros dont 2,1 milliards concernent les fromages à pâtes molles.

Les Français sont les premiers amateurs de fromages, avec une consommation annuelle moyenne de 24,5 kg/habitant en 2004 (C.N.I.E.L, 2005). Parmi les fromages au lait de vache, la préférence des français va, en premier, aux fromages frais, puis, par ordre décroissant, aux fromages à pâte molle, aux fromages à pâte pressée cuite, aux fromages à pâte pressée non cuite et aux fromages à pâte persillée. Durant cette même année, les Français ont consommé 179 800 tonnes de fromages à pâte molle.

Toujours en 2004, les exportations de fromages représentent environ 30 % de la production fromagère française (C.N.I.E.L, 2005). Les pays de l'union européenne sont les principaux destinataires de ces exportations (83,8 %). Les fromages à pâte molle, avec 151 239 tonnes, constituent la plus grande part des exportations fromagères françaises.

Pour conserver ce rang, et même l'améliorer, l'industrie fromagère française doit veiller au respect, à la fois de normes d'hygiène de plus en plus strictes et de la qualité organoleptique recherchée par les consommateurs. Pour satisfaire ces conditions, il est indispensable de maîtriser la matière première, mais également le processus de transformation du lait en fromage et notamment l'affinage qui constitue l'une des étapes clés du processus de fabrication. L'affinage résulte principalement de l'action d'une grande variété de micro-organismes tels que les bactéries, levures et moisissures qui participent à la transformation du

caillé en fromage. L'évolution et l'activité de cette flore sont très influencées par les conditions d'affinage ainsi que par les interactions entre les différents micro-organismes.

La flore microbienne est primordiale pour l'établissement des propriétés organoleptiques (ex : arôme, saveur, texture et couleur) mais également sanitaires (ex : effet barrière, activités anti-microbiennes). Pendant 15 ans, avec l'avènement des techniques taxonomiques en biologie moléculaire, les principaux travaux concernant cette flore avaient pour objectif de réaliser un inventaire précis des espèces présentes dans les différentes variétés de fromages. Actuellement, nous avons donc une image plus juste de la biodiversité de cette flore, elle est en grande majorité cultivable et est composée de plus d'une vingtaine d'espèces majeures (levures, bactéries et moisissures). Cependant, il est encore très difficile de comprendre leur fonctionnement collectif, à la seule lumière des connaissances obtenues sur les souches pures. Jusqu'à maintenant, on ne connaît que de façon très imparfaite la nature des interactions écologiques entre les micro-organismes présents et l'importance de ces phénomènes sur des propriétés clés telles que le maintien de la diversité au sein de ces écosystèmes, leur capacité de colonisation du caillé et leur rôle dans le processus d'affinage. La connaissance des phénomènes microbiens demeure pourtant essentielle si l'on souhaite obtenir des qualités organoleptiques et sanitaire optimale, et de les maintenir tout au long des fabrications.

Ainsi, malgré l'utilisation dirigée de ferments commercialisés, l'affinage du fromage est tributaire de la flore naturellement présente, dont le développement surpasse, dans la majorité des cas, la flore inoculée. Cette flore indigène peut provenir des matières premières, de l'environnement et des diverses manipulations au cours du procédé de fabrication. De plus, elle peut être composée à la fois de micro-organismes d'intérêt technologique, d'altération et de pathogènes. La mise en place de procédés de nettoyage et de désinfection au cours du procédé a conduit à une diminution globale de ces flores technologiques naturelles. Ceci s'est traduit par des produits avec des qualités hygiéniques améliorées mais dont la typicité sensorielle est moindre. Or, la typicité des produits traditionnels fermentés est très recherchée par les consommateurs. C'est pourquoi la sélection de ferments à partir de souches indigènes d'intérêt technologique est un enjeu important, afin de conserver la typicité des produits, tout en répondant aux normes sanitaires.

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence le comportement et le rôle possible de la levure *Yarrowia lipolitica* dans le processus d'affinage. En effet, cette levure n'est jamais inoculée mais est retrouvée en fin d'affinage dans de nombreux fromages, en particulier les fromages à pâte molle. Cette observation permet d'émettre l'hypothèse d'une réelle adaptation métabolique de la levure à l'écosystème fromager. Afin de mettre en

évidence ces voies métaboliques clés, une première étude de la levure en mono-culture sera effectuée. Comme l'étude en mono-culture ne peut être représentative de la réalité de l'écosystème fromager, il nous a semblé indispensable d'étudier son comportement en interaction avec d'autres micro-organismes. Pour cela, 2 espèces bactériennes communément retrouvées dans le fromage ont été retenues : *Staphylococcus xylosus* et *Lactococcus lactis*. Cette étude permettra d'étudier le métabolisme de la levure en interaction afin d'estimer et/ou de prédire des voies métaboliques clés.

Le séquençage du génome de *Y. lipolytica* et les outils de biologie moléculaire disponibles au laboratoire tels que la puce à ADN de la levure et la RT-PCR quantitative en temps réel, ont permis d'envisager une approche moléculaire pour l'étude fonctionnelle de la levure. L'utilisation de la puce à ADN a permis un suivi semi-quantitatif de l'expression de l'ensemble des gènes dans une condition particulière de culture, tandis qu'une approche ciblée sur quelques gènes d'intérêts a été réalisée à l'aide de la RT-PCR quantitative. Les résultats transcriptomiques ont été confrontés aux analyses microbiologiques, biochimiques et physico-chimiques. Ceci nous a permis de déterminer les changements métaboliques dus à la présence de différents micro-organismes.

Ce manuscrit est structuré en deux chapitres. Le premier chapitre est consacré à l'état des connaissances et comporte cinq parties. Dans la première partie, la fabrication et l'affinage des fromages à pâte molle et à croûte lavée sont présentés. La microbiologie de l'affinage du fromage est présentée dans la deuxième partie. La troisième partie aborde les principales voies métaboliques impliquées dans ce processus. Dans la quatrième partie sont présentées les différents types d'interactions retrouvées dans un écosystème fromager. Enfin les méthodes mises en place pour l'étude dynamique et fonctionnelle de cet écosystème sont présentées dans la cinquième partie.

Les résultats des principaux travaux expérimentaux effectués au cours de cette thèse sont exposés dans le deuxième chapitre du manuscrit, qui est composé de trois parties. La première partie est consacrée à la mise au point d'un protocole d'étude transcriptomique d'un écosystème par PCR quantitative. L'optimisation du protocole d'étude par PCR quantitative de la levure en présence des deux bactéries a permis le choix de gènes de référence pour chaque micro-organisme. La deuxième partie, composée de deux sous-parties, est consacrée à l'étude transcriptomique et protéomique de *Y. lipolytica* en mono-culture dans un milieu chimiquement défini (MCD) en se focalisant sur le catabolisme de deux catégories de substrats importants lors de l'affinage : le lactate et les acides aminés. La troisième partie est consacrée à l'étude d'une co-culture de la levure *Y. lipolytica* avec deux bactéries



*Staphylococcus xylosus* et *Lactococcus Lactis*. Cette étude s'est déroulée dans le cadre du projet ANR Géoferment dont le but était d'étudier le métabolisme de ces 3 micro-organismes en association grâce notamment à l'étude transcriptomique. Ce projet a été réalisé en collaboration avec différents partenaires détenant les génomes séquencés de *L. lactis* et de *S. xylosus* : i) l'UMR 5504, UMR 792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, CNRS, INRA, INSA, 31400, de Toulouse, d'où l'utilisation de la souche *L. lactis* LD61 et ii) l'INRA, centre de Clermont-Ferrand Theix, unité microbiologique, qualité et sécurité des aliments, F-63122, Saint-Genès Champenelle d'où l'utilisation de la souche *S. xylosus* C2a. Une première approche a consisté à étudier des interactions générées par cette association dans un milieu chimiquement défini, en utilisant une approche ciblée sur des gènes d'intérêts. Cette étude a été réalisée par RT-PCR quantitative en temps réel. Dans un deuxième temps une approche plus globale de cette association, par puce à ADN de la levure, a été réalisée dans un milieu fromager modèle. Ces 3 dernières parties sont présentées sous forme d'articles, rédigés en anglais, acceptés ou soumis pour publication.

Finalement, une conclusion générale permet de récapituler les principaux résultats de ce travail et de les analyser de façon plus globale en terme d'application dans la stratégie de sélection des ferments d'affinage. Le manuscrit se conclut en présentant les principales perspectives envisagées pour la poursuite de cette thématique de recherche.

# I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

## I. 1. Un écosystème microbien complexe: le fromage

### I. 1. 1. Principes généraux de la technologie fromagère

Le fromage correspond à un véritable moyen de conservation alimentaire, obtenue grâce au jeu croisé de l'élimination plus au moins poussée de l'eau du lait et de la récupération des matières sèches. Selon Brûlé et coll (Brûlé et coll., 1997), la transformation du lait en fromage comporte trois étapes principales :

- la coagulation du lait correspond à des modifications physico-chimiques des micelles de caséines sous l'action d'enzymes protéolytiques et (ou) de l'acide lactique, entraînant la formation d'un réseau protéique tridimensionnel appelé coagulum ou gel,
- l'égouttage du caillé assure une déshydratation partielle du gel, obtenu par séparation d'une partie du lactosérum,
- L'affinage se caractérise par des transformations biochimiques des constituants du caillé, essentiellement sous l'action d'enzymes microbiennes.

Dans la plupart des fabrications, entre l'égouttage et l'affinage, se situe l'opération de salage qui représente à la fois un complément d'égouttage et un facteur important de la maîtrise de l'affinage par action sur l'activité de l'eau. Selon les paramètres mis en œuvre au niveau des différentes étapes de transformation du lait en fromage, une grande variété de produits peut être obtenue tel que traduit par Fox et coll (Fox et McSweeney, 2004).

### I. 1. 2. Les fromages à pâtes molles

Les fromages à pâte molle sont définis dans la norme internationale *Codex Alimentarius* (Codex Stan A-6-1978, révisé 1-1999, amendé 2001) comme étant tous les fromages dont la teneur en eau après élimination des matières grasses est supérieurs à 67 %. En France, cette catégorie renferme aussi bien les produits traditionnels qui bénéficient d'un label « Appellation d'Origine contrôlée » (AOC), souvent produits à partir de lait cru, que des produits industriels plus modernes (Ramet, 1997). Selon la conduite de l'affinage, deux types de croûte peuvent se développer permettant de diviser cette famille en deux sous-familles : les pâtes molles à croûte fleurie (ex : Brie, Camembert, Coulommiers) et les pâtes molles à croûte lavée ou croûte morgée (ex : Epoisses, Livarot, Munster).

## I. 2. La microbiologie de l'affinage

### I. 2. 1. Les levures

L'impact des levures sur la production, la qualité et la sécurité des produits alimentaires est intimement lié à leurs activités biologiques. De récentes avancées dans la compréhension de la taxonomie, de l'écologie, de la physiologie, de la biochimie et de la biologie moléculaire des levures ont stimulé l'investigation accrue concernant la compréhension de leur rôle dans les produits alimentaires.

Par leur caractère ubiquitaire, les levures se retrouvent présentes à la fois dans le lait et dans les fromages. Elles appartiennent à la flore banale du lait cru avec des teneurs moyennes de  $10^4$  ufc. mL<sup>-1</sup> (Baroiller et Schmidt, 1990). L'étude de la composition de quelques fromages à pâte molle souligne l'importance et la diversité des espèces présentes dans ces produits. Dans les fromages bleus et le camembert, *Debaryomyces hansenii*, *Candida catenulata*, *C. lipolytica*, *C. kefyr*, *C. intermedia*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus albidus*, *Kluyveromyces lactis* et *K. marxianus* sont fréquemment observées (Roostita et Fleet, 1996). Cependant, une étude plus récente (Viljoen et coll., 2003) portant sur le Camembert et le Brie, a montré que la flore fongique de ces fromages pouvait varier selon les saisons. En effet, 20 espèces appartenant à 10 genres différents ont été isolées pendant l'hiver alors que, pendant l'été, seulement 7 espèces appartenant à 6 genres l'ont été. De même, des études portant sur la diversité de la flore de levure du Camembert ont montré que l'importance relative des diverses espèces était également variable selon l'origine du Camembert. Ainsi *Kluyveromyces marxianus*, *K. lactis*, *S. cerevisiae* et *Zygosaccharomyces rouxii* prédominent dans le camembert de Normandie (Baroiller et Schmidt, 1990), tandis que *Debaryomyces hansenii*, *Y. lipolytica* et quelques espèces du genre *Candida* constituent l'essentiel de la flore levure de camemberts fabriqués en Afrique du Sud (Viljoen et coll., 2003). Des études portant sur la diversité des levures dans le Livarot, ont mis en évidence la dominance de *C. catenulata*, *C. intermedia*, *Geotrichum* spp. et *Y. lipolytica* (Mounier et coll., 2009). Les levures contribuent de manière très importante au processus d'affinage du fromage.

Dans la fabrication d'un fromage, l'action des levures commence dès les premières heures de l'égouttage et se poursuit pendant tout l'affinage (Guéguen, 1995 ; Jacobsen et Poulsen, 1995 ; Leclercq-Perlat et coll., 1999 ; Leclercq-Perlat et coll., 2004). Des souches variées de *D. hansenii*, *Y. lipolytica*, *K. marxianus* et *S. cerevisiae* sont fréquemment

retrouvées en concentrations élevées dans le fromage (Mounier et coll., 2005 ; Mounier et coll., 2006). Elles contribuent au développement des qualités organoleptiques du fromage par leurs contributions aux phénomènes tels que la protéolyse, la lipolyse, la consommation d'acide lactique et la fermentation du lactose (Addis et coll., 2001). Par la consommation du lactate, les levures sont les principaux agents contribuant à la remontée du pH lors des quatre à cinq premiers jours d'affinage. Cette désacidification progressive de la surface des fromages par les levures est un phénomène fondamental. En effet, elle permet l'installation et le développement des bactéries acido-sensibles (Guéguen et Schmidt, 1992 ; Lenoir et coll., 1985). Ainsi, l'implantation précoce de *Brevibacterium aurantiacum* et/ou *linens*, ou de la flore corynéforme est favorisée par la croissance de *G. candidum* (Lecocq et coll., 1996) ou de *D. hansenii* (Eliskases-Lechner et Ginzinger, 1995). D'autre part, la désacidification de la pâte contribue aux modifications de la texture (Vassal et coll., 1986), à l'accroissement des activités enzymatiques (Lenoir et coll., 1985) et à la répartition des minéraux dans le fromage (Le Graët et coll., 1986). En plus de leur activité désacidifiante, les levures sont dotées d'activités enzymatiques variées qui leur permettent de contribuer à l'affinage et au développement de la flaveur.

L'industrie alimentaire étant constamment en recherche de développement de nouveaux produits, les levures présentent de nouvelles pistes d'exploitation. En effet, les levures se développent en coopération avec les bactéries lactiques, et sont souvent à l'origine de la typicité organoleptique des produits. De plus, les levures peuvent être utilisées comme barrière biologique contre les micro-organismes indésirables et comme agents probiotiques (Fleet, 2007). La connaissance des interactions des levures dans leur écosystème est donc un enjeu important. Dans ce qui suit, l'aptitude biochimique et le rôle dans l'affinage de la levure indigène *Y. lipolytica*, la levure ayant fait l'objet de mon travail, seront détaillés.

#### I. 2. 1. 1. *Yarrowia lipolytica*

*Y. lipolytica* est une levure non pathogène qui se développe à l'état naturel dans les sols et les effluents. Elle peut également être isolée à partir de matières riches en lipides et en protéines tels que les yaourts, les fromages et la charcuterie.

#### I. 2. 1. 1. 1. Taxonomie

*Y. lipolytica* est un ascomycète de la famille des *Saccharomycetaceae* (sous famille des *Saccharomycetoideae*). Aucun stade sexué n'ayant été observé, elle fut dans un premier temps, classée dans le genre *Candida* jusqu'à l'identification d'une forme parfaite à la fin des années 60 (Wickerham et coll., 1970). Selon les conditions de croissance, les cellules sont capables de former des asques, contenant de 1 à 4 ascospores haploïdes, à l'extrémité des hyphes. Parmi ces ascospores, deux types cellulaires, dénommés A et B sont différenciés. La fusion entre deux cellules haploïdes de type opposé, aboutit à la formation d'un zygote diploïde se développant sous forme de mycélium et aboutissant à la formation d'ascospores. Cette découverte d'une reproduction sexuée a conduit à renommer la levure *Endomycopsis lipolytica* (Wickerham et coll., 1970), puis *S. lipolytica* (Yarrow, 1972) et finalement *Y. lipolytica* (Van der Walt et Von Arx, 1980). La reproduction de *Y. lipolytica* peut être également asexuée. Dans ce cas, elle consiste en un bourgeonnement bipolaire (Kreger van Rij, 1984).

#### I. 2. 1. 1. 2. Caractéristiques physiologiques

*Y. lipolytica* présente un métabolisme aérobie strict. C'est une levure mésophile qui croît entre 10 et 30 °C et qui est capable de croître jusqu'à 37 °C (Kreger van Rij, 1984). Elle est reconnue comme un organisme GRAS (« Generally Recognized As Safe ») par le FDA (« American Food and Drug Administration »). Ceci permet donc de l'utiliser dans les industries agroalimentaires ou pharmaceutiques. C'est une levure dimorphique qui forme des cellules bourgeonnantes, des hyphes ou des pseudohyphes en fonction du milieu de culture. Elle est capable d'assimiler une grande variété de substrats carbonés tels que les sucres comme le glucose, le galactose, le mannitol (Kreger van Rij, 1984), le lactate et le citrate (Lanciotti et coll., 2005) ainsi que les acides aminés tels que la méthionine (Cernat Bondar et coll., 2005). De plus, elle peut utiliser l'éthanol (à une concentration inférieure à 3%) comme seule source de carbone (Barth et Gaillardin, 1997) ainsi que le glycérol (Papanikolaou et Aggelis, 2003). Cette levure ne peut consommer ni le lactose ni le galactose, contrairement à la levure *D. hansenii* (van den Tempel et Jakobsen, 2000).

L'activité lipolytique de *Y. lipolytica* est très forte. Kohlwein et Paltau (Kohlwein et Paltauf, 1984), ont mis en évidence au moins deux systèmes de dégradation des acides gras, l'un spécifique des acides gras C12 ou C14 et l'autre spécifique des C16 ou C18, saturés ou insaturés. Les acides octanoïque et décanoïque ne sont pas consommés par *Y. lipolytica*.

La plupart des souches de *Y. lipolytica*, croissent dans un milieu contenant l'acétate comme seule source de carbone. Une concentration en acétate pouvant aller jusqu'à 0,4 % est bien tolérée. Une concentration supérieure ralentit la croissance, tandis que 1% d'acétate de sodium inhibe totalement la croissance (Barth et Gaillardin, 1997)

Une étude basée sur le rôle de quatre souches de *Y. lipolytica*, lorsqu'elles sont ensemencées comme ferments avec les bactéries (Lanciotti et coll., 2005), a montré un rôle complexe et significatif dans les propriétés organoleptiques des fromages. Son évolution est fonction du type de produit, de la composition de la flore, du procédé de fabrication et des conditions d'affinage.

#### I. 2. 1. 1. 3. Caractéristiques génomiques

La séquence du génome entier de la souche E150 de *Y. lipolytica* a été déterminée par le consortium Génolevures (Casaregola et coll., 2000 ; Dujon et coll., 2004). Cette souche provient du croisement entre la souche sauvage CBS6124-2 isolée de maïs d'origine américaine, et la souche W29 provenant des égouts de Paris. Cette levure présente un génome de 20,5 Mb composé de six chromosomes. Elle diverge considérablement des autres levures ascomycètes par (i) son contenu en G+C (environ 50%), (ii) de sa densité de gènes (un pour 3,3 kb pour *Y. lipolytica* contre un pour 2 kb pour *S. cerevisiae*), (iii) sa haute fréquence en intron (13 % des gènes ont au moins un intron), (iv) la répartition de son ADNr dans 7 loci situés dans les régions subtélomériques du génome (un seul locus chez *S. cerevisiae*), (v) le faible niveau de similarité de ses gènes avec les autres levures, (vi) son contenu en éléments transposables (Neueglise et coll., 2005 ; Neueglise et coll., 2002). Ces différences font que *Y. lipolytica* est considérée comme une levure ascomycète atypique à la frontière entre les levures hémiascomycètes et les champignons filamenteux ascomycètes.

#### I. 2. 1. 1. 4. Outils génétiques

*Y. lipolytica* a fait l'objet de développements d'outils génétiques adaptés et performants. Ainsi, un système de transformation (Gaillardin et coll., 1985), un système de disruption (Fickers et coll., 2003), des vecteurs de type répliatif (Fournier et coll., 1991) et intégratif (Gaillardin et Ribet, 1987), un système d'amplification de gènes (Le Dall et coll., 1994) et la caractérisation de promoteurs fortement régulés ou constitutifs (Blanchin-Roland et coll., 1994) facilitent l'élaboration de stratégies d'ingénierie génétique. De plus, la connaissance du

génomique de cette levure non conventionnelle a permis la construction d'une puce à ADN complète, permettant une étude transcriptomique.

#### I. 2. 1. 1. 5. *Y. lipolytica* 1E07

L'objectif de ce travail étant l'étude de la levure dans un écosystème fromager, la souche de *Y. lipolytica* 1E07 provenant du Livarot a été sélectionnée (Bonaïti et coll., 2005). Cette souche de *Y. lipolytica* est constamment retrouvée dans le fromage à pâte molle en fin d'affinage (Irlinger 2009, communication personnelle). La forte similarité phylogénétique entre les différentes souches de *Y. lipolytica* a permis d'envisager l'utilisation de la puce à ADN complète provenant de la souche séquencée de *Y. lipolytica* E150.

### I. 2. 2. La flore bactérienne

La flore bactérienne utile des fromages à pâte molle comprend deux grands groupes : les bactéries lactiques et les bactéries de surface (Choisy et coll., 1997b).

#### I. 2. 2. 1. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques utilisées dans l'industrie fromagère ont en commun une aptitude à produire de grandes quantités d'acide lactique à partir du lactose. Ce sont des bactéries Gram-positif, immobiles, ne formant pas de spores, ne produisant pas de catalase et ne réduisant pas les nitrates. Elles sont anaérobies facultatives ou microaérophiles et, de ce fait, ne tolèrent que de très faibles concentrations d'oxygène (Cantéri, 1997). La morphologie des cellules varie selon l'espèce : coques, coccobacilles ou bâtonnets.

Lors de la fabrication des fromages, leur croissance et leur action acidifiante commencent dès leur ensemencement dans le lait. En général, leur concentration reste constante durant l'affinage dans le hâloir (Hassouna et Guizani, 1995 ; Lortal et Chapot-Chartier, 2005).

Il existe deux types de ferments lactiques : les ferments mésophiles, composés de bactéries dont la température optimale de croissance est proche de 30 °C et les ferments thermophiles, pour lesquels la température optimale se situe entre 37 et 43 °C.

Le genre *Lactococcus* comprend les espèces *garvieae*, *lactis*, *piscium*, *plantarum* et *raffinolactis*. Les espèces de ce genre ont une morphologie en forme de coques souvent assemblées en chaînettes de longueur variable. Elles ont un métabolisme homofermentaire et

produisent exclusivement de l'acide lactique L(+) à partir du lactose. Elles se caractérisent par une température optimale de croissance voisine de 30 °C, par leur thermosensibilité et leur inaptitude à croître à de fortes concentrations en sel (6,5 % de NaCl) et dans des milieux basiques (pH au-delà de 9,6) (Dellaglio, 1994). L'espèce *lactis* est subdivisée en trois sous-espèces nommées *cremoris*, *hordniae* et *lactis* (Holzapfel et coll., 2001 ; Stiles et Holzapfel, 1997).

Les *Leuconostoc* sont les seules bactéries en forme de coque à avoir un métabolisme hétérofermentaire ; à partir des hexoses elles produisent du dioxyde de carbone, de l'éthanol (ou de l'acide acétique) et de l'acide lactique D(-). Les cellules des *Leuconostoc* sont de forme lenticulaire ou sphérique, disposées par paires ou en chaînettes. Leur température optimale de croissance est comprise entre 25 et 30 °C (Dellaglio, 1994). La sous-espèce *Ln. mesenteroides* ssp *mesenteroides* n'acidifie le lait que très lentement ; c'est pourquoi elle est toujours associée à des lactocoques acidifiants (Choisy et coll., 1997b).

La fonction principale des bactéries lactiques est de transformer le lactose en acide lactique. Cette activité acidifiante favorise l'égouttage du caillé et règle son degré de minéralisation ainsi que son pH (Cantéri, 1997). La flore lactique des fromages permet aussi de créer des conditions de milieu inhibant le développement de nombreux micro-organismes indésirables. Outre ces fonctions, les bactéries lactiques contribuent à l'affinage par leur activité protéolytique. Selon Law et Haandrikman (1997), de nombreuses enzymes protéolytiques sont intracellulaires, d'où l'importance de la lyse de ces bactéries lors de l'affinage des fromages (Dako et coll., 1995 ; Lortal et Chapot-Chartier, 2005). En dépit de la présence d'enzymes lipolytiques membranaires capables d'hydrolyser des acides gras libres, des tri, di et mono-acylglycérides (El Soda, 1993), les bactéries lactiques (en particulier les lactocoques) sont généralement considérées comme faiblement lipolytiques par comparaison avec d'autres espèces bactériennes telles que *Pseudomonas*, *Acinetobacter* ou *Flavobacterium* (Brennan et coll., 2002). Cependant, leur présence dans les fromages, à des concentrations élevées, et pendant des périodes plus au moins importantes, peut les amener à libérer des quantités non négligeables d'acides gras libres (Das et coll., 2005). De plus, les bactéries lactiques produisent de petites quantités de molécules aromatiques (acétaldéhyde, acide acétique, éthanol, diacétyl), principalement à partir du lactose et/ou du citrate (Olson, 1990 ; Urbach, 1995).



#### I. 2. 2. 1. 1. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* LD61

La souche *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* LD61 a été sélectionnée pour ce travail. Cette souche est utilisée dans l'industrie laitière pour la fabrication de fromages. Cette souche contient des plasmides portant les gènes d'utilisation du lactose, et des gènes codant pour des protéases. Comme tout les biovar *diacetylactis*, elle contient également les gènes nécessaires à la production de diacétyle.

#### I. 2. 2. 2. Les bactéries de surface

La flore bactérienne technologique non lactique est retrouvée à la surface de différents types de fromages, comme les pâtes molles (Camembert, Munster), les pâtes persillées (Roquefort) ou les pâtes pressées cuites (Comté, Gruyère). Leur importance relative dépend du type de fromage. Les bactéries d'affinage appartiennent en grande partie, aux groupes des staphylocoques et des bactéries corynéformes (Goerges et coll., 2008 ; Maoz et coll., 2003 ; Mounier et coll., 2005). Les staphylocoques et les bactéries corynéformes possèdent en commun certains caractères physiologiques qui expliquent leur aptitude à s'implanter à la surface des fromages : elles sont le plus souvent aérobies, mésophiles, halotolérantes et acidosensibles, ne pouvant de ce fait se développer que dans une zone de pH proche de la neutralité (6 à 8,5).

Depuis ces 5 dernières années, grâce à l'utilisation des techniques de biologie moléculaire ne nécessitant pas l'isolement préalable sur milieux spécifiques, émergent deux groupes bactériens non négligeables : le groupe des bactéries à Gram-négatif et celui des bactéries d'origines marines. Au cours de l'affinage, la flore bactérienne à Gram-négatif est capable de se développer à la surface de fromages à pâte molle (Feurer et coll., 2004a ; Feurer et coll., 2004b ; Mounier et coll., 2005 ; Rea et coll., 2007). En effet, des bactéries Gram-négatif de la classe des *Gamma-Proteobacteria* : *Pseudoalteromonas* sp., *Hafnia* sp., *Vibrio* sp, et *Halomonas* sp., ont été mises en évidence sur le Livarot et d'autres fromages à croûte lavées (Maoz et coll., 2003 ; Mounier et coll., 2009). Les espèces *Vibrio* sp, et *Halomonas* sp. sont des bactéries d'origine marine. De plus, la bactérie Gram-positif *Marinilactibacillus psychrotolerans* originaire de l'environnement marin a été isolée à la surface de plusieurs fromages à pâte molle (Feurer et coll., 2004a ; Maoz et coll., 2003 ; Mounier et coll., 2005). Récemment un intérêt particulier a été porté aux propriétés aromatiques des Gram-négatif comme *Proteus vulgaris* et *Psychobacter* sp. isolés du fromage (Deetae et coll., 2007).

#### I. 2. 2. 1. Les bactéries corynéformes

Le terme de bactérie corynéforme a regroupé pendant longtemps les bactéries dont la morphologie était décrite « en forme de massue » (étymologie grecque de corynébactérie) et capables d'effectuer un cycle de transformation de bâtonnet en coque. Ce groupe renfermait un ensemble de bactéries hétérogènes sur le plan taxonomique. Ce sont des bactéries à Gram-positif, catalase positive, non mobiles, le plus souvent aérobies. Les bactéries corynéformes sont reliées à la branche *Actinobacteria* (G+C % supérieure à 50%). La taxonomie de ce groupe a beaucoup évolué depuis ces 15 dernières années et les travaux de Stackebrandt et coll. (Stackebrandt et coll., 1997) ont conduit à une nouvelle classification scindant en deux sous ordres le groupe des bactéries corynéformes : *Micrococccineae* et *Corynebacterineae*, composés respectivement de 9 et 6 familles. Plusieurs études ont montré que les bactéries de surface présentent une diversité de genres et constituent une part importante, voir dominante, de la flore microbienne de divers types de fromages, comme le Munster (Valance, 1996), le Tilsit (Bockelman et coll., 1997), le Gubbeen (Brennan et coll., 2002 ; Mounier et coll., 2007). Ces bactéries se trouvent en association avec des levures telles que *D. hansenii* et *G. candidum*. La désacidification du milieu dû à la consommation du lactate par *D. hansenii* et la production d'ammoniac favorise l'implantation des *Corynebacterium*. Ces bactéries ont un rôle prédominant dans l'affinage des fromages. En effet, les bactéries corynéformes sont connues pour être capable de produire des composés soufrés qui renforcent les caractères "fromager" et "affiné" d'un fromage (Arfi et coll., 2003 ; Arfi et coll., 2005 ; Rattray et Fox, 1999). Cette flore appartiendrait aux genres *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Corynebacterium* ou encore *Brachybacterium*. Récemment de nouvelles souches de *Corynebacterium* ont été identifiées à la surface du fromage telles que *Arthrobacter arilaitensis*, *Arthrobacter bergerei*, *Corynebacterium casei*, *Corynebacterium mooreparkense*, *Microbacterium gubbeenense* et *Brevibacterium aurantiacum* (Mounier et coll., 2007). Pendant une vingtaine d'années, de nombreuses études se sont focalisées sur l'espèce *B. linens* (Famelart et coll., 1987 ; Famelart et coll., 1987 ; Masoud et Jakobsen, 2005) considérée comme « le ferment du rouge » par les professionnels, et la bactérie de surface majoritaire des fromages à pâtes molles. Désormais, il a été montré que, très souvent, la croissance de micro-organismes indigènes est plus importante que celle de *B. linens* au cours d'un cycle d'affinage (Irlinger et Mounier, 2009).

#### I. 2. 2. 2. 1. 1. *Arthrobacter*

Ce genre est principalement retrouvé à la surface des fromages à croûte lavée (Corsetti et coll., 2001 ; Feurer et coll., 2004b ; Valdes-Stauber et coll., 1997). *Arthrobacter citreus* et *A. globiformis* ont été isolés de Tilsit (Eliskases-Lechner et Ginzinger, 1995). Deux nouvelles espèces, appartenant au genre et isolées de la surface de fromage à croûte lavée, ont été récemment décrites : *A. arilaitensis* et *A. bergerei* (Irlinger et coll., 2005). On peut raisonnablement penser que les souches assignées à l'espèce *A. nicotianae* avant 2005 et isolées de la surface du Brie, du Camembert et du Limburger (Goerges et coll., 2008 ; Marcellino et Benson, 1992 ) sont assignées à l'espèce *A. arilaitensis*. L'espèce *A. arilaitensis* était, jusqu'à présent, confondue avec *A. nicotianae* du fait de l'homologie de leur séquence 16S (98 %) (Goerges et coll., 2008). De récents travaux ont mis en évidence la forte capacité de *A. arilaitensis* à s'implanter à la surface du fromage en comparaison avec *B. linens* et *B. aurantiacum* (Mounier et coll., 2008). Goerges et coll., (2008) ont montré par PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) que la souche commerciale de *A. arilaitensis* utilisée comme ferment dans un fromage à pâte molle et à croûte lavée, ne s'implantait pas dans le fromage contrairement à la souche « sauvage » de la même espèce. Ceci traduit la nécessité d'approfondir nos connaissances de la flore indigène fromagère.

#### I. 2. 2. 2. 1. 2. *Brevibacterium*

Le genre *Brevibacterium* est l'unique genre de la famille des *Brevibacteriaceae*. Plus de 25 espèces différentes ont été décrites au sein du genre *Brevibacterium* mais seules *B. avium*, *B. casei*, *B. epidermidis*, *B. iodium*, *B. linens*, *B. luteolum*, *B. paucivorans* et *B. otitidis* semblent effectivement appartenir à ce genre. *B. linens* est l'espèce type du genre *Brevibacterium* (Rattray et Fox, 1999). Cependant, une étude de l'homologie ADN-ADN a révélé la présence d'une hétérogénéité au sein de cette espèce (Fiedler et coll., 1981). A partir de cette espèce, quatre espèces différentes ont ainsi pu être nouvellement décrites. *B. aurantiacum* est la plus représentée en surface des fromages (Gavrish et coll., 2004 ; Rea et coll., 2007). La souche type décrivant cette nouvelle espèce est ATCC 9175, anciennement souche de référence de l'espèce *B. linens*. La souche type actuelle de *B. linens* est ATCC 9172. L'espèce *B. aurantiacum* est caractérisée par une relative haute tolérance au sel (15%) et est donc capable de supporter les conditions de pression propres à la surface des fromages à croûte lavée. Cette bactérie, a déjà été isolée du Gubbeen (Rea et coll., 2007). Nommée aussi

« ferment du rouge », elle est appelée ainsi du fait de sa capacité à produire un pigment caroténoïde rouge-orangé.

L'espèce *B. linens* est la bactérie la plus communément utilisée dans les ferments d'affinage. Or, de récents travaux ont montré son manque de compétitivité dans de nombreux fromages (Goerges et coll., 2008 ; Rea et coll., 2007). En effet, la croissance de *B. linens* serait ralentie voir arrêtée en présence de la microflore indigène (Mounier et coll., 2006). Cette observation montre l'importance de prendre en compte la capacité d'adaptation et de compétition des souches inoculées et présentes à la surface des fromages.

#### I. 2. 2. 2. 1. 3. *Corynebacterium*

Ce genre fait partie de la microflore dominante de la surface de nombreux fromages. Environ cinq espèces sont isolées de la surface des fromages à croûte lavée : *Corynebacterium variable*, *C. casei*, *C. flavescens*, *C. ammoniagenes* et *C. variabile* représentent 32% des bactéries corynéformes isolées à partir du Brick (Valdes-Stauber et coll., 1997). L'espèce *C. variabile* a été isolée du Domiati, un fromage égyptien traditionnel (El-Baradei et coll., 2007). D'après Gelsomino et coll.(2005), *C. variabile* est un synonyme de *C. mooreparkense* qui peut représenté jusqu'à 26 % des isolats dans un fromage à pâte molle et à croûte lavée (Brennan et coll., 2001a). Les 2 espèces *C. casei* et *C. variabile* sont dominantes dans plusieurs fromages à pâte molle. En effet, elles sont retrouvées dans 3 fromages irlandais, l'Ardrahan, le Durrus et le Milleens mais également dans un fromage français à pâte molle et à croûte lavée (Feurer et coll., 2004a ; Maoz et coll., 2003 ; Mounier et coll., 2005).

#### I. 2. 2. 2. 1. 4. *Microbacterium*

Les espèces appartenant au genre *Microbacterium* sont retrouvées de façon sporadique et en petit nombre à la surface des fromages à croûte lavée (Eliskases-Lechner et Ginzing, 1995 ; Valdes-Stauber et coll., 1997). Dans le Gubbeen, 12% des bactéries corynéformes ont été identifiées comme appartenant à *Microbacterium gubbeenense*, une nouvelle espèce décrite par Brennan et coll. (Brennan et coll., 2001b ; Brennan et coll., 2002). Plus tard, les travaux de Mounier et coll (Mounier et coll., 2005) ont pu aussi mettre en évidence la présence de cette espèce dans le Gubbeen. Cette espèce a aussi été retrouvée dans le Domiati (El-Baradei et coll., 2007) et dans un fromage artisanal à pâte molle et à croûte lavée (Feurer

et coll., 2004a). Elle possède une faible activité protéolytique mais semble être capable de produire du méthaneéthiol à partir de la méthionine (Brennan et coll., 2002).

#### I. 2. 2. 2. 1. 5. *Micrococcus*

Ce genre appartient à la famille des *Micrococcineae* et est très proche phylogénétiquement du genre *Arthrobacter* (Stackebrandt et coll., 1997). Il possède cependant des caractères morphologiques identiques aux staphylocoques. Contrairement à ce que l'on a longtemps cru et écrit, ce genre est beaucoup plus rarement rencontré que le genre *Staphylococcus* à la surface des fromages. En effet, les isolats retrouvés représenteraient moins de 20% des coques à Gram-positif (Massa et Turtura, 1989). Les microcoques semblent montrer une forte activité estérasique et n'ont pas un rôle important dans la protéolyse des fromages (Ortiz de Apocada et coll., 1993). L'espèce *M. luteus* a été isolée dans l'Ardrahan (Mounier et coll., 2005).

#### I. 2. 2. 2. 1. 6. *Brachybacterium*

Ce sont des bactéries Gram-positives, non mobiles et essentiellement aérobies. Ce genre a été établi à partir d'une espèce, *Brachybacterium faecium* qui, très longtemps classée dans le genre *Brevibacterium*, avait comme particularité des profils de paroi différents, en terme de lipides et de ménaquinones (Collins et coll., 1988, (Schubert et coll., 1996). Les travaux de Irlinger (Irlinger, 2000) et Lefresne (Lefresne, 2000) ont montré que ce genre est fortement représenté dans les fromages à pâtes pressés cuites et spécifiquement les espèces *B. alimentarium* et *B. tyrofermentans* qui, avec *B. nesterenkovii*, font partie de trois espèces décrites et isolées des produits laitiers (Duthoit et coll., 2003 ; Gvozdiak et coll., 1992 ; Schubert et coll., 1996). Peu d'études mettent en évidence la présence d'isolats du genre *Brachybacterium* à la surface des fromages. Schubert et coll., (Schubert et coll., 1996) ont montré par une approche moléculaire que des isolats de la surface de Gruyère, Beaufort ou Camembert les plus halotolérants et pigmentés en jaune, étaient assignés aux genres *B. alimentarium* et *B. tyrofermentans*. Feurer et coll (2004a) ont mis en évidence la présence de *B. tyrofermentans* dans un fromage à pâte molle. Les travaux de Duthoit et coll (Duthoit et coll., 2005), ont permis d'isoler *B. nesterenkovii* dans des fromages AOC.

## I. 2. 2. 2. Les Staphylocoques

Le nom de « *Staphylococcus* » vient du mot *staphyle* qui signifie grappe de raisin et du mot latin *coccus* qui signifie grain. Pendant longtemps, les staphylocoques ont été associés, d'un point de vue taxonomique, aux microcoques. A partir de 1997, la nouvelle classification hiérarchique de la classe des *Actinobacteria* proposée par Stackebrandt et coll. (Stackebrandt et coll., 1997) redéfinit la famille des *Micrococcaceae* dont le genre *Staphylococcus* ne fait plus partie. Ce genre fait désormais partie de la branche des *Firmicutes* (% GC compris entre 30 et 39 %), et la sous-branche *Clostridium-Bacillus* qui comprend toutes les espèces à Gram-positif dont l'ADN présente un G+C % inférieur à 55. Certaines espèces, appartenant au genre *Staphylococcus*, et productrices de coagulase et/ou d'entérotoxines sont potentiellement pathogènes. *Staphylococcus aureus* fait partie des 6 espèces à coagulase positive. Les espèces à coagulase négative ne sont pas pathogènes ou alors uniquement de façon opportuniste, et ce sont des bactéries que l'on retrouve le plus fréquemment dans les écosystèmes fromagers (Irlinger, 2008). *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus vitulinus* et *Staphylococcus xylosus* sont les espèces les plus fréquemment retrouvées dans les fromages à croûte lavée (Hoppe-Seyler et coll., 2004 ; Irlinger et Morvan, 1997). Ces staphylocoques à coagulase négative sont principalement rencontrés en début d'affinage et en très petit nombre en comparaison avec les bactéries corynéformes (Brennan et coll., 2002). Dans le Stilton, l'espèce *Staphylococcus* a été identifiée et plus particulièrement *S. equorum* (Ercolini et coll., 2003). Dans le Tilsit, l'ensemble des souches de staphylocoques isolées représente entre 5 et 15% de la microflore présente (Bockelmann et Hoppe-Seyler, 2001) et seulement 2,5% dans le Gubbeen (Brennan et coll., 2002). Les travaux menés par Mounier et coll. (Mounier et coll., 2005) dans 4 fromages à pâtes molles, ont permis d'isoler différentes espèces de staphylocoques. L'espèce *S. epidermidis* a été uniquement isolée dans le Durrus, *S. equorum* dans l'Ardrahan et le Millon, tandis que *S. saprophyticus* a été isolée du Gubbeen. Les souches de staphylocoques d'origine fromagère sont halo-tolérantes (Mounier et coll., 2007). L'espèce *S. equorum* possède des propriétés lipolytiques et protéolytiques qui participent à la formation de la morge (Curtin et coll., 2002). L'espèce *S. sciuri* a montré agir comme stimulateur de croissance de *A. nictotianae* (Bockelmann et Hoppe-Seyler, 2001).

#### I. 2. 2. 2. 1. *Staphylococcus xylosus* et la souche C2a

L'espèce *S. xylosus* présente un intérêt majeur pour plusieurs raisons. Cette espèce est utilisée comme ferment pour la fabrication des produits carnés (saucisson) et laitiers (fromage). Elle joue donc un rôle important dans le processus de fermentation en participant aux caractéristiques sensorielles de plusieurs produits fermentés.

La souche C2a assignée à l'espèce *S. xylosus* est une bactérie commensale de la peau (Nagase et coll., 2002). Elle contient le plasmide pSX267 provenant de la souche type DSM20267 (Götz et coll., 1983) et est transformable. Elle est capable de se développer dans des produits carnés (saucisson) ainsi que sur matrice fromagère (le rétentat). C'est pourquoi cette souche a été retenue pour le séquençage du génome de l'espèce *S. xylosus* par l'équipe de l'INRA de Clermont-Ferrand Theix.

Comme nous avons pu le voir, l'écosystème fromager est complexe et constitué le plus souvent de nombreuses populations différentes qui se succèdent et/ ou évoluent ensemble en interagissant fortement entre elles. Maîtriser cette flore passe donc par la compréhension des mécanismes d'adaptation des micro-organismes et types d'interactions qui régissent le procédé d'affinage. On pourra ensuite développer des ferments mieux adaptés et plus compétiteurs par rapport à la flore endogène.

### **I. 3. Voies métaboliques importantes pour l'affinage des fromages**

L'évolution des principaux paramètres physico-chimiques relatifs à l'affinage des fromages à pâte molle a fait l'objet de nombreuses études (Choisy et coll., 1997a ; Fox et McSweeney, 2004 ; Hassouna et Guizani, 1995 ; Leclercq-Perlat et coll., 2004 ; Lenoir et coll., 1985 ; Vassal et coll., 1986). Les évolutions observées diffèrent entre la surface et l'intérieur du fromage. Plusieurs types de réactions concernent, simultanément ou successivement, les principaux constituants du caillé, c'est à dire le lactose, lactate, les protéines et la matière grasse, ainsi que leurs produits de dégradation.

#### I. 3. 1. Métabolisme du lactose et du lactate

La quantité de lactose restant dans le fromage au début de l'affinage dépend des modalités de la coagulation et de l'égouttage. Ceci est notamment dû à l'activité des levains lactiques, au lavage ou non des grains de caillé, au degré d'égouttage et aux conditions de salage (Choisy et coll., 1997a). Le lactose est donc métabolisé, très tôt lors des fabrications

fromagères, en D- et L-lactate principalement par les bactéries lactiques (Mc Sweeney, 2004). Comme le décrivent Leclercq-Perlat et coll. (2004) dans le cas du camembert, en surface, le lactose est consommé rapidement, durant les 8 premiers jours, avec une vitesse de l'ordre de  $0,8 \pm 0,2$  mmol/kg de fromage sec par jour. Au cœur, la concentration en lactose est un peu plus importante et il est métabolisé plus lentement. Ce composé ne disparaît entièrement que vers le 15<sup>ème</sup> jour d'affinage. Cette disparition peut être attribuée à l'action des bactéries lactiques, mais aussi à celle des levures capables de consommer le lactose à la surface des fromages (Soulignac, 1995).

L'acide lactique, présent essentiellement sous forme de lactate, est lui-même métabolisé selon plusieurs voies (Mc Sweeney, 2004). Dans le Munster, il est principalement métabolisé par les levures pour donner de l'eau et du dioxyde de carbone. Dans le Camembert, la concentration en lactate augmente rapidement durant les 6 premiers jours d'affinage au cœur et à la surface du fromage dû à l'activité des bactéries lactiques qui dégradent le lactose et le transforme en lactate. Selon Leclercq-Perlat (Leclercq-Perlat et coll., 2004), cette concentration augmente avec une vitesse moyenne de l'ordre de  $16 \pm 0,3$  mmol/kg.jour. Après le 6<sup>ème</sup> jour, la concentration en lactate à la surface décroît avec une vitesse moyenne de l'ordre de  $12,5 \pm 0,5$  mmol/kg.jour jusqu'au 25 ou 27<sup>ème</sup> jour, puis avec une vitesse moyenne de l'ordre de  $3,7 \pm 0,05$  mmol/kg.jour pour devenir négligeable à partir du 35<sup>ème</sup> jour. L'évolution de la consommation du lactate au cœur suit la même évolution que celle de la surface, le lactate n'étant totalement consommé qu'au bout du 40<sup>ème</sup> jour.

### I. 3. 2. Protéolyse et transformation des acides aminés

#### I. 3. 2. 1. Micro-organismes protéolytiques du fromage

La protéolyse consiste en l'hydrolyse de la caséine à l'aide de coagulant (ex : chymosine, pepsine, protéinase végétale), de plasmine et de présure. L'évolution du degré de protéolyse, au cours de l'affinage, est différente entre la surface et le cœur des fromages à pâte molle. Ceci est essentiellement dû à deux raisons (Noomen, 1983) :

- les enzymes microbiennes (principal agent de la protéolyse) ne diffusent que modérément dans la matrice fromagère,
- la croissance des micro-organismes les plus protéolytiques (*G. candidum* et *P. camemberti*) est beaucoup plus importante à la surface qu'au cœur du fromage.

L'action déterminante des *Penicillium* est bien mise en évidence dans le camembert où l'activité protéolytique mesurée à la surface est beaucoup plus importante que celle mesurée à



cœur (Lenoir et coll., 1985). Outre l'action de *Penicillium* et de *Geotrichum*, cette dégradation peut être également réalisée par la flore bactérienne de surface, par exemple les bactéries corynéformes et les microcoques (Dako et coll., 1995 ; Farkye et coll., 1995).

Des études ont également mis en évidence la capacité de *Y. lipolytica* à hydrolyser les  $\alpha_{s1}$  et  $\beta$  caséines *in vitro* et à induire l'hydrolyse des protéines dans le lait écrémé (Lucia et coll., 2001). L'importante activité tyrosinase de certaines souches de *Y. lipolytica* serait responsable de la production de pigments bruns à la surface des fromages (Carreira et coll., 2001 ; van den Tempel et Jakobsen, 2000).

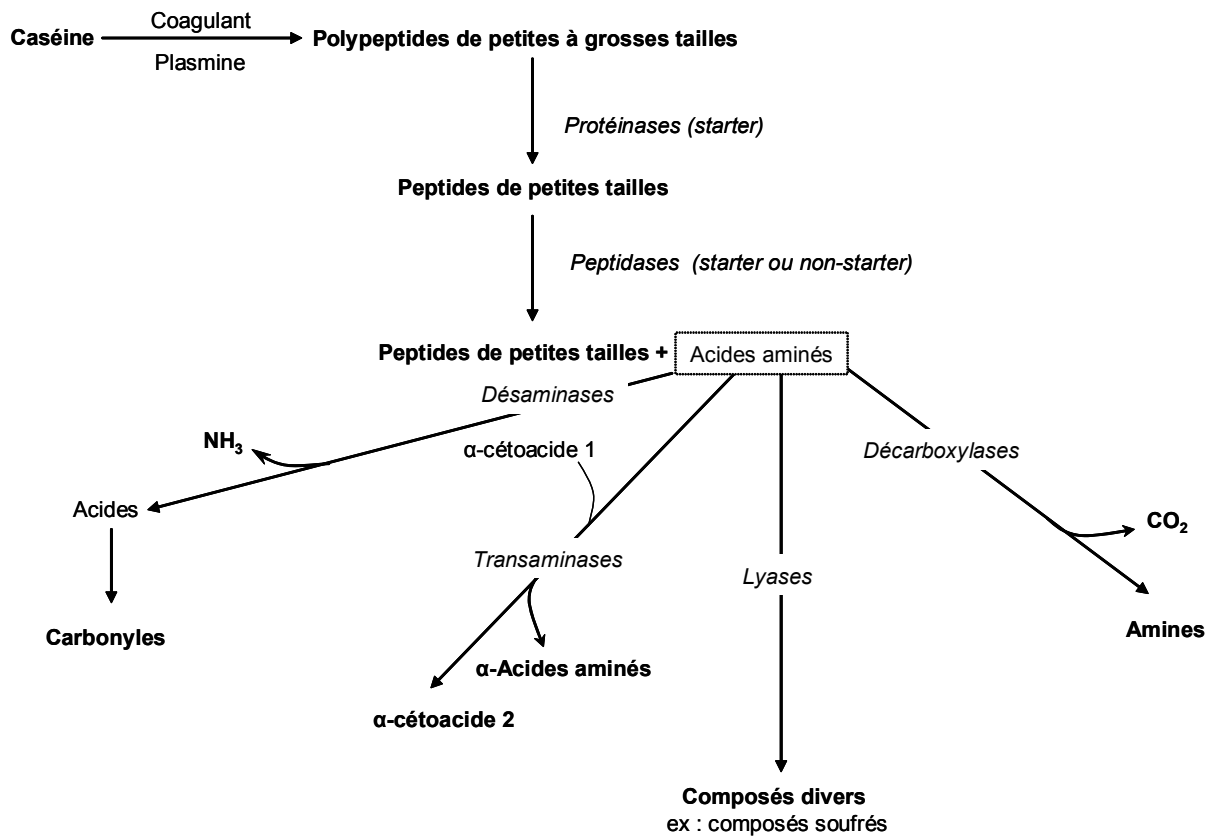
#### I. 3. 2. 2. Métabolismes des acides aminés, produits de dégradation des protéines

Les acides aminés résultent, dans les fromages, de la dégradation des protéines principalement par les protéases et peptidases de la flore microbienne (Figure 1).

N'étant pas volatils, les acides aminés en tant que tels ne possèdent aucun potentiel aromatique. Cependant, ils donnent naissance à de nombreuses molécules odorantes soit en subissant des réactions de dégradation, soit en réagissant spontanément avec d'autres molécules (Fox et Wallace, 1997).

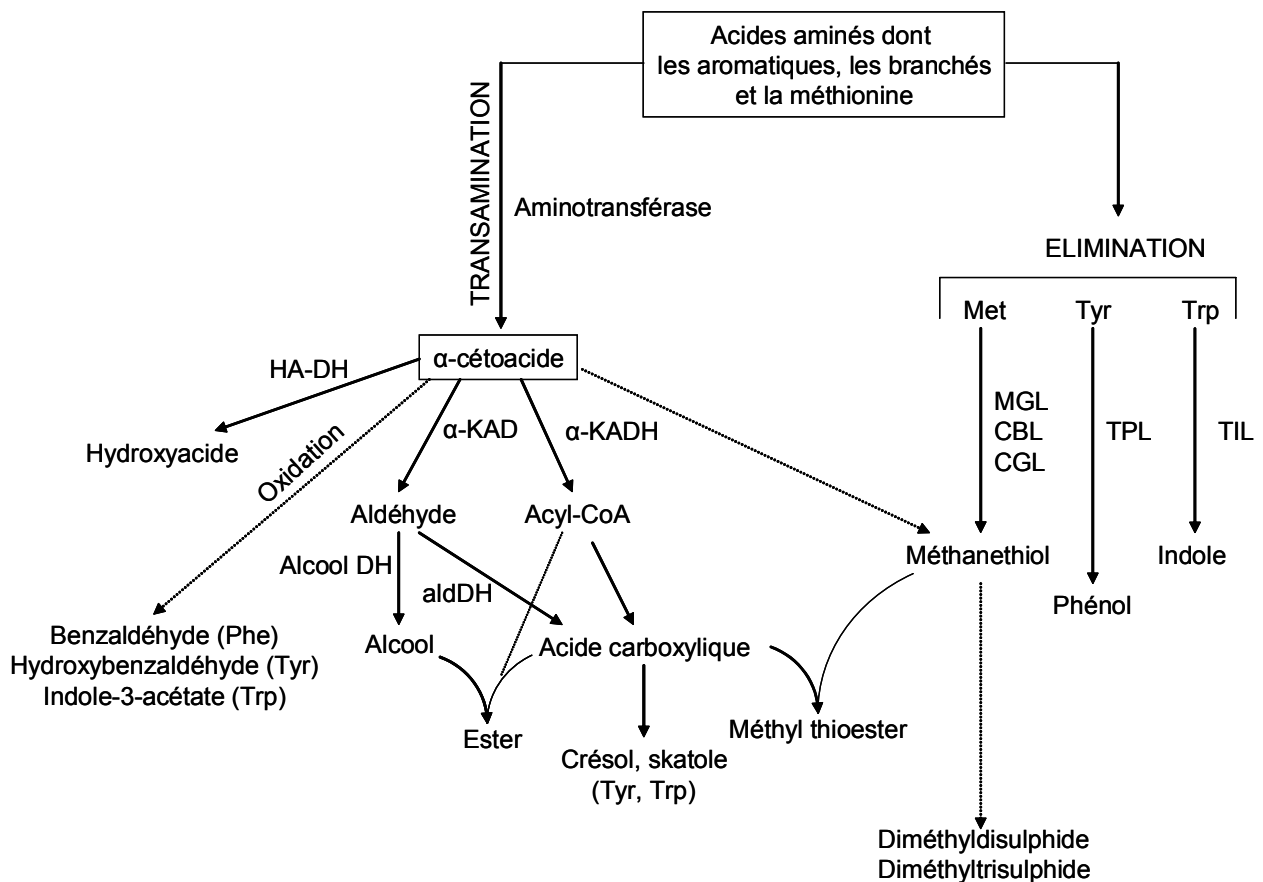
**Figure 1 :** Protéolyse et catabolisme des acides aminés durant l’affinage du fromage (d’après Yvon et Rijnen, 2001)

On distingue 2 types de flore : starter ou non-starter. La flore starter correspond aux ferments lactiquesensemencés volontairement dans le lait. Celle non-starter, peu correspondre i) à la flore lactique retrouvée naturellement dans le fromage ii) à celle apportée par l’atmosphère des ateliers de fabrication ou iii) à la flore d’affinage.



**Figure 2 :** Principales voies cataboliques des acides aminés (d'après Yvon et Rijnen, 2001).

Ces voies ont été identifiées chez différents micro-organismes. Les voies purement chimiques décrites au cours de l'affinage du fromage sont représentées par des flèches en pointillé. MGL : Méthionine  $\gamma$ -lyase ; CBL : cystathionine  $\beta$ -lyase ; CGL : cystathionine  $\gamma$ -lyase ; TPL : tyrosine-phénol lyase ; TIL : tryptophane indole lyase, Tyr : Tyrosine, Trp : Tryptophane, Met : méthionine ; aldDH : aldéhyde déshydrogénase ;  $\alpha$ -KADH :  $\alpha$ -cétoacide déshydrogénase,  $\alpha$ -KAD :  $\alpha$ -cétoacide décarboxylase, HA-DH : hydroxyacide déshydrogénase ; Alcool DH : alcool déshydrogénase.



Le catabolisme des acides aminés à chaînes carbonées ramifiées (leucine, isoleucine et valine), des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) et de la méthionine, a une grande importance dans l'aromatization des fromages (Tableau 1).

**Tableau 1** : Nom et nature chimique des principaux composés d'arôme issus des acides aminés branchés, aromatiques ou de la méthionine (Yvon et Rijnen, 2001).

Acides aminés	Aldéhydes	Alcools	Acides carboxyliques	Thiols/divers
Leucine	3-Méthylbutanal ou isovaléraldéhyde	3-Méthylbutanol	Acide 3-méthylbutanoïque ou acide isovalérique	
Isoleucine	2-Méthylbutanal	2-Méthylbutanol	Acide 2-méthylbutanoïque	
Valine	2-Méthylpropanal ou isobutyraldéhyde	2-Méthylpropanol	Acide 2-méthylpropanoïque ou acide isobutyrique	
Phénylalanine	Phénylacétaldehyde, benzaldéhyde (-2C)	Phényléthanol	Acide phénylacétique	
Tyrosine	OH-Phénylacétaldehyde, OH-benzaldéhyde (-2C)	OH-Phényléthanol	Acide OH-phénylacétique	<i>p</i> -Crésol, phénol
Tryptophane	Indol-2-acétaldéhyde, indol-3-aldéhyde	Tryptophol	Acide indol-3-acétique	Skatole, indole
Méthionine	3-Méthylthiopropanal, ou méthional	3-Méthylthiopropanol	Acide 3-méthylpropionique	Méthanethiol

Jauniaux et coll. (1990) ont mis en évidence un transporteur général d'acides aminés (GAP1) chez *S. cerevisiae*. Une fois transportés dans la cellule, les acides aminés sont ensuite dégradés par différentes voies enzymatiques. Dans le cas de la méthionine, des activités enzymatiques parmi lesquelles la L-méthionine déméthiolase, le KMBA (acide-2-céto-4-méthylthiobutyrique) déméthiolase et la L-méthionine aminotransférase ont été détectées chez les levures *G. candidum*, *Kluyveromyces* sp., *D. hansenii*, *Y. lipolytica* et *S. cerevisiae* (Arfi et coll., 2002 ; Arfi et coll., 2003 ; Bonnarne et coll., 2001 ; Cernat Bondar et coll., 2005 ; Kagkli et coll., 2006). L'activité L-méthionine aminotransférase est de loin l'activité la plus importante chez *G. candidum* et *Kluyveromyces* sp., avec une accumulation transitoire de KMBA. Récemment, Kagkli et coll., (Kagkli et coll., 2006) ont montré que les gènes *KLARO8.1* et *KLARO8.2* jouaient un rôle prépondérant dans l'étape de transamination de la L-méthionine chez *K. lactis*. L'aminotransférase aromatique a aussi été caractérisée chez *L. lactis* (Roudot-Algaron et Yvon, 1998), chez des souches de *Lactobacillus* (Gummalla et Broadbent, 2001) et chez *B. linens* (Lee et coll., 1985). L'indole, le phénol, le scatole et le *p*-crésol sont des composés issus de la dégradation des acides aminés aromatiques. Ces derniers provoquent des défauts d'arôme en conférant au fromage des notes phénolique ou fécal. Ces composés sont pourtant retrouvés en quantité importante dans les fromages et plus particulièrement dans les fromages à pâte molle croûte lavée, tels que le Maroilles, le Livarot, le Limburger ou le Vacherin (Dummont et coll., 1974a).

Les aminotransférases intervenant dans la dégradation des acides aminés à chaîne ramifiée ont été caractérisées chez de nombreux micro-organismes fromagers : *Lactococcus lactis* (Ayad et

coll., 2000), *L. lactis* subsp. *cremoris* (Yvon et coll., 2000), *Lb. paracasei* (Hansena et coll., 2001), *S. cerevisiae* (Dickinson et Norte, 1993), et *Y. lipolytica* (le gène *Y1BAC1*) (Cernat Bondar et coll., 2005). Le catabolisme de ces acides aminés est initié par une aminotransférase qui produit l' $\alpha$ -cétoacide. Les  $\alpha$ -cétoacides issus de la transamination des acides aminés subissent ensuite plusieurs réactions pour former des composés à vocation aromatique. En effet, la transformation de l' $\alpha$ -cétoacide en composé d'arôme peut se faire selon trois voies différentes : 1) une décarboxylation oxydative qui donne lieu à un acide carboxylique, 2) une décarboxylation simple en aldéhydes (voie d'Ehrlich), 3) une réduction en  $\alpha$ -hydroxyacides (Dickinson et coll., 1998 ; Marilley et Casey, 2004). La dégradation chimique semble également jouer un rôle non négligeable dans la transformation des  $\alpha$ -cétoacides et de leurs produits dérivés en composés d'arôme (Yvon et Rijnen, 2001).

### I. 3. 2. 3. L'ammonium/ammoniac, produit de dégradation des acides aminés

La protéolyse ainsi que la dégradation d'acides aminés permet l'accumulation d'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) dans le milieu extracellulaire. Le mécanisme de transport des acides aminés et leurs dégradations, met en jeu diverses protéines membranaires. Etant à l'interface cellule/milieu, les membranes cellulaires jouent un rôle essentiel dans tous les mécanismes d'absorption ou d'excrétion et les règles qui régissent ces échanges transmembranaires sont à prendre en considération. Le caractère hydrophobe de la double couche lipidique permet à la cellule de maintenir des concentrations de solutés différentes de part et d'autre de la membrane, c'est-à-dire d'abord entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire mais ceci est aussi vrai pour chaque compartiment cellulaire (ex : mitochondrie, lysosome, vacuole). La séparation des compartiments définis par la membrane ne doit cependant pas être totale et des échanges moléculaires sont nécessaires à la vie cellulaire. Ainsi, afin d'assurer l'approvisionnement en métabolites, l'élimination des déchets métaboliques et le maintien de concentrations ioniques bien définies, les cellules ont développé des systèmes de transport d'ions et de macromolécules faisant intervenir des protéines membranaires : transporteurs, pompes ou canaux.

Il y a trois principales classes de protéines membranaires de transport :

- Les canaux, pores permettant le mouvement passif d'ions (canaux ioniques) ou de molécules de petite taille ( $\text{H}_2\text{O}$ , glucides, acides aminés, nucléotides) avec une capacité de transport d'environ  $10^7$  à  $10^8$  molécules/sec.

- Les pompes, avec une capacité de transport actif d'environ  $10^2$  à  $10^3$  ions/sec. Ce sont des protéines qui hydrolysent l'ATP et qui sont donc qualifiées d'ATPases. Ce type de transport est dénommé « transport actif primaire ».

- Les transporteurs qui assurent un transport passif (uniport) ou actif (symport et antiport) avec une capacité de transport  $10^2$  à  $10^4$  molécules/sec. Ce transport actif nécessite la constitution préalable d'un gradient ionique (par une pompe) et est aussi dénommé « transport actif secondaire ».

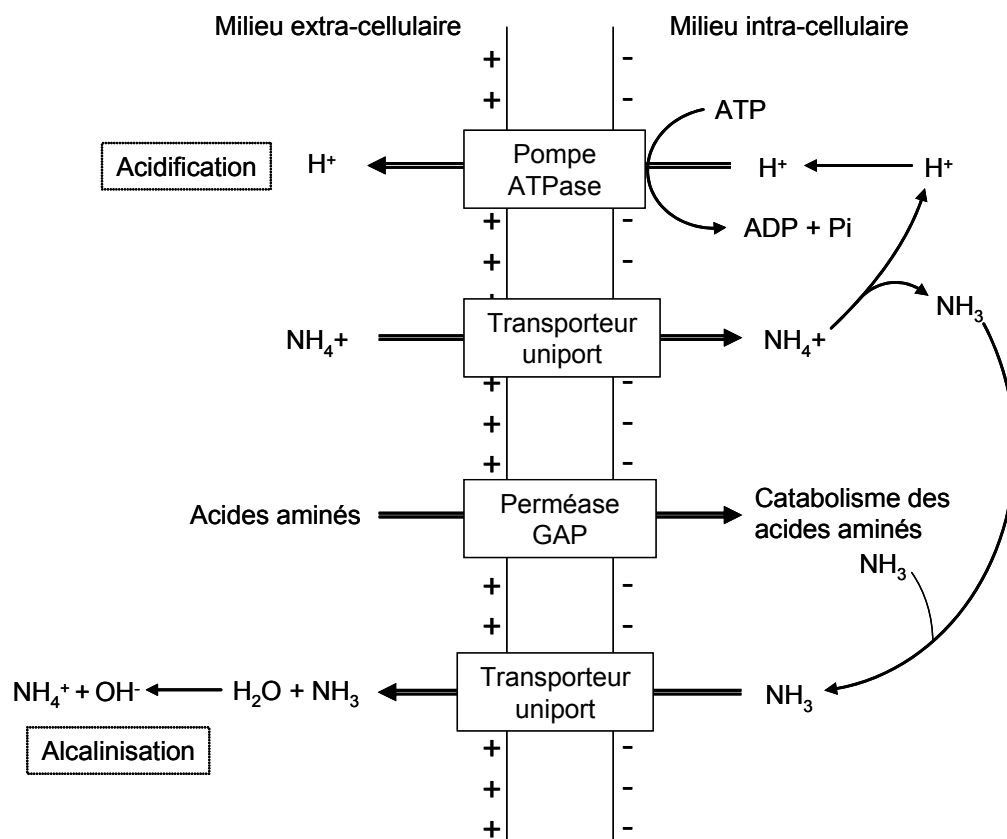
Les acides aminés sont transportés dans la cellule à l'aide de deux catégories distinctes de transporteurs : un système de transport non spécifique de l'ensemble d'acides aminés (GAP : General Aminoacid Permease) et des systèmes de transport spécifiques d'un seul ou d'un petit nombre d'acides aminés. La perméase GAP peut être inhibée et réprimée par la présence de l'ion ammonium (Ziame et coll., 1987). Elle fonctionnerait comme un « récupérateur » d'azote à partir des acides aminés. Des théories plus récentes remettraient en cause ce fait et montreraient qu'il existe toujours une activité basale de GAP (Akin, 2008).

Les ions ammonium provenant de la dégradation des acides aminés, sont assimilés par la levure. Une mole d'ions ammonium assimilée correspond à une mole de protons excrétée, ce qui est exprimé par la relation suivante:  $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_3 (\text{cellule}) + \text{H}^+$  (Won et coll., 1993). Ainsi, pour des raisons d'équilibre de charge de part et d'autre de la membrane plasmique, l'entrée de l'ion ammonium est couplée à l'excrétion d'un proton par la pompe ATPase de la membrane plasmique qui va ainsi acidifier le milieu (Figure 3).

La production d'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) par les levures, à partir d'ion ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), contribue à la remontée du pH à la surface des fromages affinés. En effet, l'ammoniac transporté dans le milieu extracellulaire, en réagissant avec une molécule d'eau, peut donner un ion ammonium et un ion  $\text{OH}^-$  :  $\text{NH}_3 (\text{milieu}) + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$  (Figure 3). Cette alcalinisation permettrait la croissance de la flore bactérienne acido-sensibles du fromage (Gori et coll., 2007). Palkova et coll (Palkova et Vachova, 2003) ont montré que la production d'ammoniac dépendait directement de la concentration en acides aminés extra-cellulaire, mais pas de celle en ions ammonium. Un changement périodique de pH des colonies de levures (*Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Hansunula*), qui passent d'une phase acide à une phase alcaline a été décrit (Palkova et Vachova, 2006). L'alcalinisation est observée en carence nutritionnelle, et corrèle avec la production d'ammoniac au sein même de la colonie ou des colonies voisines. Cette alcalinisation induit une inhibition de la croissance des levures qui rentrent ainsi en phase de « latence ». Cette phase permettrait aux levures de minimiser leur consommation d'énergie, et d'être ainsi plus résistantes face au stress nutritionnel. Une

fois que la carence nutritionnelle est levée, la production d'ammoniac est réduite, ce qui provoque une chute de pH et une induction de la croissance des levures (Palkova et Vachova, 2003). Ces observations mettent en évidence le rôle de l'ammoniac comme molécule signal chez les levures, connu sous nom de « Quorum sensing » chez les bactéries. De plus, cette molécule serait à l'origine de changements de la structure morphologique de certaines levures. *Candida mogii* passerait d'une structure lisse (en phase acide) à une structure en forme de « spaghetti » (en phase alcaline) (Palkova et Forstova, 2000). Des travaux menés Gori et coll., (2007) ont mis en évidence le rôle de l'ammoniac comme médiateur chez les levures d'affinage. La production d'ammoniac par les micro-organismes fromagers semble donc avoir un effet non négligeable sur le comportement de l'ensemble de l'écosystème et devrait faire l'objet d'étude au sein du fromage.

**Figure 3 :** Schéma de fonctionnement des différents types de transporteurs membranaires, responsables de l'entrée ou de la sortie des acides aminés, des ions ammonium ou de l'ammoniac.



### I. 3. 3. Lipolyse et transformation des acides gras

La matière grasse (constituée à 98 % de triglycérides) joue un rôle important dans l'aromatisation des fromages à pâte molle; non seulement du fait de leur pouvoir aromatisant, mais aussi en tant que précurseur des méthylcétones, des alcools, des lactones et des esters. L'hydrolyse des lipides, lors de l'affinage, est un phénomène qui a été largement décrit (Collins et coll., 2003 ; Fox et Wallace, 1997 ; Mc Sweeney, 2004 ; Molimard et Spinnler, 1996). Tout comme les bleus, le Camembert est le fromage présentant une forte dégradation de la matière grasse (Collins et coll., 2003). La quantité importante d'acides gras libres dans le camembert et les fromages bleus est essentiellement due à l'action de la moisissure et, à un moindre degré, aux autres lipases microbiennes. En fait, la majeure partie des acides gras libres ayant un nombre de carbone situé entre 4 et 20, provient de la lipolyse des triglycérides par les moisissures, alors que ceux ayant un nombre de carbone situé entre 2 et 6 proviennent principalement de la dégradation du lactose et des acides aminés (Molimard et Spinnler, 1996). Certaines levures participent également à la dégradation des lipides au cours de l'affinage. En effet, *G. candidum* est probablement responsable de la modification du profil des acides gras libres en faveur des acides insaturés dans les fromages de type Camembert, par la production de lipases (Choisy et coll., 1997a). *Y. lipolytica* est également capable de produire des lipases extracellulaires (Guéguen et Schmidt, 1992), ce qui pourrait expliquer que cette levure soit beaucoup plus lipolytique que *D. hansenii* ou *S. cerevisiae* (van den Tempel et Jakobsen, 2000). Trois gènes codant pour des triacylglycérol hydrolases (lipases extracellulaires) ont été identifiés chez *Y. lipolytica* : *LIP2* (Pignède et coll., 2000), *LIP7* et *LIP8* (Fickers et coll., 2005).

## I. 4. Les interactions microbiennes

### I. 4. 1. Définitions

Au cours de la maturation d'un fromage, les équilibres entre les différents groupes de micro-organismes évoluent constamment. Ainsi, suivant les conditions physico-chimiques de l'environnement à un temps d'affinage, certains micro-organismes se multiplient activement, alors que d'autres tendent à disparaître. Les interactions observées dans des cultures mixtes peuvent être positives, neutres ou négatives et sont classées en 5 catégories : l'amensalisme, la compétition, le commensalisme, le parasitisme et le mutualisme (Sieuwerts et coll., 2008) (Tableau 2).



**Tableau 2** : Interactions microbiennes inter-espèces, observées dans différents produits laitiers (d'après (Siewewerts et coll., 2008).

Types d'interaction et produits	Micro-organismes impliquées	Références
<b>Mutualisme</b>		
Yaourt	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp, <i>bulgaricus</i>	(Courtin et Rul, 2004)
Produits laitiers	Bactérie lactique	(Narvhus et Gadaga, 2003)
Lait	Bactérie lactique + Levures	(Narvhus et Gadaga, 2003)
Surface de fromage affiné	Différents types de moisissures, levures et bactéries	(Corsetti et coll., 2001)
<b>Amensalisme</b>		
Produits laitiers	Bactérie lactique, <i>Listeria monocytogenes</i>	(Balasubramanyam, 1998)
Yaourt	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp, <i>bulgaricus</i>	(Balasubramanyam, 1998 ; Benkerroum et coll., 2002)
Surface de fromage affiné	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	(Loessner et coll., 2003)
<b>Commensalisme</b>		
Produits laitiers	Bactérie lactique	(Narvhus et Gadaga, 2003 ; Xu et coll., 2005)
Yaourt	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp, <i>bulgaricus</i> , <i>bactérie propionique</i>	(Xu et coll., 2005)
Yaourt et Produits laitiers	Bactérie lactique, bactérie propionique	(Xu et coll., 2005)
Lait	Levures, bactéries	(Gadaga et coll., 2001 ; Narvhus et Gadaga, 2003)
Surface de fromage affiné	Bactérie lactique, <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Brevibacterium linens</i> , <i>Corynebacterium ammoniagenes</i> , staphylococci	(Mounier et coll., 2005)
Lait fermenté, yaourt, fromage	Levures, bactéries	(Viljoen, 2001)
<b>Compétition</b>		
Yaourt	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp, <i>bulgaricus</i>	(Zouraria et coll., 1991)
Produits laitiers	Levures, bactéries	(Narvhus et Gadaga, 2003)
<b>Parasitisme</b>		
Lait	Bactéries, phages	(Brassow, 2001 ; Sturino et coll., 2004)

#### I. 4. 1. 1. Amensalisme

L'amensalisme est une interaction inter-espèces où la présence de l'un ou de plusieurs micro-organismes à un effet inhibiteur sur les autres micro-organismes présents, sans que le micro-organisme inhibiteur en tire le moindre profit. L'amensalisme permet ainsi de maîtriser la croissance de micro-organismes pathogènes et d'altération en utilisant des souches microbiennes, tout en préservant les qualités nutritionnelles et organoleptiques du produit. C'est donc une méthode de conservation qui permet d'éviter l'ajout d'additifs ou de conservateurs chimiques dans les produits agro-alimentaires. Cette protection est rovoquée par le développement de la souche rajoutée qui, lorsque les cellules sont en nombre important, sert de barrière physique et/ou joue le rôle de compétiteur nutritionnel. L'amensalisme est

observé dans les produits laitiers fermentés où les métabolites tels que les acides carboxyliques, le lactate, l'ammonium sont produits et provoquent une acidification du milieu, empêchant ainsi le développement des micro-organismes acido-sensibles (Caplice et Fitzgerald, 1999 ; Sieuwerts et coll., 2008). D'autres types d'inhibition peuvent être observés par l'action de bactériocines (famille de peptides ou protéines), synthétisés naturellement par des bactéries. Les effets inhibiteurs agissent sur la croissance des micro-organismes pathogènes, indigènes ou inoculés (Sieuwerts et coll., 2008). Certains effets inhibiteurs sont présentés ci-dessous.

#### I. 4. 1. 1. 1. Les bactériocines

Différentes études menées sur le caractère bactéricide des bactéries lactiques ont permis d'isoler des bactériocines, des substances de nature protéique. Les bactériocines participent au phénomène de « Quorum Sensing », qui repose sur la capacité des bactéries à communiquer avec leurs congénères en utilisant des signaux moléculaires. Grâce à leur capacité à se fixer à des récepteurs de la cellule, elles ont une action bactéricide ou bactériostatique sur celle-ci. Le potentiel inhibiteur que présente quelques bactériocines sur certains pathogènes en matrice laitière ou fromagère a été testé. La nisine, est un antibiotique qui est synthétisée par certaines souches de *L. lactis* ssp. *lactis* et certaines bactéries Gram-positif. Son activité est basée sur la perméabilisation de la membrane cytoplasmique, provoquant ainsi sa dépolarisation (Entian et de Vos, 1997 ; Hyde et coll., 2006). Des travaux réalisés sur des fromages à pâte molle, ont mis en évidence l'inhibition de *L. monocytogenes* par l'action de la pédiocine AcH sécrétée par *L. plantarum* ajouté dans la saumure (Loessner et coll., 2003). De récentes applications de cultures aux propriétés inhibitrices sur *L. monocytogenes* sur du fromage sont résumées dans le tableau 3.

**Tableau 3 :** Récentes applications de cultures bactériocinogéniques et de bactériocines contre *L. monocytogenes* dans les fromages frais ou à pâtes molles (Irlinger et coll. 2009).

Bactériocines	Micro-organismes	Modes d'utilisations	Références
Entéroïne 416K1	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Bactériocine présente dans des films polymériques	(Iseppi et coll., 2008)
Céréine 8A	<i>Bacillus cereus</i>	Application de la bactériocine à la surface	(Bizani et coll., 2008)
Entéroïne A et B	<i>Enterococcus faecium</i>	Culture complémentaire utilisée lors de l'emorgement et dans la solution d'affinage	(Izquierdo et coll., 2009)
Lacticine 3147	<i>L. lactis</i>	Etalée à la surface du fromage	(O'Sullivan et coll., 2006)
Nisine et pédiocine PA-1	Recombinant de <i>L. lactis</i>	Culture starter	(Reviriego et coll., 2007)
Entéroïne A	Recombinant de <i>L. lactis</i>	Culture starter	(Liu et coll., 2008)

#### I. 4. 1. 1. 2. L'ammoniac

Le rôle de l'ammoniac comme molécule signal à récemment été montré (voir partie 2.3). L'ammoniac agirait sur la croissance et le développement des colonies de levures (Gori et coll., 2007 ; Palkova et Vachova, 2006). Cette molécule aurait aussi un effet sur la structure morphologique des levures. Mounier et coll., (Mounier et coll., 2008) ont mis en évidence une inhibition de l'expansion des mycélium de *G candidum* par *Y. lipolytica* dans un caillé. L'ammoniac produit par *Y. lipolytica* pourrait être à l'origine de cette inhibition.

Dans le but de comprendre la nature des interactions, la compréhension du rôle de cette molécule au sein de l'écosystème fromager semble indispensable.

#### I. 4. 1. 1. 3. L'acide lactique et acide acétique

L'acide lactique est le métabolite majeur issu de la fermentation homofermentaire de certaines bactéries lactiques. Il peut abaisser le pH à un niveau où les bactéries telles que *Listeria*, *Staphylococcus* ou *Clostridium* sont inhibées (Holzapfel et coll., 1995). La plupart du temps, les acides organiques faibles ne diminuent pas le nombre de micro-organismes mais retardent leur croissance en allongeant par exemple, la phase de latence (Dacosta, 2000). La croissance de *E. coli* est inhibée à un pH 5,1 et 0,5 % d'acide lactique est la concentration minimale pour inhiber la croissance de *L. monocytogenes* (Oh et Marshall, 1993). Toutefois, cet effet dépend des stéréo-isomères d'acide lactique produits. En effet, l'acide L-lactique est plus inhibiteur que la forme D (Benthin et Villadsen, 1995). L'acide acétique est un métabolite qui peut être produit par voie hétérofermentaire chez certaines bactéries lactiques. Il est à l'origine d'une inhibition plus importante que l'acide lactique du fait d'une constante de dissociation plus élevée (pKa de 4,75 pour l'acide acétique contre 3,1 pour l'acide lactique), pour une concentration et un pH donnés (Dahl et coll., 2000). L'acide acétique est donc plus inhibiteur envers *L. monocytogenes* (Ahamad et Marth, 1989), mais les deux acides organiques peuvent agir de manière synergique. En effet, l'acide lactique baisse le pH du milieu, ce qui augmente la toxicité de l'acide acétique (Adams et Hall, 1988).

#### I. 4. 1. 2. Compétition

Pendant la fermentation, les micro-organismes sont en compétition pour les nutriments. Les sources de carbones sont souvent présentes à fortes concentrations. Dans ce cas, la compétition consiste en la consommation rapide de ces nutriments et leur conversion en biomasse. Dans les produits laitiers, la source d'azote est souvent limitante, et les micro-

organismes sont en compétition pour les acides aminés libres et les petits peptides présents dans la matrice. Les micro-organismes dominants et adaptés au milieu, seront ceux capables de produire des protéases, des peptidases et d'induire les systèmes de transport. Le taux de croissance et le dynamisme des populations dans un produit laitier dépendent essentiellement de leur capacité à consommer les acides aminés (Juillard et coll., 1996 ; Juillard et coll., 1995 ; Sieuwerts et coll., 2008).

#### I. 4. 1. 2. 1. Compétition pour les micronutriments

Les micronutriments tels que le fer peuvent également être des facteurs limitants pour la croissance de certains micro-organismes dans les fromages à pâte molle. En conséquence, les isolats déficient en fer (ex : *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium ssp.*) utilisent des systèmes moléculaires spécifiques comme les sidérophores qui permettent la captation du fer (Irlinger et Mounier, 2009). Ces derniers permettent la solubilisation des ions fer en formant des complexes, puis leur consommation grâce à des mécanismes de transport actifs. L'utilisation de souches prototrophes de *Brevibacterium ssp.*, pourrait être une solution à sa faible capacité de compétition au cours de l'affinage (Noordman et coll., 2006).

#### I. 4. 1. 2. 2. L'effet Jameson

La plupart des interactions « *in situ* » dans l'aliment se limite à une interruption précoce de la croissance de la flore minoritaire (en générale la flore pathogène), simultanée à l'arrêt de la croissance de la flore majoritaire (en générale la flore d'altération ou la flore technologique). Il y aurait donc saturation à un niveau maximal de la flore totale (somme des 2 flores), ce qui pourrait s'expliquer par une compétition pour une ressource limitante commune quelconque (ex : un substrat). On nomme ce mécanisme l'« effet Jameson » (Jameson, 1962).

L'« effet Jameson » est aussi observé au sein de l'écosystème microbien naturel des planches d'affinage en bois des fromages à pâte molle. Une compétition a été mesurée entre le consortium microbien prélevé sur des planches d'affinage en bois et des souches de *Listeria* inoculées. Cette compétition apparaît quand le consortium rentre en phase stationnaire et entraîne un arrêt de la croissance de *Listeria monocytogenes*. Ceci pourrait être expliqué par un mécanisme de compétition nutritionnelle entre la flore dominante du biofilm et celle du pathogène (Guillier et coll., 2008).

#### I. 4. 1. 3. Commensalisme

Le commensalisme est une interaction où un micro-organisme bénéficie de la présence d'un autre, sans que ce dernier en tire profit (Siewwerts et coll., 2008).

Les levures, principalement *D. hansenii* et *G. candidum* jouent un rôle important dans la désacidification du fromage et l'implantation de bactéries acido-tolérantes en i) consommant le lactate produit par les bactéries lactiques dans le caillé et ii) en dégradant les acides aminés libérant ainsi des métabolites alcalins tel que l'ammoniac (Mounier et coll., 2008). Ainsi, le développement d'une flore bactérienne aérobique acido-sensible se met en place. Cette flore est constituée d'espèces tels qu'*Arthrobacter* spp, *B. linens*, *C. casei*, *micrococci* et *staphylococci* (Mounier et coll., 2008). Dans les fromages à pâte pressée suisses, les bactéries propioniques se développent grâce à l'utilisation de l'acide lactique produit par les bactéries lactiques (Siewwerts et coll., 2008). De plus, au cours de l'affinage et notamment lors des soins de croûte, l'apport de sel fragilise les parois des levures qui éclatent en libérant des nucléotides, des peptides ou des métabolites servant de substrats aux bactéries de surface. Elles sont également capables d'excréter des composés contribuant au développement de la flore bactérienne (Devoyod, 1969). D'après Roostita et Fleet (Roostita et Fleet, 1996), *Y. lipolytica* et *C. catenulata* sont capables de produire dans le camembert ou les fromages bleus, des acides aminés libres qui sont favorables à la croissance de la flore présente. Dans ces mêmes types de fromage, *D. hansenii* et *S. cerevisiae* auraient une action positive sur la croissance de *Y. lipolytica* et *K. marxianus* (Addis et coll., 2001).

Concernant les bactéries de surface, une étude réalisée par Bockelmann et coll. (Bockelmann et coll., 2005), a montré que l'utilisation conjointe de *S. equorum* et de *D. hansenii* dans le bain de saumure, provoquait une désacidification nettement plus rapide de la croûte pendant les sept premiers jours de maturation, permettant ainsi une implantation plus rapide des bactéries corynéformes acido-sensibles.

#### I. 4. 1. 4. Parasitisme

Le parasitisme est une interaction où un micro-organisme tire profit d'un autre au dépend de ce dernier. Les bactériophages (virus n'infectant que des bactéries) sont un exemple bien connu de parasitisme. Les processus de fermentation sont fortement exposés à ce type d'interaction du fait de l'utilisation répétée du matériel. Lors de la fermentation, les phages peuvent subitement inactiver la croissance des souches dominantes, causant ainsi une

altération du produit fermenté (Sieuwerts et coll., 2008 ; Sturino et coll., 2004). Plus de 7 phages spécifiques de *S. thermophilus* ont pu être identifiés (Sturino et coll., 2004).

Les phages portent dans leur génome des séquences permettant des transferts horizontaux de gènes entre populations bactériennes. Ces transferts accélèrent le processus d'évolution des communautés bactériennes et contribuent à la diversité des cultures fermentaires mixtes (Weinbauer, 2004 ; Weinbauer et Rassoulzadegan, 2004).

#### I. 4. 1. 5. Mutualisme

Le mutualisme est une interaction entre une ou plusieurs espèces, dans lesquelles toutes les parties tirent profit l'une de l'autre. Le meilleur exemple de mutualisme est l'interaction observée entre *S. thermophilus* (bactérie non protéolytique) et *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. En effet, la croissance simultanée de *S. thermophilus* et de *L. bulgaricus* dans le lait, s'accompagne d'un accroissement des concentrations bactériennes (Pearce et Flint, 2003 ; Robinson et coll., 2002), d'une augmentation des vitesses d'acidification par rapport aux vitesses observées en culture pure (Amoroso et coll., 1989 ; Spinnler et Corrieu, 1989) ainsi que d'une amélioration de la stabilité physique du produit (Béal et Sodini, 2003). Ces phénomènes s'expliquent par le fait que *Lactobacillus bulgaricus* étant très protéolytique, dégrade la caséine en acides aminés, ces derniers étant plus facilement assimilables par *S. thermophilus* (Abu-Tarboush, 1996). A son tour, *S. thermophilus*, produit de petites quantités de CO<sub>2</sub> à partir d'urée et stimule ainsi la croissance de *Lactobacillus bulgaricus* (Ascon-Reyes et coll., 1995 ; Robinson et coll., 2002 ; Zirnstein et Hutkins, 2000).

Le fromage est un écosystème complexe où les levures, moisissures et bactéries interagissent entre elles par différents types d'interactions. Les études fonctionnelles de certains micro-organismes ont, jusqu'à maintenant, été réalisées en mono-culture mais ne sont pas forcément représentatives du fonctionnement réel de l'écosystème fromager. Pourtant, la connaissance précise des interactions microbiennes générées « in situ » aurait un impact économique important, puisqu'elle permettrait d'obtenir des fromages de qualité sanitaire et organoleptique maîtrisée. Avec l'avènement de la biologie moléculaire, depuis une dizaine d'années, le développement d'outils de la post-génomique et de protocoles adaptés à la manipulation d'ARN, on peut raisonnablement penser que l'étude des interactions « in situ » sera possible dans un avenir proche.

## **I. 5. Méthodes d'études dynamiques et fonctionnelles d'un écosystème fromager**

La compréhension de l'écosystème fromager et des fonctions qu'il génère pendant l'affinage est un enjeu important tant du point de vue scientifique que pour ses applications potentielles. L'essor récent de techniques moléculaires permet désormais d'étudier cet écosystème microbien particulier par une approche dynamique et fonctionnelle des populations (ex : production d'arômes, acidification). Selon les paramètres physico-chimiques de l'environnement et des associations microbiennes, les équilibres entre les différents groupes de micro-organismes et l'importance relative des populations sont en constante évolution. La combinaison d'approche culture dépendante et/ou indépendante (outils moléculaires), semble être indispensable pour la compréhension des phénomènes microbiens qui régissent l'affinage.

### **I. 5. 1. Etude dynamique des espèces microbiennes**

#### **I. 5. 1. 1. Approche classique (culture dépendante)**

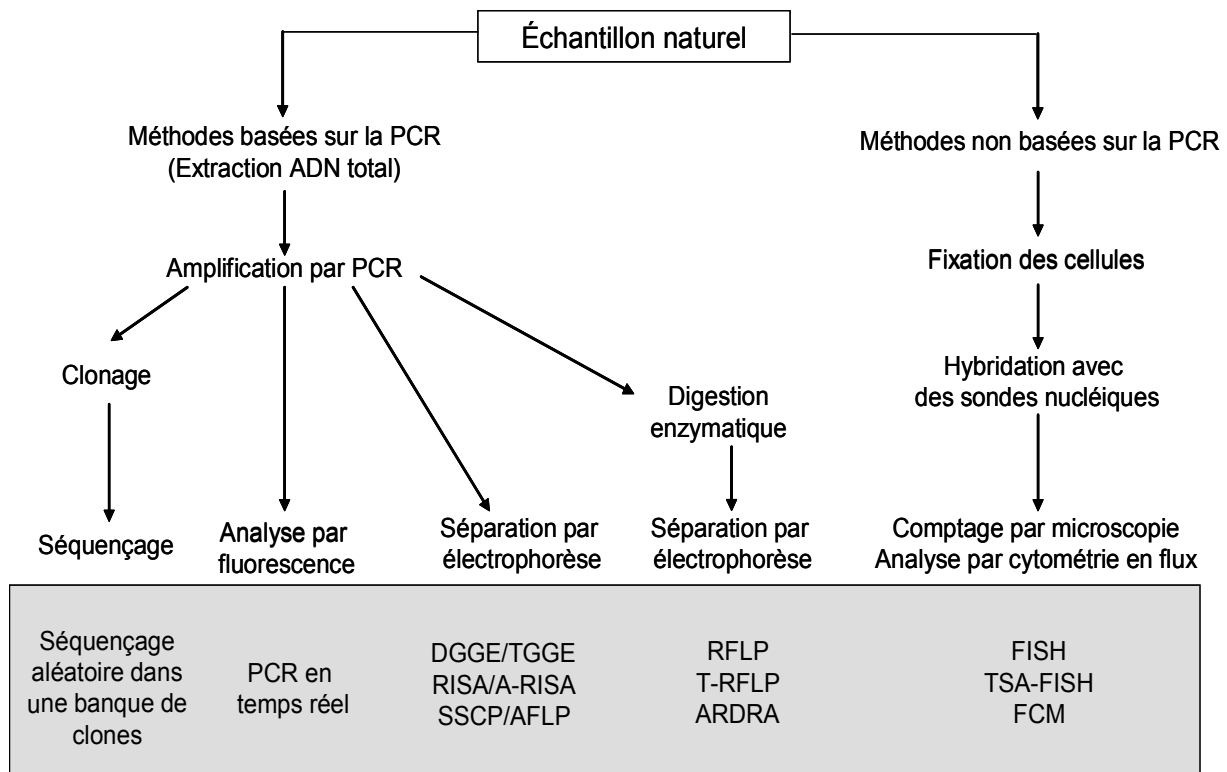
Avant le développement des outils de biologie moléculaire, l'identification de la flore fromagère était uniquement basée postérieurement sur une approche d'isolement de souches puis d'identification à partir de caractères phénotypiques tels que les caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques. Afin de pouvoir déterminer cette diversité, le choix des milieux et des paramètres de cultures des isolats tels que la composition, le pH, la température et le temps d'incubation, reste primordial. On a pu estimer que 90 % de la population microbienne fromagère est cultivable. Grâce à ces méthodes classiques d'isolement et à l'utilisation de méthode moléculaire telles que le séquençage des gènes codant pour l'ARN 16S pour l'identification de ces isolats, un inventaire relativement complet a pu être fait sur la flore fromagère (Abriouel et coll., 2008 ; Delbes et Montel, 2005 ; Dolci et coll., 2009 ; Ercolini et coll., 2003 ; Feurer et coll., 2004a ; Mounier et coll., 2005 ; Mounier et coll., 2009). Cependant ces méthodes de culture dépendante sont souvent longues, fastidieuses et sous-estiment la diversité réelle de l'écosystème du fait de l'incapacité de développement de certains micro-organismes en dehors de leur environnement naturel. Dans le but de bien étudier l'ensemble de la diversité et de la complexité d'un écosystème microbien (cultivable ou non), il est indispensable de combiner l'approche culture dépendante avec des méthodes moléculaires directes (cultures indépendantes).

### I. 5. 1. 2. Approche moléculaire directe (culture indépendante)

L'avènement de la biologie moléculaire et le développement de techniques de fragment d'ADN permettant d'extraire l'ADN (ou l'ARN) à partir de la matrice fromagère (Jany et Barbier, 2008), a permis de produire une empreinte génomique à partir d'un produit PCR. Elle donne alors une image globale de la structure génétique de la communauté bactérienne. Les gènes cibles les plus utilisés lors de l'analyse de communautés microbiennes sont ceux de l'opéron ribosomal, particulièrement l'ARN 16S, ainsi que la séquence d'ADN séparant les gènes de l'ARN ribosomal 16S et 23S. Les propriétés phylogénétiques du 16S ainsi que le nombre important de séquences disponibles représentent des avantages considérables (Jany et Barbier, 2008). Les gènes bactériens codant pour l'ARNr 16S contiennent 9 régions hypervariables V1–V9, dont la diversité de séquence diffère de manière importante selon l'espèce (Baker et coll., 2003). Ces régions hypervariables, contiennent également des régions très conservées, ce qui permet à la fois leur utilisation comme cible pour des amorces spécifiques ou universelles. Ces gènes sont donc utilisés à la fois pour l'identification spécifiques d'espèces et pour l'évaluation globale de la diversité de l'écosystème. La région hypervariable V3 est souvent utilisée comme cible, mais l'utilisation d'amorces ciblant d'autres régions peut améliorer l'analyse (Delbes et coll., 2007). L'analyse de l'ARNr chez les levures limite leur identification au genre ou à la famille (Jany et Barbier, 2008). L'utilisation des régions ITS (Internal Transcribed Spacers) permet une meilleure séparation taxonomique des levures d'un écosystème (Jany et Barbier, 2008). Un diagramme récapitulatif des différentes approches moléculaires pouvant être utilisées pour l'étude d'un écosystème microbien est représenté dans la figure 4. De plus, le tableau 4 résume les différentes approches culture-indépendante réalisées dans le fromage.



**Figure 4 :** Diagramme des différentes approches moléculaires permettant d'évaluer la diversité génétique des communautés microbiennes (d'après (Dorigo et coll., 2005))



*DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ; TGGE: Temperature Gradient Gel Electrophoresis; (A)-RISA:(Automated)-Ribosomal IntergenicSpacer Analysis; SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism ; AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism; (T)-RLFP : Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism ; ARDRA: Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis; (TSA)-FISH: (Tyramide Signal Amplification)-Fluorescent In Situ Hybridization; FCM: Flow Cytometry.*

Tableau 4 : Méthodes de culture-indépendante utilisées dans différentes études d'analyse des communautés microbiennes dans les fromages (d'après (Jany et Barbier, 2008)).

Auteurs	Utilisation	Méthode	Séquence ciblée	Substrat
(Andrighetto et coll., 2004)	Évaluation de la diversité bactérienne	• PCR-TTGE	Région V3 de l'ARNr 16S	Lactosérum de différent fromage de type Grana Padano
(Callon et coll., 2006)	Évaluation de la diversité des levures et de leur dynamique durant l'affinage du fromage/ Création d'une base de données des profils SSCP des levures	• SSCP-PCR	Région V4 de l'ARNr 28S	Fromage au lait cru (Salers)
(Cocolin et coll., 2004)	Protocole d'optimisation du profile bactérien	• PCR-DGGE	Région V1 de l'ARNr 16S	Fromages frais et affinés (Cottage, Kefalotiri, Hallumi, Stracchino and Mozzarella)
(Cocolin et coll., 2007)	Détection de <i>Clostridium</i> spp.	• PCR-DGGE	Région V1 de l'ARNr 16S	Fromage à défaut (Grana Padano)
(Coppola et coll., 2001)	Évaluation de la diversité bactérienne/ Discrimination entre les fromages traditionnels et industriels	• PCR-DGGE	Région V3 de l'ARNr 16S	Fromage artisanal et industriel non affiné (Pasta Filata)
(Coppola et coll., 2006)	Évaluation de la diversité et de la dynamique bactérienne au cours de la fabrication du fromage	• PCR-DGGE	Région V3 de l'ARNr 16S	Fromage artisanal non affiné (Pasta Filata)
(Delbes et Montel, 2005)	Évaluation de la structure et la dynamique de la population de <i>Staphylococcus</i> au cours de la fabrication du fromage	• SSCP-PCR	Région V2 de l'ARNr 16S	Fromages artisanaux au lait de cru
(Delbes et coll., 2007)	Évaluation de la structure et de la dynamique de la communauté bactérienne	• SSCP-PCR • Banque de clone	Région V3 de l'ARNr 16S	Saint-Nectaire artisanal et échantillons de lait cru
(Duthoit et coll., 2005)	Évaluation de la diversité, de la dynamique et de l'activité de la communauté bactérienne	• SSCP-PCR • SSCP-RT-PCR	Région V3 de l'ARNr 16S	Fromage au lait cru (Salers)
(Duthoit et coll., 2005)	Mise en relation de la diversité, la dynamique et l'activité de la communauté bactérienne avec les propriétés sensorielles du fromage	• SSCP-PCR • SSCP-RT-PCR	Régions V2 et V3 de l'ARNr 16S	Fromage au lait cru (Salers)
(Duthoit et coll., 2003)	Évaluation de la diversité et de la dynamique de la communauté bactérienne	• SSCP-PCR • Banque de clone • PCR-TTGE	Régions V2 et V3 de l'ARNr 16S	Fromage au lait cru (Salers)
(El-Baradei et coll., 2007)	Évaluation de la diversité de la communauté bactérienne	• PCR-DGGE • Banque de clone	Région V3 de l'ARNr 16S et divers loci	Fromage artisanal (Domiaty)
(Ercolini et coll., 2004)	Évaluation de la diversité et de la dynamique de la communauté bactérienne	• PCR-DGGE fingerprinting	Région V3 de l'ARNr 16S	Lactosérum utilisé pour la fabrication de la Mozzarella traditionnelle de buffle
(Ercolini et coll., 2008)	Évaluation de la diversité microbienne du lactosérum du fromage AOC Caciocavallo Silano	• PCR-DGGE • DHPLC • RAPD-PCR	Région V3 de l'ARNr 16S	Lactosérum utilisé pour la fabrication du Caciocavallo Silano
(Ercolini et coll., 2001)	Évaluation de la diversité et de la dynamique de la communauté bactérienne	• PCR-DGGE	Région V3 de l'ARNr 16S	Lactosérum utilisé pour la fabrication de la Mozzarella traditionnelle de buffle
(Ercolini et coll., 2002)	Évaluation de l'analyse par PCR-DGGE	• PCR-DGGE	Région V3 de l'ARNr 16S	Fromages achetés de différents supermarchés
(Ercolini et coll., 2003)	Évaluation de la diversité de la communauté bactérienne et localisation des populations	• PCR-DGGE • FISH	Régions V3 et V4-V5 de l'ARNr 16S	Stilton

(Feurer et coll., 2004b)	Évaluation de la diversité et de la dynamique de la communauté bactérienne	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SSCP-PCR</li> <li>• Banque de clone</li> </ul>	Région V3 de l'ARNr 16S	Fromage Français à pâte molle, fabriqué à partir de lait de vache pasteurisé
(Feurer et coll., 2004a)	Comparaison de la diversité bactérienne entre un fromage traditionnel et industriel	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SSCP-PCR</li> <li>• Banque de clone</li> </ul>	Région V3 de l'ARNr 16S	Fromage Français à pâte molle d'origine artisanale ou industrielle fabriqué à partir de lait de vache
(Flórez et Mayo, 2006)	Évaluation de la diversité et de la dynamique de la communauté bactérienne et fongique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PCR-DGGE</li> </ul>	Région V3 de l'ARNr 16S et la région D1 de l'ARNr 26S	Cabrales
(Le Bourhis et coll., 2005)	Évaluation de la diversité de population de <i>Clostridium</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PCR-TTGE</li> </ul>	Région V5-V6 de l'ARNr 16S	Fromages du commerce
(Le Bourhis et coll., 2007)	Évaluation de la dynamique de population de <i>Clostridium</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PCR-TTGE</li> </ul>	Région V5-V6 de l'ARNr 16S	Fromages expérimentaux
(Mauriello et coll., 2003)	Évaluation de la diversité de la communauté bactérienne	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PCR-DGGE</li> </ul>	Région V3 de l'ARNr 16S	Lactosérum provenant de 2 localités de production de la Mozzarella
(Mounier et coll., 2009)	Évaluation de la diversité microbienne à la surface du Livarot	<ul style="list-style-type: none"> <li>• FISH</li> <li>• SSCP</li> <li>• Banque de clone</li> </ul>	Région V3 de l'ARNr 16S et la région D1/D2 de l'ARNr 26S	Livarot commercial
(Ogier et coll., 2004)	Évaluation de la diversité et localisation spatiale des populations/ Création d'une base de données des profils bactériens.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PCR-DGGE</li> <li>• PCR-TTGE</li> </ul>	Région V3 de l'ARNr 16S	10 fromages du commerce
(Ogier et coll., 2002)	Évaluation de la diversité de la communauté bactérienne	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PCR-TTGE</li> </ul>	Région V3 de l'ARNr 16S	Lait fermenté et fromages expérimentaux
(Parayre et coll., 2007)	Optimisation de l'extraction d'ADN et utilisation de la PCR-TTGE afin d'évaluer la population bactérienne.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PCR-TTGE</li> </ul>	Région V3 de l'ARNr 16S	Emmental
(Rademaker et coll., 2005)	Évaluation de la diversité et de la dynamique de la communauté bactérienne	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T-RFLP</li> </ul>	ARNr 16S	Fromage expérimental (Tilsit)
(Randazzo et coll., 2006)	Évaluation de la diversité et de la dynamique de la communauté bactérienne au cours de la fabrication	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PCR-DGGE</li> </ul>	Région V6-V8 de l'ARNr 16S	Fromage expérimental (Siciliano)
(Randazzo et coll., 2002)	Évaluation de la diversité, de la dynamique et de l'activité de la communauté bactérienne au cours de la fabrication	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PCR-DGGE (RT-PCR)</li> </ul>	Régions V1-V3 et V6-V8 de l'ARNr 16S	Fromage artisanal de type Ragusano
(Saubusse et coll., 2007)	Étude des communautés bactériennes capable d'inhiber <i>Listeria monocytogenes</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SSCP-PCR</li> </ul>	Région V2 de l'ARNr 16S	Fromages fabriqués selon la technologie utilisée pour le Saint-Nectaire

## I. 5. 2. Étude fonctionnelle des espèces microbiennes

L'étude fonctionnelle des micro-organismes de l'écosystème fromager est indispensable dans le but de maîtriser la qualité des fromages. Ce type d'approche met en oeuvre des compétences aussi diverses que la bio-informatique, l'étude du transcriptome et du protéome, la physiologie et la biochimie. Le choix de la méthode utilisée pour l'étude fonctionnelle des espèces microbiennes dépend du type de réponse envisagé. Deux niveaux de réponse des changements métaboliques des cellules peuvent être identifiés : la réponse transcriptomique (par RT-PCR quantitative et puce à ADN), par l'étude des modifications de l'expression des gènes et la réponse protéomique, qui s'intéresse aux modifications de la

synthèse des protéines. Les méthodes moléculaires et protéomique, permettant d'analyser ces différentes réponses sont décrites ci-dessous.

#### I. 5. 2. 1. Techniques moléculaires

Le séquençage des génomes de plusieurs micro-organismes présents dans le fromage a permis le développement et l'utilisation d'outils moléculaires permettant de développer des approches de génomique fonctionnelles, dans le but de relier l'expression du génome aux diverses fonctions des cellules et des organismes. Dans cette partie, les méthodes d'analyses transcriptomiques, la RT-PCR quantitative et les puces à ADN sont développées étant donné que ce sont celles principalement utilisées dans ce projet.

#### I. 5. 2. 2. RT-PCR quantitative

##### I. 5. 2. 2. 1. Introduction

Depuis maintenant quelques années, cette technique est utilisée pour quantifier spécifiquement un ou des espèces cibles présentes dans des matrices complexes. Quelques études ont montré l'intérêt de la RT-PCR quantitative dans la connaissance et l'étude de la dynamique d'écosystème microbien complexe (Furet et coll., 2004 ; Matsuki et coll., 2004 ; Song et coll., 2004). Cette technique a ainsi été utilisée pour détecter et quantifier des flores dominantes et sous-dominantes du Livarot (Gente et coll., 2007 ; Larpin et coll., 2006). De plus, son efficacité dans la détection de pathogènes telles que dans des matrices alimentaires ou dans l'eau a déjà été démontrée (Brinkman et coll., 2003 ; Hein et coll., 2001).

##### I. 5. 2. 2. 2. Les étapes de la RT-PCR quantitative

Cette méthode moléculaire comporte deux étapes. Dans un premier temps les ARN sont convertis en ADN complémentaire (transcription inverse), dans un second temps, les ADN complémentaires sont amplifiés et quantifiés par PCR en temps réel.

###### *La transcription inverse (RT)*

La synthèse des ADNc est réalisée à l'aide d'une enzyme, la transcriptase inverse. L'origine de cette enzyme est virale : elle est utilisée par les virus dits à « ARN » qui leurs permettent de transcrire leur ARN en ADN lorsqu'ils parasitent une cellule (Bustin, 2000 ; Bustin et coll., 2005). Les transcriptases inverses utilisées dérivent principalement de deux enzymes, la « Avian Myeloblastosis Virus » (AMV RT) et la « Moloney murine Virus

Reverse Transcriptase » (MmLV RT). Lors de la réalisation de la transcription inverse, l'initiation de la synthèse des ADNc peut être effectuée selon trois méthodes (Zhang, J. et Byrne, C. D., 1999). La première consiste à utiliser des hexamères aléatoires de nucléotides, qui s'hybrident en de multiples endroits de l'ARN, ce qui permet de convertir l'ensemble des ARN en ADNc. La deuxième méthode d'initiation utilise des amorces spécifiques. Seuls les fragments d'ARN ciblés sont transcrits en ADN. La troisième méthode, l'initiation est réalisée à partir d'oligo-T. Cette méthode est utilisable uniquement dans le cas d'organisme eucaryotes (Les oligo-T s'hybrident sur la queue poly A des ARNm).

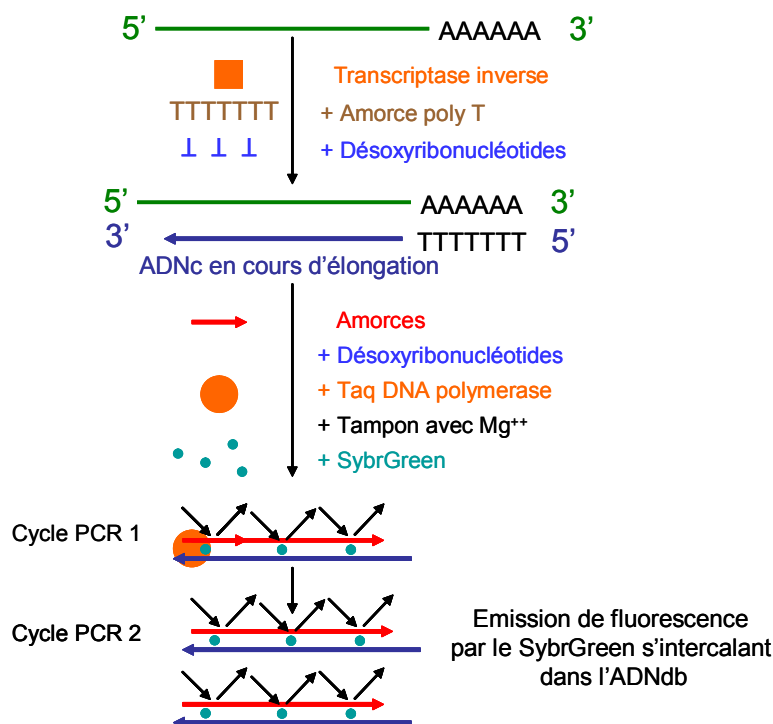
### I. 5. 2. 2. 3. L'amplification et la quantification

La technique de PCR quantitative en temps réel consiste à détecter le produit de PCR au fur et à mesure de son amplification. On accède ainsi à la cinétique d'amplification, ce qui permet de calculer le nombre initial de séquences cibles présentes dans une solution. En théorie, l'amplification suit la loi exponentielle suivante :  $N = N_0 \times 2^n$ , où n représente le nombre de cycles, N la quantité de produit PCR au cycle n et  $N_0$  la quantité initiale de séquence cible. Cependant, l'efficacité de l'amplification est souvent inférieure à 100 % et tend à diminuer au long de l'amplification. Cette diminution est due à la compétition entre l'hybridation des amorces et la renaturation des produits d'amplification entre eux. Elle est également due à la baisse de la concentration en réactifs et à l'inhibition de la polymérase par des produits de la réaction. Dans la PCR en temps réel, on se base sur les mesures de concentrations en amplicon effectuées en phase exponentielle d'amplification. Par conséquent, la quantification n'est pas affectée par l'épuisement d'un des réactifs comme dans la phase plateau ce qui explique pourquoi le système en temps réel est si reproductible. En pratique, les valeurs de fluorescences sont enregistrées au cours de chaque cycle et représentent la quantité d'amplicons produits en un point précis dans la réaction. C'est le concept du « cycle seuil » (noté Ct « Threshold cycle »). Plus il y a de matrices (template) à amplifier au départ de la réaction PCR, moins sera élevé le nombre de cycle requis pour atteindre un point où le signal d'émission de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond (Poitras et Houde, 2002). La valeur de l'efficacité (E) est déterminée à l'aide d'un étalonnage avec une quantité connue de séquence cible, en utilisant la formule suivante :  $E = 10^{-1/p}$ , où p représente la pente de la droite reliant Ct au logarithme de la concentration en séquence cible.

#### I. 5. 2. 2. 4. La technologie de détection

Cette technologie est basée sur la détection et la quantification d'une sonde fluorescente spécifique du fragment à amplifier (TaqMan<sup>®</sup>) ou d'un agent intercalant et fluorescent, le SYBR<sup>®</sup>Green. L'intensité de fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. Durant l'étape d'élongation, une augmentation de la fluorescence est associée à la quantité de colorant se fixant à l'ADN double brin naissant. (Figure 5). Lorsque le suivi est réalisé en temps réel, l'augmentation du signal est observée pendant l'étape de polymérisation et l'émission fluorescente décroît complètement lorsque l'ADN est dénaturé à l'étape suivante. L'émission de fluorescence est alors mesurée à la fin de chaque étape d'élongation pour chacun des cycles par un système de lecture intégré à l'appareil de PCR en temps réel. Ceci permet de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié durant la réaction (Bustin, 2000). Etant donné que le SYBR Green se fixe à n'importe quelle molécule d'ADN double brin, c'est donc un agent intercalant sensible qui permet de détecter plus d'un produit d'amplification dans la même séquence réactionnelle (Poitras et Houde, 2002). En fin de PCR, on réalise en général une courbe de fusion du produit d'amplification, ce qui permet de mettre en évidence la présence d'amplicons non spécifiques, car ces derniers ont souvent une température de fusion différente de celle du produit spécifique. C'est le cas, en particulier, des amplicons résultant de l'hybridation d'amorces entre elles (dimères d'amorces).

**Figure 5:** Principe d'amplification par PCR en temps réel



#### I. 5. 2. 2. 5. Les stratégies de quantifications

Pour la quantification des copies d'ADNc par RT-PCRq, deux approches sont majoritairement utilisées. Le niveau d'expression d'un gène peut être mesuré de manière relative, ou absolue. La quantification absolue est réalisée grâce à l'établissement d'une courbe de calibration. La quantification relative est plus simple à mettre en oeuvre car elle ne demande aucune courbe de calibration. Cette méthode est basée sur la mesure de l'expression du gène cible comparée à celle d'un gène exprimé de manière constitutive (gène référence ou gène de contrôle).

#### I. 5. 2. 2. 6. La quantification relative

La quantification relative permet de visualiser les variations d'expression d'un gène. Le principe de cette méthode, repose sur la mesure de l'expression du gène cible et sur la mesure de l'expression d'un gène de référence (étalon interne). Le gène de référence, est un gène exprimé de manière constitutive ; il n'est donc soumis à aucune régulation. Par conséquent, le taux de transcrit de ce gène de référence est théoriquement semblable dans l'ensemble des cellules. La mesure de l'expression du gène est comparée à celle du gène de référence. Plusieurs types de modèles mathématiques ont été développés afin d'établir les ratio (gène cible/gène de référence). Les données obtenues peuvent être traitées par des logiciels développés par des industriels tel que le logiciel *Q-gene* et *Light Cycler Relative Quantification*.

La quantification relative permet de comparer la transcription basale d'un gène au travers de plusieurs échantillons traités par de multiples PCR avec le contrôle interne en ARN. Ainsi, les variations d'expression du gène cible sont visualisées par les variations du ratio.

La quantification relative semble être la méthode la plus appropriée pour évaluer les modifications transcriptionnelles liées aux variations environnementales. L'état physiologique de la cellule peut ainsi être évalué. Cette méthode de quantification est très utilisée en biologie cellulaire pour évaluer la réponse cellulaire à différents stimuli (ex : molécules médicamenteuses, action de cytokine). Ainsi, pour chaque type cellulaire et tissulaire étudié, le choix de l'étalon interne est primordial pour une évaluation correcte de l'expression génique.

#### I. 5. 2. 2. 6. 1. Standardisation via des gènes de référence interne

Cette méthode de standardisation est la plus simple à mettre en place et la plus largement utilisée. Cette stratégie de quantification d'ARN cible la mesure d'un gène de référence exprimé de manière constitutive. Ce gène de référence subit toutes les étapes d'extraction et de transcription inverse qui sont les étapes les moins reproductibles. L'avantage de l'utilisation de gènes de référence permet le contrôle de l'ensemble des étapes de la technique de RT-PCR quantitative en temps réel. De plus, l'action des inhibiteurs issus de l'extraction agit sur les enzymes de la transcription inverse et de l'amplification de manière comparable, que ce soit pour les transcrits cibles ou étalon.

Les gènes de référence les plus utilisés sont les gènes codant pour la  $\beta$ -actine, le glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), l'hypoxanthineguanidine phosphoribosyl transférase (HPRT) et l'ARNr18S. Ils servent de référence depuis plusieurs années dans les Northern Blot et les RT-PCR conventionnelles.

Leur utilisation a été validée pour les techniques qualitatives et semi-quantitatives. Ces gènes sont exprimés à un niveau relativement élevé dans la cellule ; ils servent donc de contrôle positif idéal. Cependant les avancées en PCR quantitative en temps réel ont mis l'accent sur les variations de ces gènes de contrôle (Radonic et coll., 2004 ; Schmittgen et Zakrajsek, 2000 ; Theis et coll., 2007).

#### I. 5. 2. 2. 6. 2. Standardisation via un ARN référant interne exogène.

Cette méthode de standardisation peut être une stratégie alternative pour les méthodes utilisant un contrôle interne. Le principe de la méthode consiste en l'incorporation dans l'échantillon d'une molécule artificielle de référence. Cette dernière peut être clonée et transcrite *in vitro* par une autre espèce ou générée de manière synthétique. C'est lors de l'étape d'extraction que cette molécule est ajoutée en concentration connue dans l'échantillon. Elle subit donc toutes les étapes d'analyse ; ainsi tous les facteurs expérimentaux sont comparables à ceux subis par les ARN d'intérêt. Par conséquent, les résultats ne souffrent pas des erreurs inhérentes engendrées par les fluctuations biologiques pouvant affecter les gènes de référence. Cependant, du fait que ces molécules artificielles ne sont pas extraites des cellules de l'échantillon, les artefacts liés à l'extraction ne peuvent pas être supprimés.

L'utilisation d'un étalon interne exogène représente un potentiel important pour les méthodes de normalisation. Néanmoins, ces standards exogènes ne sont pas encore commercialisés et la normalisation via cette technique n'est pas encore validée.



### I. 5. 2. 2. 7. La quantification absolue.

La quantification absolue implique l'utilisation d'une courbe de calibration. Cette courbe de calibration étant hautement reproductible, elle permet de quantifier de manière très sensible des amplifiats ultra spécifiques. L'utilisation de calibration externe lors de la quantification absolue a été validée comme étant la méthode la plus précise. Cependant, la précision de la technique dépend du choix de la référence externe. Cette référence constituée de molécule d'ADN de concentration connue, peut provenir de plasmides recombinants ou d'ADN génomique. L'utilisation d'étalons à base d'ADN pose un problème du fait qu'ils subissent uniquement l'étape de PCR, sans passer par la transcription inverse. Cette étape de transcription inverse est une source potentielle de variabilité de résultats obtenus. De plus, la quantification avec un standard externe requiert une attention particulière pour une optimisation et une précision maximale. Pour cela, une duplication des échantillons dans la même PCR est indispensable afin de visualiser les variations intra-essai. Les variations inter-essais sont testées via des duplicats placés dans deux PCR séparées.

### I. 5. 2. 3. Puce à ADN

#### I. 5. 2. 3. 1. Introduction

Loin de correspondre à une technique unique, les puces à ADN regroupent un ensemble très divers de méthodes et de technologies. Suite logique aux méthodes de *northern blotting* (Alwine et coll., 1977) et d'expression différentielle (Liang et Pardee, 1992), les premières puces à ADN sont apparues en 1993 en se basant sur le principe développé par Southern (Southern, 1974). Ce principe stipule que deux fragments d'acides nucléiques complémentaires peuvent s'associer et se dissocier de façon réversible sous l'action de la chaleur et de la concentration saline du milieu. Il s'agit simplement d'une miniaturisation du système classique de reverse dot blot (où la sonde est fixe alors que la cible marquée est en solution) (Lennon et Lehrach, 1991) qui a vu le jour grâce à une technologie pluridisciplinaire intégrant l'électronique (techniques de dépôt), la chimie (préparation des lames et greffes des sondes oligonucléotidiques ou synthèse *in situ*), l'analyse d'images (acquisition des données) et l'informatique (interprétation des données).

Historiquement, les *macroarrays*, les *microarrays* et les « véritables » puces à ADN, correspondent à des méthodes différentes d'analyse (Lagoda et Regad, 2000). Les *macroarrays* utilisaient des clones d'ADN complémentaires (ADNc) disposés sur des membranes de nylon (avec un espacement de l'ordre du millimètre) en association avec des

cibles radioactives. Les *microarrays*, plus miniaturisés, comportent quelques milliers de gènes représentés par des produits PCR déposés tous les 200 à 400 microns sur une lame de verre et des cibles marquées par fluorescence. Enfin les véritables puces à ADN associent à chacun des gènes d'un organisme un ensemble d'oligonucléotides synthétisés *in situ*.

La première de ces puces à ADN s'appelle la « *Gene Chip™ HIV PRT* ». Commercialisée en 1998 par *Affymetrix* (Santa Clara, CA, USA), elle a été conçue pour l'analyse des mutations de la transcriptase inverse et de la protéase du virus HIV (Hinfray, 1997). La même année a vu le développement de la première puce à oligonucléotides dédiée à une bactérie : elle était composée d'un sous-ensemble de cent gènes de *Streptococcus pneumoniae* (Saizieu et coll., 1998). Aujourd'hui, ces trois distinctions n'ont plus vraiment lieu d'être, du fait que ces techniques sont utilisées de façon croisée, comme l'exemple des puces à ADN utilisant des produits PCR et des cibles radioactives. Les terminologies « puce à ADN » et « microarray » sont donc employées de façon indifférente.

#### I. 5. 2. 3. 2. Principe des puces à ADN

L'idée conceptuelle des puces à ADN est simple. Il s'agit de greffer sur une surface de quelques centimètres carrés des fragments synthétiques d'ADN (les sondes) espacées de quelques micromètres et représentatifs de chacun des gènes étudiés. Ce micro dispositif est ensuite mis en contact des acides nucléiques à analyser (les cibles), au cours de l'étape d'hybridation. Ces acides nucléiques, correspondent aux ARNm ou aux ADNc qui ont été préalablement couplés à un marqueur fluorescent ou radioactif. Ce contact entre cibles et sondes, conduit à la formation d'hybrides qualifiés par leurs coordonnées, et quantifié grâce à la lecture des signaux radioactifs ou fluorescents.

L'analyse du transcriptome nécessite de mesurer les niveaux d'expression de gènes. Cette mesure est basée sur la détermination des variations de niveaux d'expression d'un organisme dans deux conditions différentes. Il s'agit donc d'une mesure différentielle de l'expression des gènes. En pratique, pour réaliser cette mesure, les cibles constituant deux échantillons d'étude sont marquées au moyen de deux fluorochromes différents. Elles sont ensuite mélangées puis hybridées sur la puce. Après hybridation, la mesure de l'intensité des signaux de fluorescence pour chacun des fluorochromes permet finalement de calculer pour chaque gène le rapport des intensités, ce qui évalue son expression différentielle. Notons que les cibles marquées avec deux fluorochromes différents ne sont pas en compétition pour ce lier sur une même sonde, car les sondes sont toujours en excès par rapport à la quantité de

cibles qui est déposée. Une étude expérimentale montre que l'intensité du signal obtenu par un fluorochrome n'est pas affectée par la présence d'une cible marquée avec l'autre fluorochrome (Hoen et coll., 2004). Cette étude valide donc la possibilité de travailler sur les signaux aussi bien que sur les rapports des intensités et autorise la comparaison d'échantillons qui ne sont pas hybridés sur une même lame.

#### I. 5. 2. 3. 3. Conception des puces à ADN

De nombreuses possibilités de conception de puce à ADN existent (Freeman et coll., 2000). La fabrication de la lame sur laquelle sont déposées les sondes combine divers problèmes. Les problèmes chimiques d'une part, dus aux traitements de surface de la lame ainsi que la fixation des sondes. D'autre part, des dysfonctionnements d'origine mécanique concernant le dépôt des sondes sur la lame par un robot. Ces différentes étapes peuvent conduire à des irrégularités spatiales sur la lame qu'il est nécessaire de rechercher afin d'éliminer les données correspondantes lors de l'analyse.

#### I. 5. 2. 3. 4. Les sondes

Les sondes greffées ou synthétisées peuvent être de différentes tailles en fonction de la problématique biologique, des contraintes expérimentales et des moyens disponibles. La détermination de leur séquence nécessite une analyse bioinformatique de façon à optimiser à la fois les paramètres de spécificité des sondes et des paramètres thermodynamique de stabilité de l'hybride formé.

L'analyse du transcriptome est basée sur l'utilisation de deux types de sondes. Les premières sont des fragments d'ADNc entiers issus d'une amplification par PCR, dont la taille des fragments peut varier entre 100 et 500 pb. Ces sondes offrent une sensibilité maximale, mais possèdent une spécificité faible. Les secondes sont des sondes d'oligonucléotides dont la taille varie entre 30 et 70 pb. Ces derniers, allient à la fois des qualités de spécificité et de sensibilité.

### I. 5. 2. 3. 5. Hybridation des puces à ADN

#### I. 5. 2. 3. 5. 1. Préparation du matériel biologique

La préparation des échantillons est une étape critique qui ne doit pas être sous estimée. Le choix de protocoles complexes effectués au cours de cette étape, est responsable d'une variabilité à la fois biologique et expérimentale devant être pris en compte.

Le matériel biologique est, la plupart du temps, hétérogène et peut contenir des cellules dans des états physiologiques variables. Cependant, il est indispensable de travailler sur une population de cellules, du fait de la variabilité des réponses individuelles des différentes cellules (Blake et coll., 2003). L'idéal serait de prélever des cellules homogènes et synchronisées, ce qui n'est pas souvent le cas.

Par ailleurs, afin d'optimiser les hybridations sur puce à ADN, il est nécessaire d'avoir une quantité minimale de transcrits. Toutefois, il est souvent difficile d'obtenir une quantité suffisante de matériel biologique selon le modèle d'étude. Par exemple, lorsque les cellules prélevées ne sont pas dans leurs conditions de croissance les plus favorables, la concentration en cellules est faible ce qui ne facilite pas l'extraction d'ARN.

Les conditions d'extraction des ARN sont très critiques. En effet, l'ARNm est relativement instable et les demi-vies des différents transcrits d'une cellule eucaryote se révèlent extrêmement variables. Les profils d'expression obtenus ne représentent donc qu'une moyenne des niveaux d'expression. Malgré l'utilisation d'un protocole d'extraction standardisée et reproductible, il existe toujours une part de variabilité expérimentale qui doit être prise en compte lors de l'analyse.

#### I. 5. 2. 3. 5. 2. Marquage

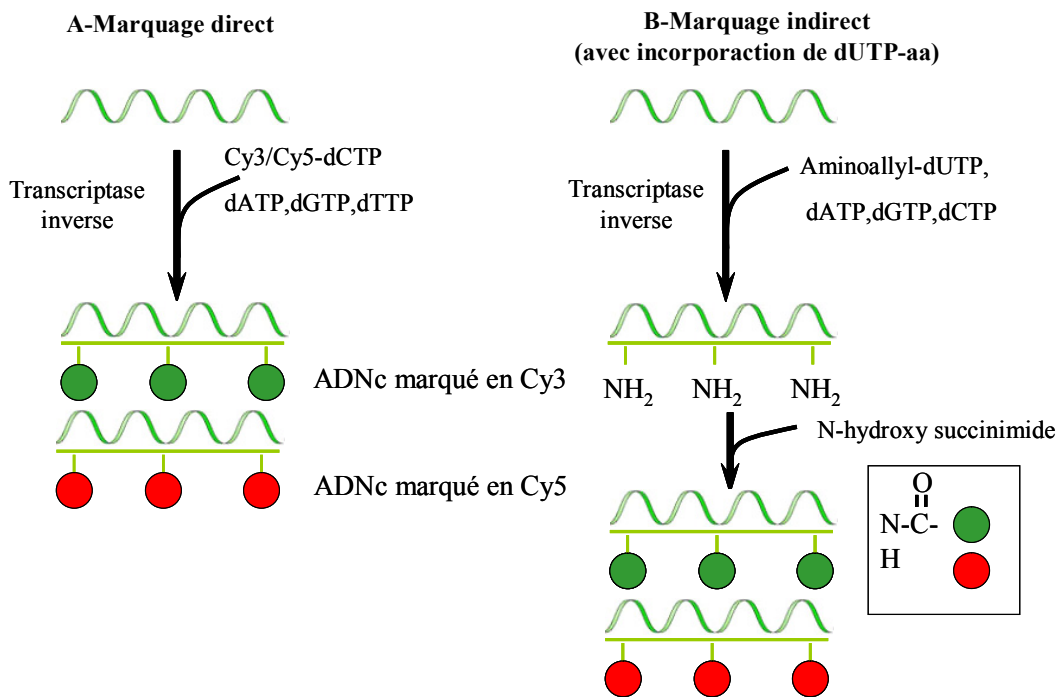
Le marquage des cibles met en jeu des protocoles divers en fonction des caractéristiques de l'organisme étudié. Les protocoles courant de marquage des ARN issus d'eucaryotes consiste à utiliser la séquence poly-A présente à l'extrémité 3' des ARNm pour ancrer une amorce spécifique poly-T permettant la synthèse des ADNc marqués par une transcriptase inverse. Chez les procaryotes, des amorces aléatoires sont utilisées du fait de la courte durée de vie de la séquence poly-A sur de nombreux ARNm, qui intervient comme un signal de dégradation de la molécule (Gingeras et Rosenow, 2000).

Le marquage est effectué par incorporation d'une molécule radioactive ou fluorescente. Les cyanines fluorescentes Cy 3 (vert) et Cy 5 (rouge), sont le plus souvent utilisées car elles possèdent un haut niveau d'émission photonique sous forme d'un pic étroit qui assure une

meilleure sensibilité et résistent à la décoloration. Cependant la Cy 5 est parfois à l'origine d'un bruit de fond élevé sur les surfaces de verre et semble plus sensible à la décoloration que la Cy 3 (van Hal et coll., 2000).

L'étape de marquage peut avoir lieu directement lors de la synthèse de l'ADNc par incorporation de nucléotides couplés aux fluorochromes, il s'agit d'un marquage direct (Figure 6A). Par opposition, le marquage indirect se déroule en deux étapes (Figure 6B). La première consiste à incorporer des nucléotides modifiés (aminoallyl-dUTP) dans les ADNc synthétisé, qui seront, lors d'une deuxième étape, mis en contact avec les molécules fluorescentes (Figure 6).

**Figure 6 :** Description des protocoles de marquage direct (à gauche) et indirect (à droite) pour l'incorporation des fluorochromes Cy3 et Cy5.



### I. 5. 2. 3. 5. 3. Hybridation

La phase d'hybridation est réalisée dans un incubateur durant toute la nuit. Elle n'aboutit à la formation d'hybrides que pour 0,1 à 1 % des sondes marquées (Granjeaud et coll., 1999). Elle est suivie d'une étape de lavage destinée à éliminer de la surface de la puce les cibles non hybridées. Cette étape doit être également optimisée afin d'obtenir le meilleur rapport possible entre le signal et le bruit de fond. Des comportements d'hybridations différents peuvent être observés pour les différentes sondes d'un même gène. De nombreux facteurs sont à l'origine de ces variations, comme le taux de GC, la structure des acides

nucléiques ou encore la localisation de la sonde sur la séquence du gène (Barczak et coll., 2003). Certains paramètres sont importants pour l'hybridation tel que le choix de la température d'hybridation (Religio et coll., 2002). En solution, cette température dépend de la température de fusion ( $T_m$ ) de l'hybride formé entre une cible et sa sonde, c'est-à-dire de la température à laquelle la moitié des acides nucléiques est sous forme de double brin.

#### I. 5. 2. 3. 5. 4. Acquisition des données

Après hybridation, une étape de lecture de la puce permet de repérer les sondes ayant réagi avec l'échantillon testé. La qualité de lecture conditionne de façon majeure la précision des données, et donc la pertinence des interprétations (Yang et coll., 2002). L'obtention de l'image se fait lorsque la fluorescence émise à la surface de la lame est détectée après excitation des fluorophores. Le procédé de détection le plus classiquement utilisé combine un laser, pour exciter les fluorophores, et un microscope confocal (ou scanner) couplé à un tube photomultiplicateur (PMT) pour analyser les photons émis par les marqueurs (Schena, 1999). Les canaux de lecture correspondant aux longueurs d'ondes 635 nm et 532 nm sont utilisés pour lire respectivement la fluorescence du Cy 5 et celle du Cy 3. Le signal pour chaque fluorochrome est mesuré par la somme des intensités des pixels du spot. Cette somme représente la quantité totale des cibles hybridées sur les sondes (Dudoit et coll., 2002).

#### I. 5. 3. Approche protéomique

Le protéome représente la totalité des « protéines exprimées par le génome » d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme (Pennington et coll., 1997). La méthode utilisée pour déterminer le protéome est connue sous le nom de protéomique (Yarmush et Jayaraman, 2002). Développée, en 1975, par O'Farrell, l'électrophorèse bidimensionnelle est aujourd'hui la méthode la plus souvent utilisée pour la caractérisation du protéome cellulaire (Chich, 2001). L'approche la plus courante dans le cadre de l'étude de l'état physiologique des cellules, consiste à établir le protéome de référence du micro-organisme pour, ensuite, analyser de façon différentielle les changements consécutifs aux altérations environnementales par rapport à la condition de référence. Elle consiste, dans un premier temps, à extraire et à purifier les protéines afin d'obtenir une mixture complexe contenant les protéines présentes dans le micro-organisme à un moment précis. Dans un deuxième temps, les protéines sont séparées par électrophorèse bidimensionnelle en fonction de leur point isoélectrique et de leur masse moléculaire. Cette séparation génère une carte où les protéines sont distribuées dans l'espace

selon leur point isoélectrique et leur poids moléculaire. Certaines protéines ne se solubilisent pas facilement, ce qui rend leur séparation imparfaite. Les protéines de haut (>200kDa) ou faible (<10kDa) poids moléculaire ne sont pas toujours séparées correctement (Yarmush et Jayaraman, 2002). De plus, la lourdeur, la durée et le coût des analyses sont des facteurs restrictifs pour une application plus ample de cette méthode. Une fois la carte protéomique du micro-organisme réalisée, elle est alors analysée grâce à des logiciels d'analyse d'images. L'étape suivante comprend la caractérisation et l'identification de chaque protéine individuellement. A cet effet, les protéines sont extraites du gel, hydrolysées et analysées par spectroscopie de masse (MALDI-TOF). La séquence de peptides obtenue est comparée avec les bases de données disponibles en vue de l'identification de la protéine. La qualité de l'identification est proportionnelle à la connaissance disponible sur le génome du microorganisme étudié. En ce qui concerne les levures, les souches séquencées de *S. cerevisiae* ou de *Candida albicans* ont permis la réalisation d'études comparative par 2-D gel en faisant varier la source de carbone et ou d'azote (Eisler et coll., 2004 ; Kusch et coll., 2008 ; Pham et Wright, 2008). La souche séquencée de *Y. lipolytica* E150 (Dujon et coll., 2004) a permis une première étude comparative par électrophorèse bidimensionnelle (2-D) de la levure (Morín et coll., 2007). De récentes études ont combiné à la fois les résultats du protéome avec le transcriptome (Herve-Jimenez et coll., 2009 ; Herve-Jimenez et coll., 2008 ; Mader et coll., 2002). Mais il est indispensable de noter que l'abondance d'une protéine ne corrèle pas toujours avec l'expression du gène qui le code du fait des modifications post-traductionnel de l'ARNm (Anderson et Seilhamer, 1997 ; Gygi et coll., 1999).

## II. RESULTATS ET DISCUSSION

### II. 1. Mise au point de la méthode transcriptomique d'étude : La PCR quantitative en temps réel

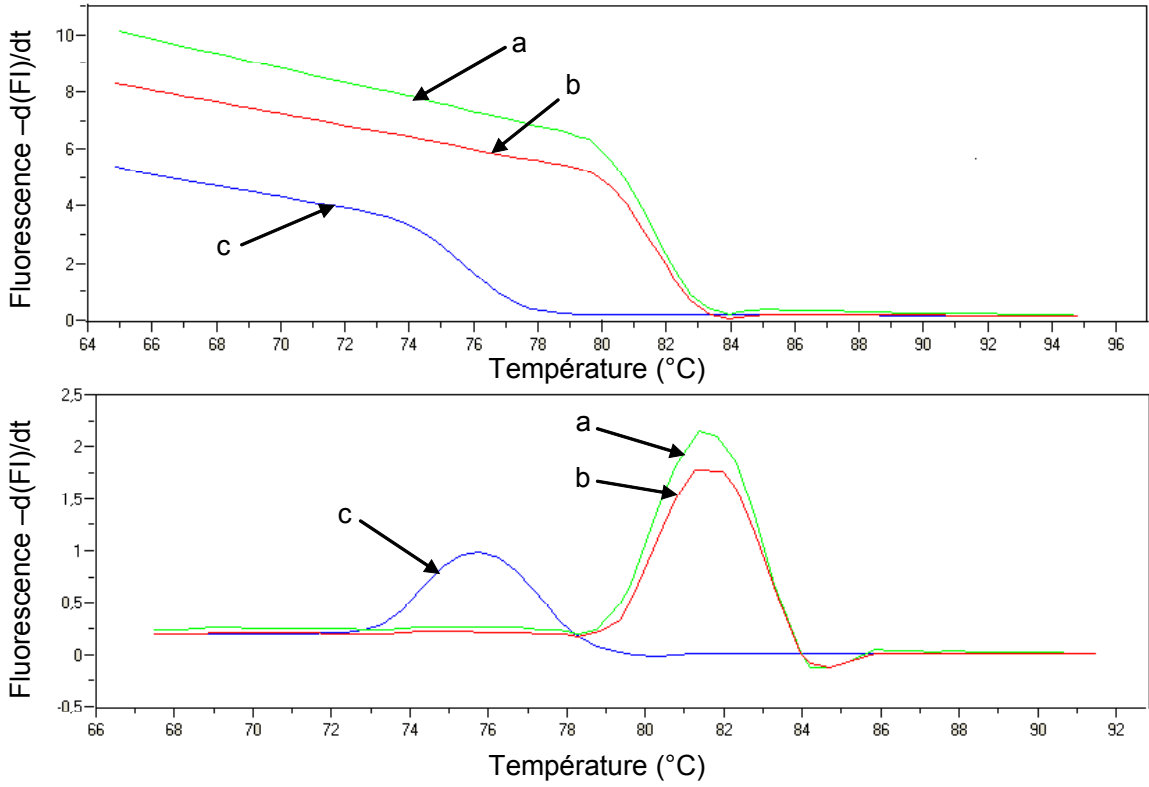
L'analyse transcriptomique des différentes voies métaboliques de la levure *Y. lipolytica* par PCR quantitative en temps réel, nécessite d'établir rigoureusement les conditions de quantification.

#### II. 1. 1. Spécificité des amorces

La qualité de mesure reposant sur la spécificité des amorces, celles-ci ont été choisies de manière à ce qu'elles ne forment pas de dimères artificiels. Les amorces de chaque gène sont validées à l'aide d'une gamme étalon d'ADN de l'espèce d'intérêt allant de 0,05 à 500 ng d'ADN. De plus, la spécificité du produit d'amplification par analyse de sa courbe de dissociation (ou « Melting curve »), a été analysée pour tous les gènes en fin de PCR. Cette analyse nous indique si seulement un ou plusieurs fragments d'ADN ont été amplifiés (Figure 7) Le gène *BAT2* codant pour l'aminotransférase a été amplifié par PCR quantitative à partir d'ARN extrait de trois conditions différentes (a, b, c) de culture de *Y. lipolytica*. L'allure de la « melting curve » obtenue pour les échantillons a et b indique que seul le gène de l'aminotransférase *BAT2* a été amplifié. L'allure de la « melting curve » et la température de dissociation du produit PCR du gène qui code pour l'aminotransférase sont différentes pour l'échantillon c. Dans cet échantillon, un artefact de PCR dans lequel des dimères d'amorces ont été amplifiés à la place du gène cible, a été observé.



**Figure 7 :** Courbe de dissociation (Melting curve) du produit PCR de l'aminotransférase Bat2 chez *Y. lipolytica*.



La melting curve correspond à la dérivée de la fluorescence en fonction de la température.

## II. 1. 2. Quantification

Il existe deux méthodes de quantification par PCR quantitative : la quantification absolue et la quantification relative. La quantification absolue permet de déterminer le nombre de copies d'un gène cible dans une cellule par rapport à une gamme étalon. La quantification relative, quant à elle, permet de comparer l'expression d'un gène cible dans une condition donnée par rapport à son expression dans une condition témoin.

Dans le cadre de cette thèse, l'objectif était de comparer l'expression de gènes cibles – impliqués dans différents catabolismes tels que ceux du lactate et des acides aminés - en fonction i) d'une part de la nature et de la concentration des sources d'azote et de carbone, ii) d'autre part en fonction des différents micro-organismes mis en co-culture. Ainsi la méthode de quantification relative a-t-elle été choisie.

### II. 1. 2. 1. Mécanismes et modèles mathématiques de la quantification relative

Il existe deux méthodes de quantification: la quantification relative par rapport à une gamme étalon standard et la quantification relative comparative. Dans notre cas, nous avons choisi la méthode comparative qui ne nécessite pas de gamme étalon standard. Cette méthode consiste à normaliser la quantité de transcrits d'un gène cible par rapport à la quantité de transcrits d'un gène de référence et à comparer les niveaux d'expression du gène cible dans une condition donnée par rapport à une condition de référence. Cette méthode est couramment appelée : la méthode du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Bustin, 2002 ; Ginzinger, 2002 ; Livak et Schmittgen, 2001 ; Schmittgen et coll., 2000 ; Winer et coll., 1999).

Les valeurs de fluorescence enregistrées au cours de chaque cycle représentent la quantité d'amplicons générés au cours de la réaction (Figure 8). Après un certain nombre de cycles, cette courbe de production d'amplicons coupe la ligne de base (bruit de fond). Ce point d'intersection détermine le Ct (« Cycle threshold »), c'est-à-dire le nombre de cycles (seuil) qui marque le début de la phase exponentielle d'amplification.

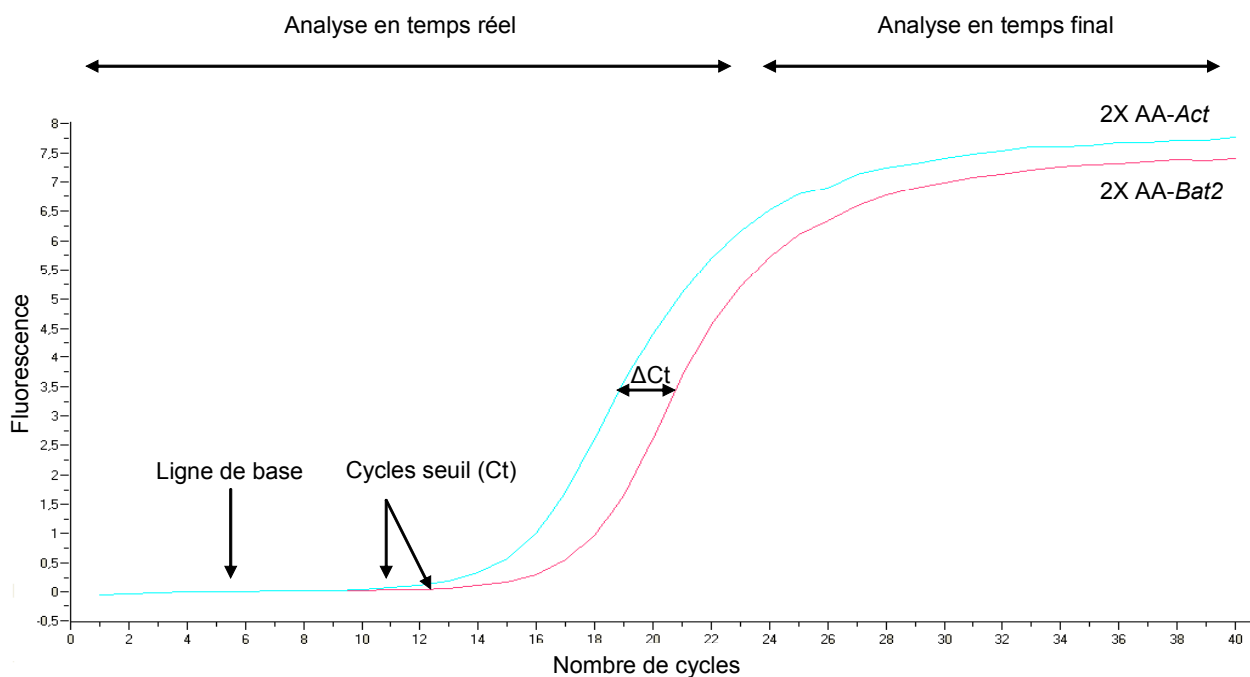
Le  $\Delta Ct$  entre le Ct du gène cible et le Ct du gène de référence (ex.  $\Delta Ct = Ct_{BAT2} - Ct_{Actine}$ ) représente la différence d'expression de ces deux gènes car le Ct est inversement proportionnel à la quantité de matrice de départ (nombre de copies d'ADNc obtenues à partir des ARNm). La différence du nombre de cycles est une puissance de 2 (du fait du mécanisme de doublement de la quantité d'ADN à chaque cycle). Ainsi, un  $\Delta Ct$  de 3 entre deux gènes signifie une expression 8 fois ( $2^3$ ) plus forte. Cependant, il ne faut jamais utiliser des valeurs

de Ct supérieures à 40 pour cause de non proportionnalité de la réaction et aussi de la fréquence importante d'artefacts.

Enfin, le  $\Delta\Delta Ct$  permet de comparer l'expression d'un même gène cible dans différentes conditions de culture ou différentes association de micro-organisme (ex.  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{BAT2}$  avant ajout d'acides aminés –  $\Delta Ct_{BAT2}$  après ajout d'acides aminés).

**Figure 8** : Cinétique de l'amplification par PCR quantitative de l'aminotransférase (2X acides aminés-BAT2) et de l'actine (2X acides aminés -Act) chez *Y. lipolytica*.

Pour chaque gène on détermine un cycle seuil (Ct) qui représente le nombre de cycle requis pour lequel le signal de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que la ligne de base. Le  $\Delta Ct$  consiste à déterminer la quantité normalisée de transcrits du gène cible (2X AA-Bat2) par rapport à la quantité de transcrits du gène de référence (2X AA-Act).



## II. 1. 3. Conditions requises

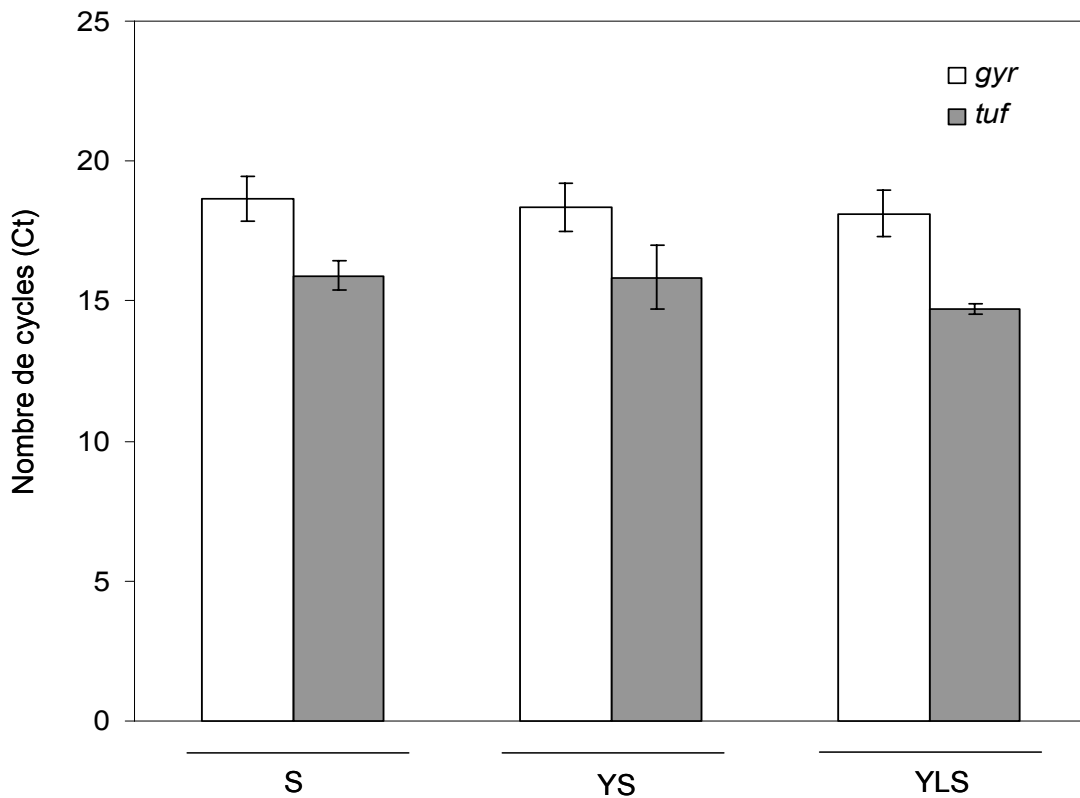
### II. 1. 3. 1. Sélection et validation du gène de référence

En PCR quantitative, le choix du gène de référence est primordial (Radonic et coll., 2004 ; Schmittgen et Zakrajsek, 2000 ; Vandesompele et coll., 2002 ; Volkov et coll., 2003). Les différentes études effectuées sur la levure *Y. lipolytica* ont nécessité le choix d'un gène de référence. Pour cela, le gène codant pour l'actine a été choisi comme témoin interne afin de calibrer l'expression des gènes d'intérêt (Blanchin-Roland et coll., 2005). En effet, l'expression de l'actine est constante chez la levure et n'est pas influencée par les sources de carbone et/ou d'azote.

Dans le cas des parties 4 et 5 concernant l'étude de l'interaction de *Y. lipolytica* en co-culture avec *Staphylococcus xylosus* et *Lactococcus lactis*, le gène codant pour l'actine a aussi été sélectionné pour la levure (Blanchin-Roland et coll., 2005). Pour *Staphylococcus xylosus*, deux gènes de ménages ont été testés *gyr* et *tuf* codant respectivement pour la gyrase et le facteur d'élongation de la traduction. Le gène *gyr* a été sélectionné (Figure 9) du fait de la faible variation de son Ct entre les différentes conditions de culture. Dans le cas de *Lactococcus lactis*, trois gènes de ménages ont été testés : *gyrA*, *CysK* et *purM* codant respectivement pour la gyrase, la cysteine synthase A et 5'-phosphoribosyl-5-aminoimidazole synthase. Le gène *purM* a finalement été retenu (Figure 10) comme gène de référence.

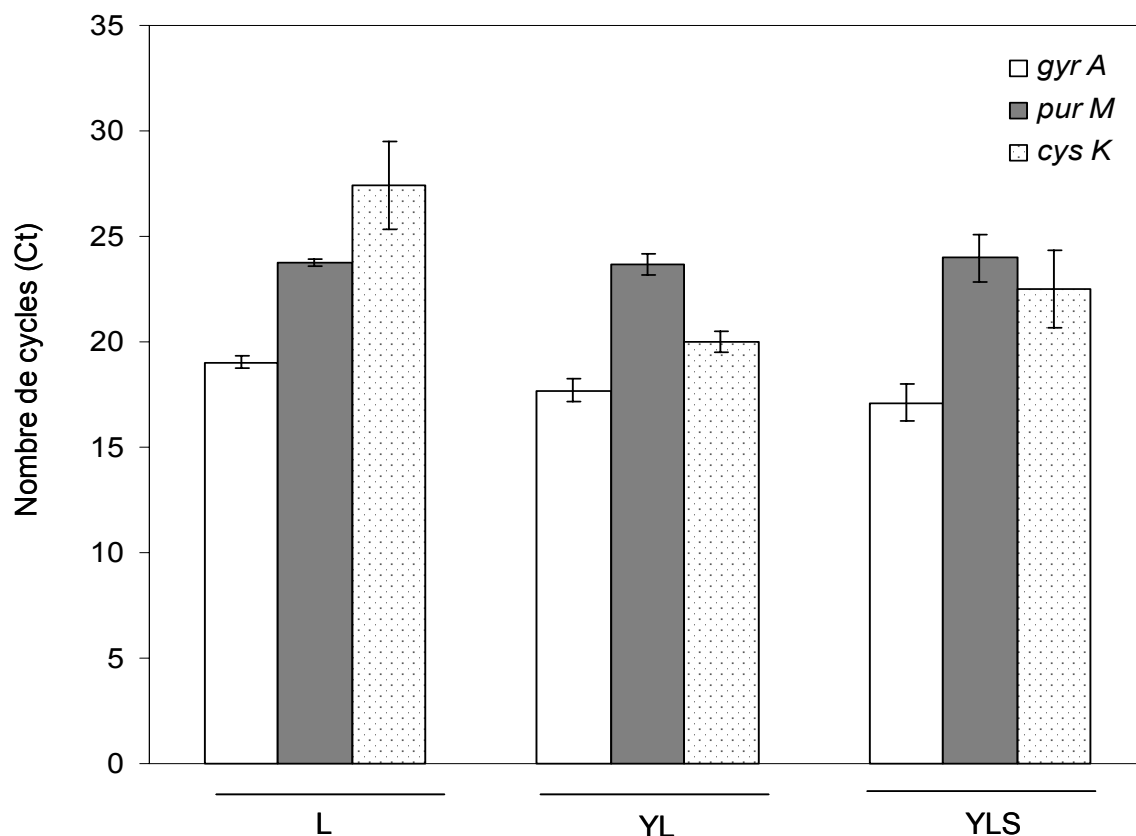
**Figure 9 :** Choix du gène de référence de *S. xylosus* C2a.

Les histogrammes représentent l'amplification des différents gènes de ménages par RT-PCR quantitative dans différentes conditions de cultures. S : Culture pure de *S. xylosus* C2a, YS : Co-culture de *S. xylosus* C2a et de *Y. lipolytica* 1E07, YLS : Co-culture de *S. xylosus* C2a, *L. lactis* LD61 et *Y. lipolytica* 1E07.



**Figure 10** : Choix du gène de référence de *Lactococcus Lactis* LD61.

Les histogrammes représentent l'amplification des différents gènes de ménages par RT-PCR quantitative dans différentes conditions de cultures. L : Culture pure de *L. lactis* LD61, YL : Co-culture de *L. lactis* LD61 et *Y. lipolytica* 1E07 ; YLS : Co-culture de *L. lactis* LD61, *Y. lipolytica* 1E07 et *S. xylosus* C2a.



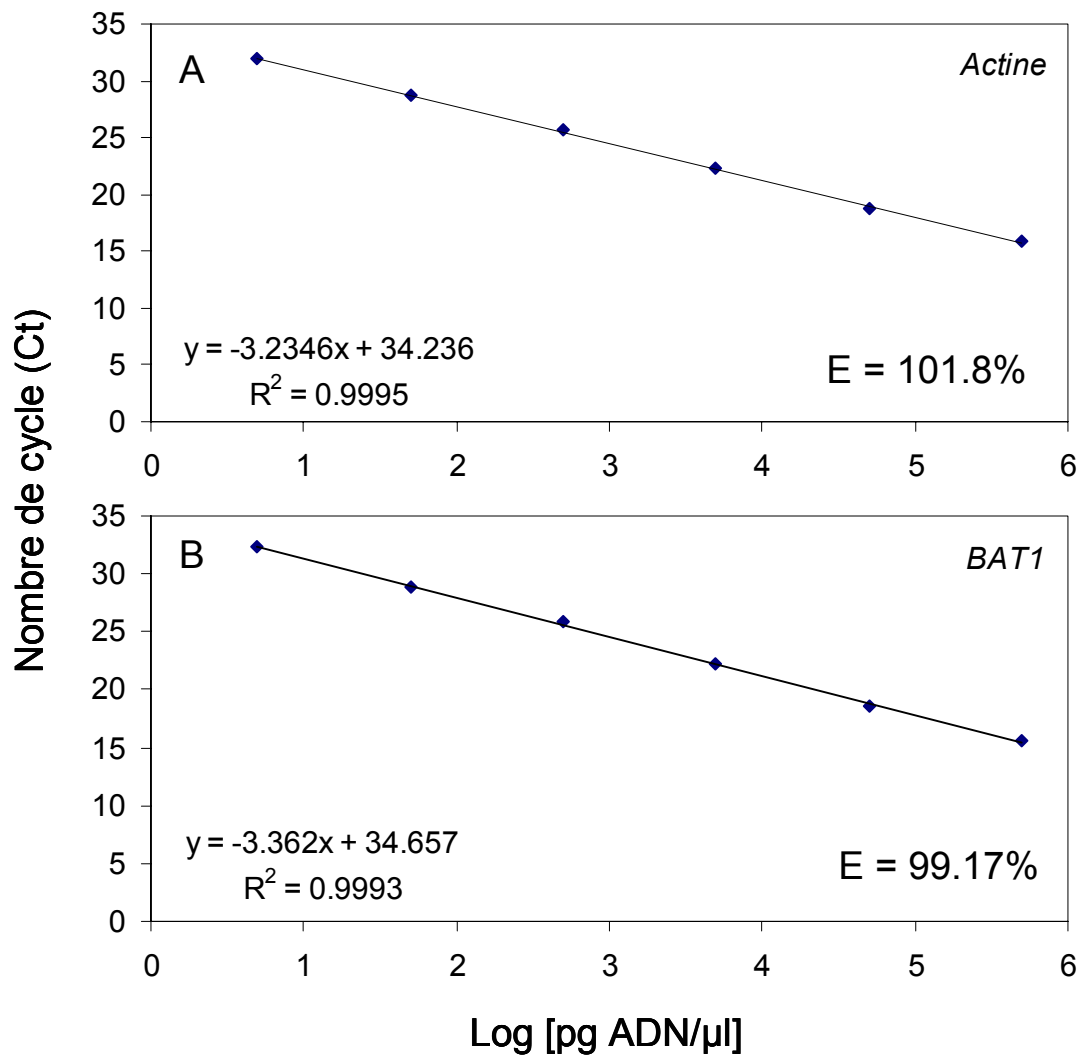
### II. 1. 3. 2. Efficacité de la PCR des gènes cibles et de celle des gènes de référence

Afin de pouvoir utiliser la méthode du  $\Delta\Delta C_t$ , la similarité de l'efficacité de la PCR du gène cible et du gène de référence a été vérifiée. Une méthode simple consiste à construire la droite de régression  $C_t$  du gène cible et du gène de référence en fonction du  $\log_{10}$  de la concentration d'ADNc (Figure 11). Le calcul de l'efficacité de la PCR se fait à l'aide de l'équation  $E=10^{[-1/\text{pente}]}$  (Bustin, 2004). Si l'efficacité du gène cible et du gène de référence est égale à 100 %, la méthode du  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  est alors applicable. Des gammes étalons ont été construites pour chaque gène.

Cette méthode du  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  a été utilisée pour comparer les niveaux d'expression d'un même gène cible dans différentes conditions de cultures. Le logiciel REST 2008 (V2.0.7) permettant l'analyse de la variance, a été utilisé pour comparer les valeurs de  $\Delta C_t$ . Les résultats ont été considérés comme significativement différents au seuil  $p < 0,05$ .

**Figure 11** : Etalonnage obtenu lors de l'amplification par PCR en temps réel de l'ADN génomique de *Y. lipolytica* 1E07.

La gamme de dilution de l'ADN se fait de 10 en 10. Les droites de régression du gène de référence, (A : *Actine*) et du gène cible (B : *BAT1*) ont été réalisées. L'efficacité (E) de la PCR a été calculée pour chaque gène.



## II. 2. Etude du catabolisme du lactate et des acides aminés chez la levure d'affinage *Yarrowia lipolytica*

### II. 2. 1. Etudes microbiologiques, biochimiques et transcriptomiques

#### II. 2. 1. 1. Résumé

*Yarrowia lipolytica* est une levure ubiquitaire retrouvée dans la majorité des fromages. Elle fait ainsi naturellement partie de la flore de surface de nombreux fromages.[1-3]. Afin de mieux comprendre son rôle et sa capacité d'adaptation dans l'affinage du fromage, il est important d'étudier son implication dans le catabolisme du lactate et des acides aminés. La disponibilité et la consommation de ces principaux substrats sont à l'origine du développement des micro-organismes ainsi que de la production d'arômes.

Afin d'étudier ces catabolismes, une souche de *Y. lipolytica* 1E07 isolée du Livarot a été sélectionnée. Dans le but de s'affranchir des complications (ex : extraction de l'ARN) de l'approche transcriptomique se faisant directement à partir de fromage (milieu solide, matière grasse), un milieu liquide de culture chimiquement défini (MCD) a été dans un premier temps choisi. Par rapport au milieu standard, deux concentrations d'acides aminés ont été utilisées : 0,1X AA (faible concentration) et 2X AA (forte concentration) en présence ou non de lactate.

Les résultats microbiologiques mettent en évidence une croissance plus importante de la levure dans un milieu contenant une forte concentration en acide aminé indépendamment de la présence ou non de lactate. Les analyses biochimiques montrent que les acides aminés sont préférentiellement consommés par la levure, le lactate étant utilisé uniquement après consommation totale des acides aminés.

Avec pour objectif de déterminer l'effet de l'ajout d'acides aminés sur l'expression de gènes (dans un milieu contenant uniquement du lactate comme source de carbone), quatre aminotransférases, *BAT1*, *BAT2*, *ARO8* et *ARO9* et un transporteur d'acides aminés, *GAP1*, ont été sélectionnés comme indicateurs du catabolisme d'acides aminés. De plus, trois gènes impliqués dans le catabolisme du lactate ont été choisis : un transporteur de lactate *JEN1* et deux lactate déshydrogénases, *CYB 2-1* et *CYB 2-2*. Les résultats de transcriptomique montrent le maximum d'induction de l'expression des gènes *ARO8*, *BAT1*, *BAT2* et *GAP1*, 15 à 30 min après l'ajout d'acides aminés, les gènes *JEN1*, *CYB 2-1* et *CYB 2-2* étant uniquement induit au bout de 60 min.



Les résultats microbiologiques, biochimiques et transcriptomiques confirment une réelle préférence de *Y. lipolytica* pour les acides aminés qui constituent la principale source de carbone et d'azote pour la levure.

II. 2. 1. 2. *Publication n°1* : “Lactate and amino acids catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica*”

**Accepté pour publication par le Journal : Applied and Environmental Microbiology**

## Lactate and Amino Acid Catabolism in the Cheese-Ripening Yeast *Yarrowia lipolytica*<sup>∇</sup>

S. Mansour,<sup>1</sup> J. M. Beckerich,<sup>2</sup> and P. Bonnarne<sup>1\*</sup>

Agro Paris Tech-INRA, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires,<sup>1</sup> and Agro Paris Tech-INRA, UMR1238 Microbiologie et Génétique Moléculaire,<sup>2</sup> 78850 Thiverval Grignon, France

Received 4 July 2008/Accepted 25 August 2008

The consumption of lactate and amino acids is very important for microbial development and/or aroma production during cheese ripening. A strain of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese was grown in a liquid medium containing lactate in the presence of a low (0.1×) or high (2×) concentration of amino acids. Our results show that there was a dramatic increase in the growth of *Y. lipolytica* in the medium containing a high amino acid concentration, but there was limited lactate consumption. Conversely, lactate was efficiently consumed in the medium containing a low concentration of amino acids after amino acid depletion was complete. These data suggest that the amino acids are used by *Y. lipolytica* as a main energy source, whereas lactate is consumed following amino acid depletion. Amino acid degradation was accompanied by ammonia production corresponding to a dramatic increase in the pH. The effect of adding amino acids to a *Y. lipolytica* culture grown on lactate was also investigated. Real-time quantitative PCR analyses were performed with specific primers for five genes involved in amino acid transport and catabolism, including an amino acid transporter gene (*GAPI*) and four aminotransferase genes (*ARO8*, *ARO9*, *BAT1*, and *BAT2*). The expression of three genes involved in lactate transport and catabolism was also studied. These genes included a lactate transporter gene (*JEN1*) and two lactate dehydrogenase genes (*CYB2-1* and *CYB2-2*). Our data showed that *GAPI*, *BAT2*, *BAT1*, and *ARO8* were maximally expressed after 15 to 30 min following addition of amino acids (*BAT2* was the most highly expressed gene), while the maximum expression of *JEN1*, *CYB2-1*, and *CYB2-2* was delayed (≥60 min).

Substrate supply and consumption are very important for microbial growth during cheese ripening. Cheese curd is a complex matrix containing carbon and/or nitrogen sources whose nature and availability play significant roles in the ripening process (15). Lactate, resulting from the conversion of lactose by lactic acid bacteria (LAB), and amino acids resulting from casein proteolysis are the main carbon and/or nitrogen sources necessary for microbial growth and aroma production (10, 21, 22).

Yeasts have an essential role in cheese curd deacidification, a prerequisite for the development of acid-sensitive bacteria on the cheese surface (1, 6, 14). The phenomena leading to deacidification still need to be investigated but are probably related to amino acid and/or lactate catabolism (1, 8). Microorganisms such as *Yarrowia lipolytica* that develop on the cheese surface constitute an adventitious microflora from the cheese environment (brine, ripening shelves, and personnel), and they rapidly outnumber the commercial cultures (16). *Y. lipolytica* is a ubiquitous, naturally developing yeast (6, 7) that comprises part of the surface flora. Its adventitious nature and its enzymatic activities make it a good candidate for ripening. Due to its efficient productivity, this yeast has been used for the preparation of cheese flavor compounds (5). *Y. lipolytica* produces many more volatile sulfur compounds (VSC) than conven-

tional cheese-ripening yeasts, such as *Debaryomyces hansenii* and *Kluveromyces lactis* (4, 5).

Amino acid catabolism has been studied in several cheese-ripening yeasts, including *Y. lipolytica*, *Geotrichum candidum*, *K. lactis*, and *D. hansenii*, with respect to VSC biosynthesis. The degradation of amino acids is initiated by an aminotransferase in which the amino group of an amino acid is transferred to an  $\alpha$ -keto acid (e.g.,  $\alpha$ -ketoglutarate), resulting in the formation of the corresponding amino acid (e.g., glutamate) and keto acids, which are subsequently degraded to flavor compounds (21, 22). It has been found that in *Y. lipolytica* L-methionine degradation via transamination, by a branched-chain aminotransferase (*BAT1*), is involved in VSC formation (4). In *Saccharomyces cerevisiae*, *ARO8* expression is subject to general amino acid biosynthesis control. *ARO9* expression is induced when aromatic amino acids are present in the growth medium and also in *ARO8* mutants grown on minimal ammonia medium (11).

Lactate catabolism by yeasts surely plays a central role during cheese ripening since it coincides with a dramatic increase in the pH at the cheese surface, as shown for *D. hansenii*, *K. lactis*, and *Kluveromyces marxianus* (1, 14). *D. hansenii* assimilates lactose and lactate, while *G. candidum* and *Y. lipolytica* assimilate lactate but not lactose (2). Enzymes and related degradation pathways involved in lactate catabolism by cheese-ripening yeasts have not been studied much. However, we hypothesized that lactate dehydrogenase-type enzymes are possible lactate catabolic enzymes. Nevertheless, the expression patterns of target genes related to L-methionine and lactate/lactose catabolism have been investigated in several cheese-ripening yeasts. The results revealed that *D. hansenii*

\* Corresponding author. Mailing address: Agro Paris Tech-INRA, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, 78850 Thiverval Grignon, France. Phone: 33 (0)1 30 81 53 88. Fax: 33 (0)1 30 81 55 97. E-mail: bonnarne@grignon.inra.fr.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 5 September 2008.

and *K. marxianus* were implicated mainly in lactose and lactate catabolism, whereas *Y. lipolytica* preferentially consumed L-methionine (5).

This study focused on the catabolism of lactate and amino acids by *Y. lipolytica*. The first part of this work was devoted to growth and obtaining biochemical data related to amino acid and/or lactate consumption by this yeast. In the second part, the expression patterns of several target genes involved in amino acid and lactate catabolism in *Y. lipolytica* were studied following addition of amino acids.

#### MATERIALS AND METHODS

**Yeast strain and storage conditions.** The microorganism used in this work was *Y. lipolytica* 1E07. This strain, originally isolated from Livarot French cheese, was obtained from the UMR-GMPA laboratory collection and was selected because of its biotechnological potential. The yeast was stored in 5% glycerol-nfat dry milk at  $-80^{\circ}\text{C}$  until it was used.

**Culture conditions.** The yeast was cultivated in a 500-ml flask containing 100 ml of medium, and a preculture was grown in potato dextrose broth (Difco Laboratories, Detroit, MI) for 1 day at  $25^{\circ}\text{C}$  with agitation (150 rpm). The potato dextrose broth was inoculated with 1 ml of a thawed stock suspension. The preculture served as the inoculum for the subsequent culture. A defined synthetic medium (SM), adapted from the medium described by Otto et al. (18), was used for all culture conditions. It contained 48 components, including lactate and lactose as principal carbon sources, 19 free amino acids, 14 vitamins, five metallic ions, and four nucleic acid bases (Table 1). The pH of the culture medium was adjusted to 6.7. Two amino acid concentrations were used ( $0.1\times$  and  $2\times$ ) in the presence and in the absence of lactate. The total amino acid concentrations found in a Camembert cheese ranged from 4 to  $50\text{ g kg}^{-1}$  (12), depending on the amino acid. These concentrations evolved during ripening. No data describing the evolution of free amino acids are available. We assumed that 0.01% (low amino acid concentration) to 10% (high amino acid concentration) of the total amino acids could be released following the microbial degradation of casein. A culture grown in the presence of lactate but without amino acids was also used. Cultures were incubated at  $25^{\circ}\text{C}$  and 150 rpm for either 42 or 56 h. The SM was selected because it contained substrates that allowed us to study lactate and amino acid catabolism. The concentration of lactate and lactose used was chosen because it corresponded to the maximum amount of substrates present in the curd of a soft cheese like Camembert (14).

**Microbial and substrate analyses.** Viable cell counts, expressed in  $\text{CFU ml}^{-1}$ , were determined by using a standard aerobic plate count procedure. One milliliter of a yeast culture was mixed with 9 ml of physiological saline ( $9\text{ g liter}^{-1}$  NaCl), and then 10-fold serial dilutions were prepared and plated on 120-mm-diameter petri dishes; these dishes contained a glucose chloramphenicol agar (Biokar Diagnostics, Paris, France) to ensure immediate differentiation of the colonies based on their size, appearance, and pigmentation and to detect any microbial contamination. Colonies were counted after incubation for 2 days at  $25^{\circ}\text{C}$ .

The amino acids and ammonia production were analyzed using the ninhydrin method previously described by Grunau and Swiader (9).

Lactate was quantified by performing high-performance liquid chromatography (Waters TCM; Waters, Saint Quentin en Yvelines, France) with a cation-exchange column (diameter, 7.8 mm; length, 300 mm; Aminex HPX-87H; Bio-Rad, Ivry-sur-Seine, France) using a thermostat set at  $35^{\circ}\text{C}$ . The culture supernatants were filtered using a polyethersulfone membrane filter (pore size,  $0.22\text{ }\mu\text{m}$ ; diameter, 25 mm). The mobile phase was 0.01 N sulfuric acid at a flow rate of  $0.6\text{ ml min}^{-1}$ . Compounds of interest were detected with a Waters 486 tunable UV/visible detector regulated at 210 nm. All compounds were quantified by using calibration curves established with pure chemicals.

**Extraction and purification of total RNA.** Cultures were centrifuged for 5 min at  $8,200\times g$  and  $4^{\circ}\text{C}$ . Each pellet was resuspended in 1.25 ml of Trizol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and poured into a 2-ml tube containing 800 mg zirconium beads (diameters, 0.1 and 0.5 mm; Biospec Products, Bartlesville, OK). The tubes were vigorously shaken in a bead beater (Fast-Prep-24; MP Biomedicals, France) by using three 60-s mixing sequences at a speed of  $6.5\text{ m s}^{-1}$ . They were cooled on ice for 5 min before each mixing sequence. After centrifugation for 10 min at  $12,000\times g$  and  $4^{\circ}\text{C}$ , each supernatant was collected. It was transferred to a 2-ml tube (Phase Lock Gel Heavy; Eppendorf, Hamburg, Germany), and 230  $\mu\text{l}$  of chloroform was added. The tubes were gently mixed by inversion and centrifuged for 15 min at  $12,000\times g$  and  $4^{\circ}\text{C}$ . Each aqueous phase

TABLE 1. Composition of complete defined SM<sup>a</sup>

Constituent	Concn (g liter <sup>-1</sup> )
Lactose	20
Sodium lactate (60%)	18
Sodium acetate	1
Ammonium citrate	0.6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7.5
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.2
FeCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.011
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.050
ZnCl <sub>2</sub>	0.005
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.0025
<i>p</i> -Aminobenzoic acid	0.010
Biotin	0.010
Cyanocobalamin	0.001
Folic acid	0.001
Inosine	0.005
Nicotinic acid	0.001
Orotic acid	0.005
Calcium pantothenate	0.001
Pyridoxamine	0.005
Pyridoxine	0.002
Riboflavin	0.001
Thiamine	0.001
DL-6,8-Thioctic acid	0.0025
Thymidine	0.005
Adenine	0.010
Guanine	0.010
Uracil	0.010
Xanthin	0.010
L-Alanine	0.24
L-Arginine	0.12
L-Asparagine	0.34
L-Glutamine	0.51
L-Glycine	0.17
L-Histidine	0.11
L-Isoleucine	0.20
Leucine	0.47
L-Lysine	0.35
L-Methionine	0.12
Proline	0.68
L-Serine	0.34
Threonine	0.23
Tryptophan	0.05
Valine	0.33
Glutamate	0.68
Phenylalanine	0.28
Tyrosine	0.29
Cysteine	0.17

<sup>a</sup> See reference 18.

was transferred to a fresh tube, and an equal volume of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (pH 4.7) (Sigma) was added. The tubes were gently mixed by inversion and centrifuged for 10 min at  $12,000\times g$  and  $4^{\circ}\text{C}$ . Then the upper phase in each tube was collected. An equal volume of 100% ethanol was added to the aqueous phase, after which purification with an RNeasy kit (Qiagen, Courtabouef, France) was performed according to the manufacturer's instructions. RNA samples were treated with DNase using a DNase Turbo DNA-free kit (Ambion, Austin, TX). RNA quality and quantity were analyzed using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) and an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA).

**Real-time PCR conditions.** The RNA extraction and purification procedures used are described above. cDNAs were synthesized using the SuperScript III First-Strand synthesis system (Invitrogen). A mixture containing up to 5  $\mu\text{g}$  of total RNA, oligo(dT)<sub>20</sub> (50  $\mu\text{M}$ ), and deoxynucleoside triphosphates (10 mM)

TABLE 2. Primers used in this study

Primer	Accession no.	Sequence (5'-3')	Putative function <sup>a</sup>
<i>GAP1-R</i> <i>GAP1-F</i>	YALI0B16522g YALI0B16522g	CGACCACAGCAATGACTTTAATA AACTACTGGAATGAAGCTAACG	Amino acid transporter
<i>ARO8-R</i> <i>ARO8-F</i>	YALI0E20977g YALI0E20977g	GGCTCCGACCCAGTTGT TTCTCCTCCGCCATCGAGTG	Aromatic aminotransferase
<i>ARO9-R</i> <i>ARO9-F</i>	YALI0C05258g YALI0C05258g	GGTTGGGAAGAGCTCCAGAGAT ACGACAAGTTCATTCTGACCGTT	Aromatic aminotransferase
<i>BAT1-R</i> <i>BAT1-F</i>	YALI0D01265g YALI0D01265g	GTTGGCTCCCAGCTTCTTGT CTCTCGGCGTCGGAACC	Branched-chain amino acid aminotransferase
<i>BAT2-R</i> <i>BAT2-F</i>	YALI0F19910g YALI0F19910g	TCCAACGGCCTTGAGTTCT CCTCAAGCTCTACTGCTCCGA	Branched-chain amino acid aminotransferase
<i>JEN1-R</i> <i>JEN1-F</i>	YALI0D20108g YALI0D20108g	TTAATGTGAGCGTCACAGATATCAC AGCTCCAGCACAATAAATAGAACAC	Organic acid transporter
<i>CYB2-1-R</i> <i>CYB2-1-F</i>	YALI0D12661g YALI0D12661g	TCTTCTTCTCGGCGCAATCT GCATCCTGGAGGACAGGCTA	Lactate dehydrogenase
<i>CYB2-2-R</i> <i>CYB2-2-F</i>	YALI0E21307g YALI0E21307g	CTCGGCGGCGTTGTCAAT GACTCTCCCTACCTACCTCGAAACCGATA	Lactate dehydrogenase
<i>ACT2-R</i> <i>ACT2-F</i>	YALI0D08272g <sup>b</sup> YALI0D08272g <sup>b</sup>	GGCCAGCCATATCGAGTCGCA TCCAGGCGTCTCTCC	Gene encoding actin

<sup>a</sup> The annotations are Génolevures annotations (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/>).

<sup>b</sup> See reference 3.

was prepared and incubated at 65°C for 5 min, and then it was placed on ice for at least 1 min. A cDNA synthesis mixture containing 10× reverse transcription buffer, MgCl<sub>2</sub> (25 mM), dithiothreitol (0.1 M), RNaseOUT (40 U μl<sup>-1</sup>), and SuperScript III reverse transcriptase (200 U μl<sup>-1</sup>) was added to each RNA-primer mixture and then incubated for 50 min at 50°C. The reaction was stopped by incubation for 5 min at 85°C.

The primers used for real-time PCR were designed so that they were about 20 to 25 bases long, had a G+C content of over 50%, and had a melting temperature of about 60°C. The lengths of the PCR products ranged from 90 to 150 bp. LightCycler software (Roche, Mannheim, Germany) was used to select primer sequences. All of the primers were synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium) (Table 2).

SYBR green I PCR amplification was performed using a LightCycler (Roche). Amplification was carried out by using a 10-μl (final volume) mixture containing 250 ng of RNA sample, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 μM primer, and 1 μl of LightCycler-FastStart DNA Master SYBR green I (Roche). Five dilutions of cDNA were prepared to determine the efficiencies of real-time PCR. A negative control without cDNA was systematically included. The amplification procedure involved incubation at 95°C for 8 min for initial denaturation, followed by 45 cycles consisting of (i) denaturation at 95°C for 10 s, (ii) annealing at a temperature that was 5°C below the melting temperature of the primers for 7 s, (iii) extension at 72°C for 6 s, and (iv) fluorescence acquisition (530 nm) at the end of extension. The temperature transition rate was 20°C/s for each step. After real-time PCR, a melting curve analysis was performed by continuously measuring fluorescence during heating from 65 to 95°C at a transition rate of 0.1°C/s. The cycle threshold values were determined with LightCycler software (version 3.3), using the second-derivative method. Standard curves were generated by plotting the cycle threshold values as a function of the log initial RNA concentration. PCR efficiency (*E*) was then calculated using the following formula:  $E = 10^{-1/\text{slope}}$ . The actin gene (3) was used as a suitable internal control gene to normalize the results. The Pfaffl method (19) was used to calculate the changes in transcript abundance normalized to the actin gene and relative to the sample collected before the pulse.

## RESULTS

**Growth and substrate assimilation by *Y. lipolytica*.** (i) **Yeast growth and pH over time.** *Y. lipolytica* 1E07 was cultivated in

SM containing amino acids at two concentrations (0.1× and 2×) in the presence and in the absence of lactate. A fifth culture condition was medium containing lactate but no amino acids. The growth of *Y. lipolytica* under the five conditions is shown in Fig. 1A. Yeast growth was more effective in SM containing the high concentration of amino acids, regardless of the presence of lactate; the concentrations of the yeast at 56 h were  $8.25 \times 10^7$  CFU ml<sup>-1</sup> in the presence of lactate and  $7.11 \times 10^7$  CFU ml<sup>-1</sup> in the absence of lactate. The increase in the yeast concentration was accompanied by a dramatic increase in the pH, from pH 6.5 at the beginning of the culture to pH 8 and 8.2 after 56 h (Fig. 1). In contrast, limited growth and a limited increase in the pH were observed in SM containing 0.1× amino acids or lactate. Limited growth was observed at 56 h in SM containing lactate ( $10^7$  CFU ml<sup>-1</sup>) or 0.1× amino acids ( $6 \times 10^6$  CFU ml<sup>-1</sup>). A dramatic increase in yeast growth ( $3.3 \times 10^7$  CFU ml<sup>-1</sup>) was observed when 0.1× amino acids and lactate were supplied together. On the basis of these data, it appears that deacidification was highly correlated with lactate and/or amino acid degradation.

(ii) **Lactate utilization.** Lactate consumption data are shown in Fig. 1C. The yeast grew well in SM containing lactate and 0.1× amino acids and consumed a large amount of lactate (7 g liter<sup>-1</sup> of lactate), while growth was significantly reduced in SM containing only lactate, in which this carbon source was poorly consumed (1.5 g liter<sup>-1</sup> of lactate). Moreover, only 2 g liter<sup>-1</sup> of lactate was utilized in the presence of 2× amino acids. When lactate was provided, some of it was always consumed by *Y. lipolytica*, but it was not totally depleted.

(iii) **Amino acid utilization.** The overall amino acid consumption rates are shown in Fig. 2. Amino acids were used

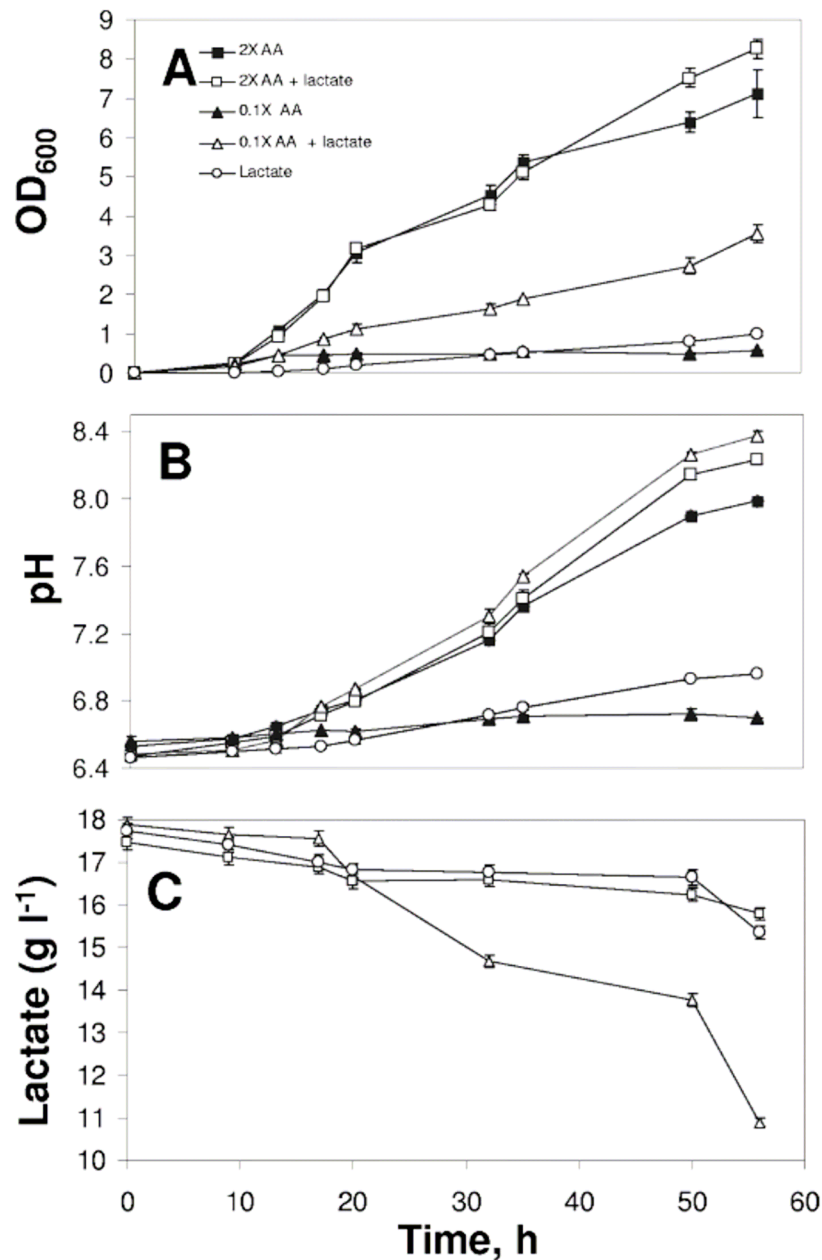


FIG. 1. Growth (A), increase in the pH (B), and lactate consumption (C) of *Y. lipolytica* 1E07 in SM containing lactate and/or amino acids. AA, amino acids; OD<sub>600</sub>, optical density at 600 nm.

during the growth of *Y. lipolytica* 1E07, regardless of their initial concentration. The amino acid utilization correlated well with the increase in the biomass. In SM containing 0.1× amino acids with or without lactate, amino acids could be limiting for the growth of *Y. lipolytica* since all of the amino acids were depleted at 32 h (Fig. 2A and 2B). In medium supplemented with the low level of amino acids, amino acids were more efficiently consumed without lactate (Fig. 2A and 2B), in contrast to the results for medium supplemented with 2× amino acids, in which lactate had no effect on the amino acid consumption rate (Fig. 2C and 2D).

In SM containing 2× amino acids (regardless of the presence of lactate), amino acids were not limiting since they were not exhausted at the end of the exponential phase, although they were efficiently consumed as an energy source for the growth of *Y. lipolytica* (the amino acids were totally consumed after 56 h). Regardless of the amino acid concentration, proline, glutamate, leucine, and glutamine were the amino acids that were most efficiently consumed by *Y. lipolytica*.

(iv) **Ammonia production.** The ammonia production and accumulated production are shown in Fig. 3. Ammonia production was correlated with amino acid degradation. In SM

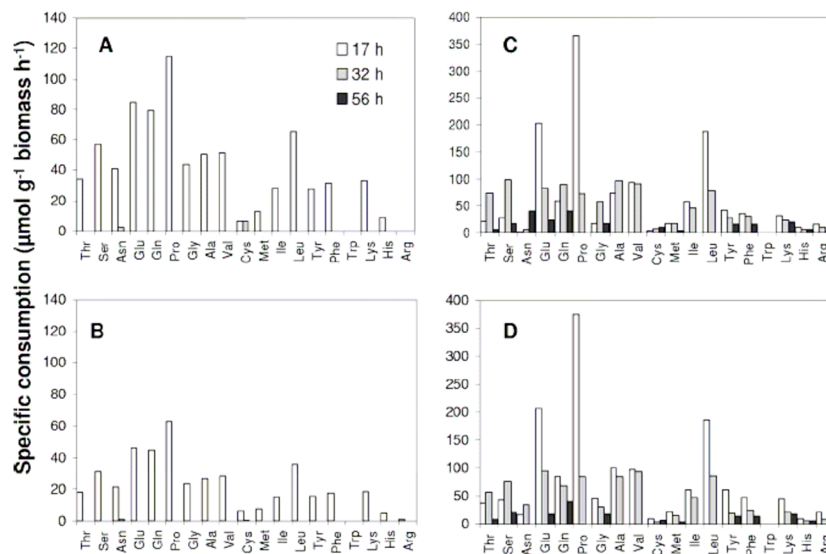


FIG. 2. Overall rates of consumption of amino acids by *Y. lipolytica* 1E07 cultivated in SM containing low and high concentrations of amino acids. (A) 0.1× amino acids. (B) 0.1× amino acids plus lactate. (C) 2× amino acids. (D) 2× amino acids plus lactate.

with 0.1× amino acids (Fig. 3A), ammonia production increased at 17 h during culture and was stable up to 56 h. In SM containing 0.1× amino acids and lactate, ammonia production decreased after 32 h, which coincided with total depletion of amino acids and the onset of lactate consumption. In SM containing amino acids at the high concentration, ammonia production increased during yeast growth and there was not a significant difference between growth in the presence of lactate and growth in the absence of lactate. The results for produc-

tion of ammonia were consistent with extensive amino acid degradation (Fig. 2C, 2D, 3C, and 3D).

(v) **Analyses of expected and actual cell yields.** In SM containing only lactate, the sole nitrogen source available, ammonium citrate, supported a maximum yield of about 0.72 g liter<sup>-1</sup> of cells, which essentially corresponded to the measured biomass (Table 3). Assuming that nitrogen is used to make only biomass and that the cell yield on lactate is about 50%, this suggests that there was only enough nitrogen present to

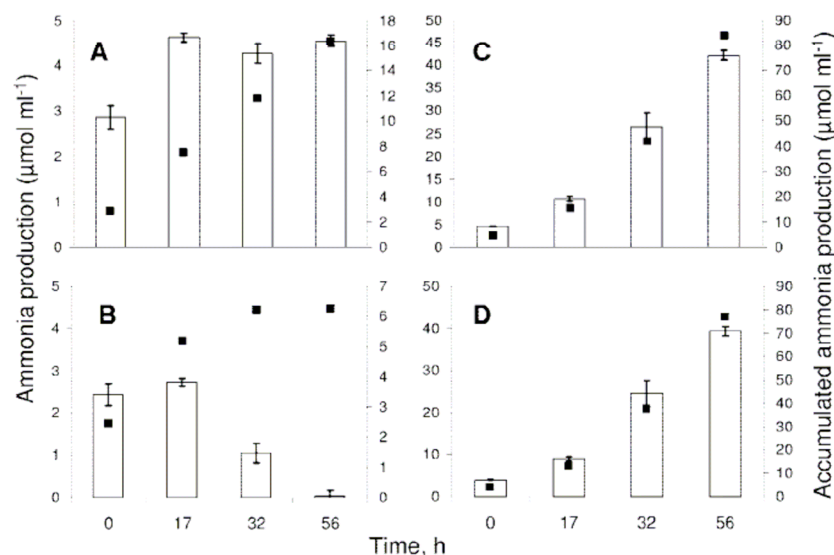


FIG. 3. Ammonia production (bars) by *Y. lipolytica* 1E07 cultivated in SM containing low and high concentrations of amino acids. (A) 0.1× amino acids. (B) 0.1× amino acids plus lactate. (C) 2× amino acids. (D) 2× amino acids plus lactate. The accumulated ammonia production is indicated by filled squares.

TABLE 3. Expected and actual cell yields after 56 h for *Y. lipolytica* grown under various culture conditions<sup>a</sup>

Culture conditions	Substrate consumed (g liter <sup>-1</sup> )			Theoretical biomass provided by the nitrogen sources available (g liter <sup>-1</sup> )		Total theoretical biomass (g liter <sup>-1</sup> )	Theoretical biomass provided by the carbon sources available (g liter <sup>-1</sup> )			Total theoretical biomass (g liter <sup>-1</sup> )	Measured biomass (g liter <sup>-1</sup> )
	Amino acids	Ammonium citrate	Lactate	Amino acids	Ammonium citrate		Amino acids	Ammonium citrate	Lactate		
Lactate		0.6	2.5		0.72	0.72		0.26	1.25	1.51	0.61 <sup>b</sup>
0.1× amino acids	0.568	0.6		0.91	0.72	1.63	0.24	0.26		0.50	0.36 <sup>c</sup>
0.1× amino acids + lactate	0.568	0.6	7	0.91	0.72	1.63	0.24	0.26	3.5	4	2.19 <sup>b</sup>
2× amino acids	11.36	0.6		18.18	0.72	18.9	4.77	0.26		5.03	4.40 <sup>c</sup>
2× amino acids + lactate	11.36	0.6	2	18.18	0.72	18.9	4.77	0.26	1	6.03	5.12 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> The yields for theoretical calculation of biomass were 10% for nitrogen and 50% for carbon.

<sup>b</sup> Nitrogen limitation.

<sup>c</sup> Carbon limitation.

support the utilization of 1.5 g liter<sup>-1</sup> of lactate. The actual amount of lactate consumed, 2.5 g liter<sup>-1</sup>, may be explained by nitrogen limitation.

The same analysis could be performed for SM supplemented only with 0.1× amino acids. Calculation of theoretical cell yields showed that there should have been sufficient nitrogen to support production of 1.63 g liter<sup>-1</sup> of cells (where 0.72 g liter<sup>-1</sup> of cells came from ammonium citrate and 0.91 g liter<sup>-1</sup> of cells came from 0.1× amino acids) and sufficient carbon to support 0.5 g liter<sup>-1</sup> of cells (where 0.24 g liter<sup>-1</sup> of cells came from 0.1× amino acids and 0.26 g liter<sup>-1</sup> of cells came from citrate), which essentially corresponded to the actual cell mass. This result shows that there was probably carbon limitation.

In SM containing 0.1× amino acids and lactate, the nitrogen available should have supported production of about 1.63 g liter<sup>-1</sup> of cells, and the actual yield was 2.19 g liter<sup>-1</sup> of cells (Table 3). The theoretical biomass yield on carbon is 4 g liter<sup>-1</sup> of cells. The results showed that there was nitrogen limitation and that at least some lactate was converted to something besides cell mass. In addition, the production of ammonia indicated that not all the nitrogen was used to make cell mass.

The media containing 2× amino acids without and with lactate should have contained enough nitrogen to support production of about 18 g liter<sup>-1</sup> of cell mass. However, the available carbon was limited and could support theoretical cell mass yields of only 5.03 and 6.03 g liter<sup>-1</sup>, respectively. Since the actual cell mass yields were 4.4 and 5.12 g liter<sup>-1</sup>, respectively, it was clear that lactate was poorly consumed to make biomass when a large amount of amino acids was provided. The observed lactate consumption essentially corresponded to the excess biomass produced (1 g liter<sup>-1</sup>) in the presence of 2× amino acids plus lactate compared to the biomass produced in the presence of only 2× amino acids (Table 3).

Reverse transcription-PCR analysis after an amino acid pulse in a culture of *Y. lipolytica* 1E07 cultivated on lactate. We suspect that amino acids are the molecules primarily used by *Y. lipolytica*, rather than lactate. In order to better understand the complementary catabolism, a pulse experiment in which 0.1× amino acids was added to a batch culture of *Y. lipolytica* containing lactate as the carbon source was conducted. Total RNA was extracted before the pulse (after 42 h of culture) and then 15, 30, and 60 min later. At 42 h, the lactate consumption was steady and the cell concentration was  $5 \times 10^6$  CFU ml<sup>-1</sup>.

Reverse transcription-PCR and real-time quantitative PCR were then performed with primers specific for genes involved in amino acid and lactate catabolism. Four aminotransferase genes and one amino acid transporter-encoding gene (*AROS*, *ARO9*, *BAT1*, *BAT2* and *GAP1*) were selected as markers for amino acid catabolism. Two lactate dehydrogenase genes and one lactate transporter-encoding gene (*CYB2-1*, *CYB2-2*, and *JEN1*) were chosen as markers for lactate catabolism.

The levels of expression of these genes are shown in Fig. 4. Fifteen minutes after addition of 0.1× amino acids, the levels of *GAP1*, *BAT1*, *BAT2*, and *AROS* expression dramatically increased. Thirty minutes after amino acid addition, the levels

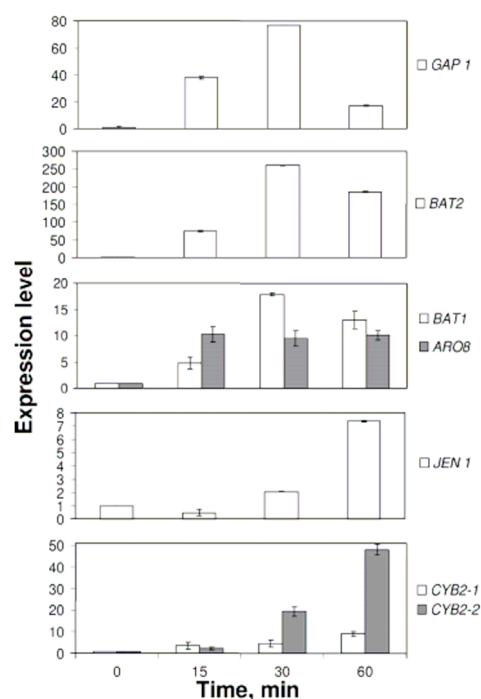


FIG. 4. Levels of expression of the *GAP1*, *BAT2*, *BAT1*, *AROS*, *JEN1*, *CYB2-1*, and *CYB2-2* genes, as measured by real-time PCR after an amino acid pulse (0.1× amino acids), for a *Y. lipolytica* 1E07 pure culture grown in SM containing lactate.

of expression were 78-fold greater for *GAP1*, 18-fold greater for *BAT1*, and 250-fold greater for *BAT2*, and 60 min after the pulse the values were 17-, 14-, and 180-fold greater, respectively. Furthermore, the level of expression of *ARO8* was 10-fold greater 15 min after the amino acid pulse and remained stable thereafter. *ARO9* was not expressed, even following amino acid addition. The levels of expression of *JEN1*, *CYB2-1*, and *CYB2-2* increased considerably after the amino acid pulse. However, the expression of these genes was delayed compared to the expression of aminotransferase genes and the amino acid transporter *GAP1* gene, since expression was induced most after 60 min (7-, 10-, and 50-fold increases, respectively).

Five hours after amino acid addition, the levels of expression of all aminotransferase and lactate dehydrogenase genes were significantly lower than the levels of expression 60 min after amino acid addition (data not shown).

### DISCUSSION

In this work, we were able to identify complementary roles of lactate and amino acids in the yeast *Y. lipolytica*. These molecules are major carbon and/or nitrogen sources for microbial growth and aroma production during cheese ripening. At the beginning of the cheese-ripening process, lactose is rapidly transformed into lactate by the LAB. After a few days of ripening, lactate is the most important carbon source available in the cheese curd. In addition, lactose, which may not be converted to lactate by LAB, is not assimilated by *Y. lipolytica* (2). Therefore, lactate catabolism in this yeast was investigated. Amino acid degradation, including degradation of aromatic amino acids (phenylalanine, tyrosine, and tryptophan), branched amino acids (leucine, isoleucine, and valine), or methionine, has been shown to play an important role in aroma compound production during cheese ripening (11). However, the possible use of amino acids as an energy source for growth has never been fully investigated for any cheese-ripening yeast, although amino acids could play an important role in microbial development during the ripening process. The competitive consumption of lactate and amino acids was investigated using the yeast *Y. lipolytica* 1E07, which originated from cheese. In this yeast, amino acids are degraded first, and lactate is consumed only after total amino acid depletion. This suggests that amino acids are likely to be the main nitrogen and carbon sources for growth of *Y. lipolytica* and that a high amino acid concentration probably has a negative effect on lactate catabolism. Since there is redundancy of genes encoding high-affinity amino acid permeases in the *Y. lipolytica* genome, we suspect that such amino acid transporters may provide a competitive advantage to *Y. lipolytica* for efficient growth on amino acids compared with other cheese-ripening yeasts, which primarily use lactate and/or lactose, as suggested previously for methionine (5). Furthermore, it has been reported that lactate is not consumed in cheeses inoculated with *Y. lipolytica* (used as the sole yeast) in association with bacteria (17, 20).

The expression of several genes involved in amino acid catabolism was investigated (Fig. 5). Our data show that the expression of *GAP1*, *BAT2*, *BAT1*, and *ARO8* was highly induced 15 to 30 min following addition of amino acids. Amino acids are probably transported through the amino acid trans-

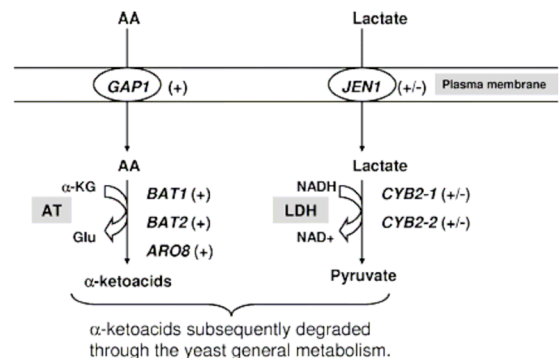


FIG. 5. Possible relationship between amino acid catabolism (AA) and lactate catabolism in *Y. lipolytica* 1E07. +, early induction of the genes in italics; +/-, delayed induction of the genes following addition of amino acids. AT, amino transferase; LDH, lactate dehydrogenase; α-KG, α-ketoglutarate; Glu, glutamate. Gene functions are shown in Table 2.

porter encoded by *GAP1* into the cell, where the aminotransferase reactions are activated. Among the aminotransferase-encoding genes, *BAT2* is by far the most highly expressed, an indication of the major role of *BAT2* in amino acid transamination. It has recently been reported that the levels of expression of *AGPI* (which encodes an amino acid permease with a low affinity and a broad spectrum) and *MUP1* (involved in L-methionine transport) were increased following addition of amino acids (after 4 h) in *S. cerevisiae* during alcoholic fermentation (13).

The lactate transporter gene *JEN1* and two lactate dehydrogenase-encoding genes, *CYB2-1* and *CYB2-2*, which may be involved in lactate catabolism, were also studied (Fig. 5). The maximum levels of expression of *JEN1*, *CYB2-1*, and *CYB2-2* were delayed ( $\geq 60$  min) compared to the expression of genes involved in amino acid catabolism.

The pH increased considerably in the medium containing the low concentration of amino acids plus lactate, while the pH increased similarly regardless of the presence of lactate in SM containing the high concentration of amino acids. Furthermore, the pH variations observed with *Y. lipolytica* in SM (around 2 pH units) are comparable to what was observed by other workers for various cheese environments (for instance, in a cheese agar medium [8] or in a model cheese [17]). It was shown previously that lactate was not degraded in cocultures when *Y. lipolytica* was the sole yeast, while the pH increased significantly, and that *Y. lipolytica* produced large amounts of ammonia (17). The increase in the pH was attributed to amino acids that could control ammonia release in yeast colonies (13). The possible role of ammonia in the increase in the pH on the cheese surface has been studied by measuring ammonia production in single colonies of different yeast species, including *D. hansenii*, *G. candidum*, and *Y. lipolytica* (8). On cheese agar, the greatest increase in pH was observed around colonies of *Y. lipolytica* that efficiently produced and accumulated ammonia. A 10-fold increase in ammonia production was observed with *Y. lipolytica* compared to the ammonia production with the other yeasts (8). Our data suggest that amino acid and lactate catabolism has a dual effect on the deacidifying capacities of *Y. lipolytica*, in contrast to what was observed for other



yeasts of cheese origin, in which deacidification is believed to coincide with lactate degradation (1). Furthermore, it was shown that ammonia produced by colonies essentially originated from amino acid catabolism (23).

This is the first study of *Y. lipolytica* in which lactate catabolism and amino acid catabolism were studied at the level of gene expression. The results show for the first time that lactate catabolism and amino acid catabolism complement each other with respect to growth and that amino acids are degraded first. They also show that both amino acid degradation and lactate degradation by *Y. lipolytica* actively participate in deacidification, which is very important for the development of acid-sensitive bacteria during cheese ripening. Ammonia production by yeasts may therefore be taken into consideration as an additional technological parameter when starter cultures are selected for surface-ripened cheeses.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Soula Mansour is grateful to the ABIES Doctoral School for providing a Ph.D. scholarship.

We thank J. Bailly and C. Monnet for helpful discussions. We also thank J. Colle and P. Courtin for their excellent technical assistance.

#### REFERENCES

1. Arfi, K., M. N. Leclercq-Perlat, H. E. Spinnler, and P. Bonnarne. 2005. Importance of curd-neutralising yeasts on the aromatic potential of *Brevibacterium linens* during cheese ripening. *Int. Dairy J.* **15**:883–891.
2. Barnett, J. A., R. W. Payne, and D. Yarrow. 2000. *Yeasts: characteristics and identification*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
3. Blanchin-Roland, S., G. D. Costa, and C. Gaillardin. 2005. ESCRT-I components of the endocytic machinery are required for Rim101-dependent ambient pH regulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology* **151**:3627–3637.
4. Bondar, D. C., J.-M. Beckerich, and P. Bonnarne. 2005. Involvement of a branched-chain aminotransferase in production of volatile sulfur compounds in *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:4585–4591.
5. Cholet, O., A. Henaut, S. Casaregola, and P. Bonnarne. 2007. Gene expression and biochemical analysis of cheese-ripening yeasts: focus on catabolism of L-methionine, lactate, and lactose. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:2561–2570.
6. Corsetti, A., J. Rossi, and M. Gobetti. 2001. Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* **69**:1–10.
7. Cosentino, S., M. E. Fadda, M. Deplano, A. F. Mulargia, and F. Palmas. 2001. Yeasts associated with Sardinian ewe's dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* **69**:53–58.
8. Gori, K., H. D. Mortensen, N. Arneborg, and L. Jespersen. 2007. Ammonia production and its possible role as a mediator of communication for *Debaryomyces hansenii* and other cheese-relevant yeast species. *J. Dairy Sci.* **90**:5032–5041.
9. Grunau, J. A., and J. M. Swiader. 1992. Chromatography of 99 amino acids and other ninhydrin-reactive compounds in the Pickering lithium gradient system. *J. Chromatogr. A* **594**:165–171.
10. Iraqui, I., S. Vissers, B. Andre, and A. Urrestarazu. 1999. Transcriptional induction by aromatic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19**:3360–3371.
11. Iraqui, I., S. Vissers, M. Cartiaux, and A. Urrestarazu. 1997. Characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* AROS and ARO9 genes encoding aromatic aminotransferases I and II reveals a new aminotransferase subfamily. *Mol. Gen. Genet.* **257**:239–248.
12. Ireland, J., J.-C. Favier, and M. Feinderg. 2002. Répertoire générale des aliments. Tome 2. Produits laitiers, 2nd ed. INRA-Éditions TEC & DOC, Paris, France.
13. Jimenez-Martí, E., and M. I. del Olmo. 2008. Addition of ammonia or amino acids to a nitrogen-depleted medium affects gene expression patterns in yeast cells during alcoholic fermentation. *FEMS Yeast Res.* **8**:245–256.
14. Leclercq-Perlat, M. N., A. Oumer, J. L. Bergere, H. E. Spinnler, and G. Corrien. 2000. Behavior of *Brevibacterium linens* and *Debaryomyces hansenii* as ripening flora in controlled production of smear soft cheese from reconstituted milk: growth and substrate consumption dairy foods. *J. Dairy Sci.* **83**:1665–1673.
15. McSweeney, P. L. H., and M. J. Sousa. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: a review. *Lait* **80**:293–324.
16. Mounier, J., S. Goerges, R. Gelsomino, M. Vancanneyt, K. Vandemeulebroecke, B. Hoste, N. M. Brennan, S. Scherer, J. Swings, G. F. Fitzgerald, and T. M. Cogan. 2006. Sources of the adventitious microflora of a smear-ripened cheese. *J. Appl. Microbiol.* **101**:668–681.
17. Mounier, J., C. Monnet, T. Vallaeys, R. Arditi, A.-S. Sarthou, A. Helias, and F. Irlinger. 2008. Microbial Interactions within a cheese microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:172–181.
18. Otto, R., B. ten Brink, H. Veldkamp, and W. N. Konings. 1983. The relationship between growth rate and electrochemical proton gradient of *Streptococcus cremoris*. *FEMS Microbiol. Lett.* **16**:69–74.
19. Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**:e45.
20. Sinigaglia, M., R. Lanciotti, and M. E. Guerzoni. 1994. Biochemical and physiological characteristics of *Yarrowia lipolytica* strains in relation to isolation source. *Can. J. Microbiol.* **40**:54–59.
21. Smit, G., B. A. Smit, and W. J. M. Engels. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**:591–610.
22. Yvon, M., and L. Rijnen. 2001. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int. Dairy J.* **11**:185–201.
23. Zikanova, B., M. Kuthan, M. Riciova, J. Forstova, and Z. Palkova. 2002. Amino acids control ammonia pulses in yeast colonies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **294**:962–967.

## II. 2. 2. Etude Protéomique de la levure *Y. lipolytica* 1E07.

### II. 2. 2. 1. Résumé

L'étude du protéome permet de compléter les résultats obtenus dans la première partie de ce travail. L'étude protéomique a permis de comparer l'abondance des protéines dans un milieu contenant uniquement du lactate comme source de carbone ( $AA^-$ ) à celles présentes 5 heures après ajout d'acides aminés ( $AA^+$ ). Cela a permis de préciser l'effet de l'ajout des acides aminés sur le métabolisme de cette levure.

Trente-quatre protéines différentiellement exprimées ont pu être identifiées dans les gels 2D contenant respectivement  $491 \pm 35$  ( $AA^-$ ) et  $501 \pm 45$  ( $AA^+$ ) spots protéiques par gel. Nos résultats ont mis en évidence une induction de l'expression des protéines impliquées dans le stress oxydatif dans la condition  $AA^-$ . Les protéines induites dans le milieu  $AA^+$ , sont principalement celles impliquées dans les métabolismes du carbone, des acides aminés et de la biosynthèse protéique.

Les données protéomiques ont été complétées par une étude transcriptomique par RT-PCR quantitative sur plusieurs gènes cibles. Le niveau d'expression de 9 gènes (*BAT2*, *PDC6*, *SSZ1*, *PRX1*, *CTT1*, *SAH1*, *TSA1*, *JEN1* et *GAPI*) a été mesuré avant et après 30 min d'ajout d'acides aminés. La comparaison des résultats de l'analyse transcriptomique et protéomique révèle une concordance au niveau de l'expression de 3 gènes *BAT2*, *PDC6* et *SSZ1* (sélectionner des protéines induites après l'ajout d'acides aminés). Ces gènes sont induits respectivement 304.6, 27.3 et 10.9 fois dans la condition  $AA^+$  par rapport à la condition  $AA^-$ . L'expression des gènes *JEN1* et *GAPI* codant pour des protéines membranaires (ne pouvant pas être détectée par protéomique) impliqués respectivement dans le transport du lactate et des acides aminés sont induits 3.78 et 71.75 fois dans dans la condition  $AA^+$  par rapport à la condition  $AA^-$ . L'expression des 4 autres gènes n'a pas pu être détectée dans nos conditions. Des études ont déjà montré que l'abondance d'une protéine ne corrèle pas toujours avec l'expression du gène qui le code du fait des modifications post-traductionnel de l'ARNm [4, 5].

Les deux approches mettent en évidence une induction des métabolismes du carbone et des acides aminés dans la condition  $AA^+$  en comparaison avec la condition  $AA^-$ . En effet, un changement de la disponibilité en azote peut induire les voies métaboliques de fixation du carbone, dans le but d'avoir un niveau stable du ratio C/N [6].

II. 2. 2. 2. *Publication n°2* : “A joint proteomic and transcriptomic analysis of the amino acids catabolism in the yeast *Yarrowia lipolytica*”

Accepté pour publication dans le Journal : Proteomics

## **A proteomic and transcriptomic view of amino acids catabolism in the yeast *Yarrowia lipolytica***

**S. Mansour, J. Bailly, J. Delettre and P. Bonnarme\***

INRA- AgroParisTech, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, 78850  
Thiverval Grignon, France

\*Corresponding author. Phone: +33 (0)1 30 81 53 88. Fax: +33 (0)1 30 81 55 97. E-mail:  
bonnarme@grignon.inra.fr

## **Abstract**

*Yarrowia lipolytica* has to develop dynamic metabolic adaptation mechanisms in order to be able to survive within the cheese habitat. The different nutrient availability and consumption such as amino acids is of major importance for microbial development and/or aroma production during cheese ripening. Using a 2-D protein gel electrophoresis approach, we analyzed the adaptation mechanisms of *Yarrowia lipolytica* for amino acids limitation or supplementation in a batch culture in a synthetic medium containing lactate as a carbon source. Proteome analyses allow the identification of 34 differentially-expressed proteins between the cultures conditions. Eleven proteins were amplified or only present under the amino acids limitation condition, whereas 23 proteins were amplified or only present under the amino acids supplemented condition. These analyses demonstrated that prior to the amino acids addition, mainly proteins involved in the oxidative stress of the yeast were induced. Following the amino acids addition, yeast cells reorganize their metabolism towards amino acids catabolism and also generate a higher induction of proteins related to carbon metabolism and proteins biosynthesis. In addition, using real-time reverse transcription PCR approaches, we re-evaluated the expression of genes encoding proteins involved in these processes. The expression levels of the genes were in accordance with the proteomic results, with the up-regulation of genes encoding a branched-chain amino transferase BAT2, a pyruvate decarboxylase PDC6 and an Hsp70 protein SSZ1 involved in protein biosynthesis. A volatile compound analysis was also performed, and increased production of dimethyldisulfide from methionine and 3-methyl-butanal from leucine was observed in media supplemented with amino acids.

**Keywords:** Amino acids; lactate; 2-D gel electrophoresis; *Yarrowia lipolytica*.

## 1 Introduction

The yeast *Yarrowia lipolytica* is well adapted to the cheese habitat, which contains a microbial community of both yeast and bacteria, in which it develops [7]. This yeast has the capacity to grow under a wide range of metabolic conditions, and it is often associated with proteolysis and lipolysis activities. *Y. lipolytica* has to develop dynamic metabolic adaptation mechanisms in order to be able to survive within the cheese ecosystem. The different nutrient availability and consumption of amino acids, for example, is of major importance for microbial development and/or aroma production during cheese ripening. A previous study showed that amino acids starvation could induce oxidative stress response in yeast [8]. In the cheese-ripening curd, lactate and amino acids constitute the main carbon and/or nitrogen sources available. Lactate results from the conversion of lactose by lactic acid bacteria, and amino acids result from casein proteolysis during the cheese ripening process [9]. (ref 3 pas bonne! Que fait-on? C bon je l'ai enlevé) It is clearly established that free amino acids released through proteolysis are converted into aroma compounds that contribute to cheese flavor [9]. However, due to limited amino acids and lactate availability during cheese ripening, microorganisms in the cheese ecosystem must adapt their metabolism for the consumption of amino acids and/or lactate, depending on their need and/or the relative concentrations of these substrates. In contrast to other cheese ripening yeasts such as *Debaryomyces hansenii* and *Kluyveromyces lactis*, which are known to consume lactate in the early stages of ripening, leading to the deacidification of the cheese surface, *Y. lipolytica* is a much more versatile yeast that can produce flavor compounds such as volatile sulfur compounds [10, 11] and/or ammonia [12] through amino acids catabolism. Comparative 2-D protein gel analyses of *Y. lipolytica* have already been used in order to study fungal dimorphism of the yeast [13].

The study presented here allows a deeper understanding of the temporal proteomic response of *Y. lipolytica* grown in amino acid-starved medium versus amino acid-supplemented medium and, in particular, of how the *Y. lipolytica* proteome changes during the early stage of amino acids supplementation. In the present study, we used a 2-D protein gel approach to analyze differences in protein synthesis and accumulation by comparing *Y. lipolytica* culture before and 5 hours following amino acids supplementation. In order to complement the proteomic results, the expression of several target genes were also investigated using real-time reverse transcription PCR (RT-qPCR). The proteomic and transcriptomic data generated allow a better understanding of *Y. lipolytica* adaptation in response to amino acids availability, which may play a central role in the understanding of the dual adaptation of yeast

metabolism to the cheese biotope. Finally, flavor compounds resulting from amino acids catabolism were also measured and compared following amino acids supplementation.

## **2 Materials and methods**

### **2.1 Strain and culture conditions**

The microorganism used throughout this work was *Yarrowia lipolytica* 1E07. This strain, originally isolated from Livarot, a French cheese, and obtained from the LMILA (Laboratoire des Micro-organismes d'Interêt Laitier et Alimentaire, Caen, France). It was selected for its ability to develop within a cheese ecosystem under technological conditions [7]. Yeast was stored in 5% glycerol non-fat dry milk at -80°C until it was used.

The yeast was cultivated in a 500-mL flask containing 100 mL potato dextrose broth (PDB) (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) for one day at 25°C with stirring (150 rpm). The PDB medium was inoculated with 1 mL of a thawed stock suspension. This preculture served as inocula for the subsequent culture. A defined synthetic medium (SM), adapted from the one described by Otto *et al.* [14] (supporting information), was used for all the culture conditions. It essentially contained 48 components, including lactate and lactose as principal carbon sources, 19 free amino acids, 14 vitamins, five metallic ions and four nucleic acid bases. The pH of the culture media was adjusted to 6.7. Two culture conditions were used: a medium containing only lactate without amino acids, and a medium containing 0.1X amino acids. Cultures were incubated at 25°C (150 rpm). The concentration of lactate and lactose corresponds to the maximum amount of substrates present in the curd of soft cheese such as Camembert [15]. In order to have enough biomass for the proteomic and transcriptomic analyses, *Y. lipolytica* cells were cultivated for 56 hours in a medium containing only lactate, then the amino acids were added. Yeast samples were collected immediately before the amino acids addition (for transcriptomic and proteomic analyses), and 30 minutes (for the transcriptomic analysis) or 5 hours after the amino acids addition (for the proteomic analysis).

### **2.2 Microbial and substrate analyses**

Viable cell counts, expressed as colony-forming units (CFU/mL), were determined following a standard aerobic plate count procedure. One milliliter of yeast culture was mixed with 9 mL of physiological saline (9 g/L NaCl) with which 10-fold serial dilutions were prepared and then plated on 120-mm-diameter Petri dishes. Plates contained a glucose chloramphenicol agar medium (Biokar Diagnostics, Paris, France) to ensure immediate differentiation of the colonies based on their size, appearance and pigmentation, and to detect any microbial contamination. Colonies were enumerated after incubation for two days at 25°C.

Amino acids concentration was analyzed using the ninhydrin method as previously described by Grunau and Swiader [16].

Lactate was quantified by performing High-Performance Liquid Chromatography (HPLC, Waters TCM; Waters, Saint Quentin en Yvelines, France) with a cation exchange column (diameter: 7.8 mm; length: 300 mm; Aminex HPX-87H; Bio-Rad, Ivry-Sur-Seine, France), and thermostated at 35°C. The culture supernatants were filtered using a polyethersulfone membrane filter (pore size: 0.22 µm; diameter: 25 mm). The mobile phase was sulfuric acid (0.01 N) dispensed at a rate of 0.6 mL/minute. Detection of compounds of interest was performed with a Waters 486 tunable UV/Visible detector regulated at 210 nm. All compounds were quantified from calibration curves established with pure chemicals.

### **2.3 Extraction of proteins and 2-DE**

Cells harvested after fermentation were washed three times in 50 mM Tris buffer pH 8.8 (Sigma-Aldrich, Germany) and centrifuged (24,000g, 4 °C, 15 minutes). Cells pellets (0.2 g) were resuspended in 1 mL Tris-EDTA buffer (50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.8) (Sigma-Aldrich) and lysed with 0.6 g glass beads (0.5 mm in diameter, Biospec Products, Bartlesville, USA) in a FastPrep FP 120 apparatus (Bio 101, Savant Instruments, Holbrook, USA) during 20 seconds at an intensity of 6.5. After centrifugation (24,000g, 4 °C, 15 minutes), protein concentration in the supernatant was measured by the Bradford method. Two hundred µg of soluble protein were incubated with 60 U benzonase endonuclease (Sigma-Aldrich) and 0.2 µL 1M MgSO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich) then precipitated with acetone (Prolabo, Paris, France) (10:1 in volume), chilled 20 minutes at -20°C. After centrifugation (24,000 x g, 4 °C, and 15 minutes) acetone was eliminated and the sample was dried out at room temperature. Samples were diluted in 350 µL extract buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 5 g/L Triton X-100, 1.5 g/L Biolyte 4-6, and 3 g/L dithiothreitol) (Bio-Rad) and loaded on 17 cm Immobiline DryStrips (pI 4-7, Bio-Rad). The first dimension was carried out on a Protean isoelectric focusing cell (Bio-Rad) at 20 °C using the following programmes: active rehydration for 11 hours at 50 V, 50-500 V for 30 minutes, 500 V for 1 hour, 500-1000 V for 1 hour, 1000 V for 30 minutes, 1000-3000 V for 1 hour, 3000 V for 30 minutes, 3000-8000 V for 1 hour 30 minutes and 8000 V for 7 hours 30 minutes. Equilibration was performed in two successive buffers (0,375 M Tris pH 8.8, 45 % urea, 2 % SDS, and 20 % glycerol), the first contained 10 g/L dithiothreitol (Bio-Rad) (15 minutes) and the second contained 50 g/L iodoacetamide (Bio-Rad) (20 minutes). The second-dimensional separation was performed on SDS-polyacrylamide gels composed of 12.5% acrylamide (Bio-Rad), 0.35 M Tris buffer pH 8.8, 10 g/L SDS, and traces of ammonium persulphate (Sigma) and Temed (Bio-Rad). Electrophoresis was conducted at

14 °C, with a 2-D Protean electrophoresis system (II XI cell, Bio-Rad) at 10 mA per gel, until the tracking dye migrated to the bottom of the gel. A protein marker (200 ng, Bio-Rad) was added to the gel.

After electrophoresis, gels were stained with a Coomassie blue solution (Bio-Rad) and scanned (GS800, Bio-Rad) to obtain the digital image of protein spots. The proteome analysis was performed with the 2-D image analysis software PDQuest 7.3.0 (Bio-Rad). Spot detection and matching was performed using an automated function, followed by manual designation of spots as landmarks of alignment of the gels. Molecular weights and isoelectric points of the proteins were interpolated from marker proteins coelectrophoresed with the sample. The proteome analysis of each sample was repeated three times from three different extractions. Each spot was matched among the different gels and the spot intensities were compared. The percentage volume was averaged for the three different replicate gels and Student's t-test analysis ( $p \leq 0.05$ ) was performed. The modifying factor (MF) was calculated as the ratio between the normalized intensity of the protein spot in the medium supplemented with amino acids and the normalized intensity of the same spot under the reference condition. The confidence threshold for over- and under-expression of protein spots was set at two-fold below or above the spot intensity seen in the yeast 2-D gel. Cytosolic proteins, which had their synthesis changed under different conditions, were analyzed by MALDI-TOF as described by Guillot *et al.* [17].

The monoisotopic mass lists characterizing each protein were searched against a *Y. lipolytica* public database, Genolevures (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/YALI/>), by using a local version of the MSFit program (<http://prospector.ucsf.edu>). The proteins were classified into functional groups according to the comprehensive yeast genome database (CYGD) at MIPS (<http://mips.gsf.de/proj/yeast/CYGD/db/>). The parameters used for the search were as follows: modifications were considered, allowing for one missed cleavage site; a protein mass range from 10 to 100 kDa was accepted. Positive identifications were accepted when at least five peptides matched, and at least 20% of the peptide coverage of the theoretical sequences matched within a mass accuracy of 50 ppm or 25 ppm with internal calibration.

#### **2.4 RNA isolation and transcriptomics**

Cultures were centrifuged for 5 minutes at 8200 x g and 4°C. The pellet was re-suspended into 1.25 mL of Trizol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and poured into 2-mL tubes containing 800 mg zirconium beads (diameter: 0.1 and 0.5 mm; BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA). The tubes were rigorously shaken in a bead beater (Fast-Prep<sup>®</sup>-24; MP Biomedicals, France) by using three 60-seconds mixing sequences at a speed of 6.5 m/s.



They were cooled on ice for 5 minutes before each mixing sequence. After centrifugation for 10 minutes at 12000 x g and 4°C, the supernatant was collected. It was transferred to a 2-mL tube (Phase Lock Gel™ Heavy: Eppendorf, Hamburg, Germany), and 230 µL of chloroform were added. The tubes were gently mixed by inversion and then centrifuged for 15 minutes at 12000 x g and 4°C. The aqueous phase was transferred to a fresh tube, and an equal volume of phenol:chloroform:isoamyl alcohol, pH 4.7 (Sigma), was added. Tubes were gently mixed by inversion and then centrifuged for 10 minutes at 12000 x g and 4°C. The upper phase was collected. An equal volume of 100% ethanol was added to the aqueous phase, after which purification with an RNeasy kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) was performed, according to the manufacturer's instructions. DNase treatment was done on RNA samples using DNase Turbo DNA-free™ Kit (Ambion, Austin, TX). RNA quality and quantification were analyzed using a NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and a Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA).

The RNA extraction and purification procedures are described above. The cDNAs were subsequently synthesized using the SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). A mix containing up to 5 µg total RNA, random nonamers and dNTP (10mM) was prepared and incubated at 65°C for 5 minutes, then placed on ice for at least 1 minute. The cDNA synthesis mix containing 10X RT buffer, MgCl<sub>2</sub> (25 mM), DTT (0.1 M), RNaseOUT™ (40 U/µL) and SuperScript™ III RT (200 U/µL) was added to each RNA/primer mixture and then incubated for 10 minutes at 25°C and then for 50 minutes at 50°C. The reaction was stopped by incubation for 5 minutes at 85°C.

Real-time PCR primers were designed to have a length of about 20-25 bases, a G/C content of over 50% and a T<sub>m</sub> of about 60°C. The length of the PCR products ranged between 90 and 150 bp. LightCycler™ software (Roche, Mannheim, Germany) was used to select primer sequences. All the primers were synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium) (supporting information).

SYBR green I PCR amplification was performed using a LightCycler (Roche). Amplification was carried out in a 10-µL (final volume) mixture containing 250 ng of RNA sample, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µM of primer, and 1 µL of LightCycler-FastStart DNA Master SYBR green I (Roche). Five dilutions of cDNA were made to determine the efficiencies of real-time PCR. A negative control without cDNA added was systematically included. The amplification procedure involved incubation at 95°C for 8 minutes for the initial denaturation, followed by 40 cycles consisting of: (i) denaturation at 95°C for 10 seconds; (ii) annealing at a temperature that was 5°C below the melting temperature of the primers for 7 seconds, (iii) extension at

72°C for 6 seconds, and (iv) fluorescence acquisition (530 nm) at the end of extension. The temperature transition rate was 20°C/second for each step. After real-time PCR, a melting curve analysis was performed by continuously measuring fluorescence during heating from 65 to 95°C at a transition rate of 0.1°C/second. The threshold cycle ( $C_T$ ) values were determined with LightCycler software (version 3.3), using the second derivative method. Standard curves were generated by plotting the  $C_T$  values as a function of the initial RNA concentration log. PCR efficiency ( $E$ ) was then calculated using the following formula:  $E=10^{-1/\text{slope}}$ . The actin gene [18] was chosen as a suitable internal control gene to normalize the results. The Pfaffl method [19] was used to calculate the fold change in transcript abundance normalized to the actin gene and relative to the sample collected before the amino acids addition.

### **2.5 Volatile compound analysis by dynamic headspace GC-MS**

Samples were thawed in an ice box and homogenized prior to analysis. Five milliliters of each sample (bacterial cultures and control) were analyzed. The volatile compounds in each culture sample were analyzed using a dynamic headspace analyzer (Purge and Trap concentrator, Tekmar-Dohrmann 3100, Tekmar, Cincinnati, OH, USA) coupled to a gas chromatograph (HP 6890, Hewlett Packard, Avondale, PA, USA) and a mass spectrophotometer detector (MSD 5972 quadrupole mass spectrometer, Hewlett Packard, Avondale, PA, USA) as previously described by Arfi *et al.* [20]. All volatile compounds were identified according to the comparison of their mass spectra with those obtained from two databanks (Wiley 275 K and NBS 75 k). Moreover, for each compound, the comparison of relative retention indices (RI) with information from the database [21] made it possible to confirm their identity. Triplicate measurements were made for each sample condition.

## **3 Results and discussion**

In this work, we monitored proteins induced before ( $AA^-$ ) and after ( $AA^+$ ) an amino acids addition in the yeast *Y. lipolytica*. Our results showed that in the  $AA^-$  medium, proteins involved in the defense mechanisms were mostly induced, while those involved in the amino acids and carbon catabolism in addition to protein biosynthesis were increased following the amino acids addition. Moreover, expression measurements of several selected genes complement the proteomic data with the up-regulation of *BAT2*, *PDC6* and *SSZ1*, following the amino acids addition. In addition, volatile compounds were also used as indicators of amino acids degradation.

### 3.1 Microbial and biochemical analysis.

The measurement of biomass and the percentage of residual amino acids or lactate in the two culture conditions of *Y. lipolytica* are shown in Fig. 1: AA<sup>-</sup> (Fig. 1A) and AA<sup>+</sup> (Fig. 1B).

**Biomass.** Biomass was measured in both media. Results showed that in the AA<sup>-</sup> medium, growth was limited with a final biomass of 0.602 g/L (Fig. 1A). In the AA<sup>+</sup> medium (Fig. 1B), growth was stimulated since the final biomass reached 2.16 g/L.

**Amino acids and lactate consumption.** In the AA<sup>-</sup> medium, only 13.5% of lactate was consumed at the end of *Y. lipolytica* growth. This result can be associated with the slow growth of the yeast due to amino acids starvation. In the AA<sup>+</sup> medium, 99.3% and 1.8% of amino acids and lactate, respectively, were consumed at 14 hours of culture. After amino acids depletion, lactate consumption increased and reached 39.1% at 65 hours of culture.

### 3.2 Comparative proteome analysis before and after the amino acids addition

In order to better assess the effects of amino acids supplementation on yeast cells growing in a medium containing lactate but free of amino acids (AA<sup>-</sup>), amino acids were added to a batch culture of *Y. lipolytica* grown on AA<sup>-</sup> medium for 56 hours. The proteome analysis was performed on *Y. lipolytica* cells before or 5 hours following the amino acids addition (Fig. 2, 3 and 4).

**General Considerations.** We identified 34 differentially-expressed proteins from gels containing  $491 \pm 35$  (in AA<sup>-</sup>, which is the reference condition) and  $506 \pm 45$  (in AA<sup>+</sup>) protein spots per gel (Fig. 2 and 4). Eleven proteins were amplified or only present under the AA<sup>-</sup> condition, whereas 23 proteins were amplified or only present under the AA<sup>+</sup> condition. As can be seen in Fig. 2, 12 proteins appear following the amino acids addition (Fig. 4A), and the synthesis of 11 proteins significantly increased ( $MF > 2$ ). Five hours following amino acids supplementation, two proteins disappeared (Fig. 4A) and the synthesis of nine proteins was lowered ( $MF \leq 2$ ) (Fig. 4B). The analysis of these proteins by MALDI-TOF made it possible to identify 32 of them. Proteins that were not identified have a small number of peptides detected which leads to a lowered probability to match with a protein from the database. Excerpts from 2D gel of protein extracts is also provided for eight proteins whose expression patterns were dramatically influenced by amino acids addition (Fig. 3, Tables 1 and 2). Five of these were up-regulated or only present under the AA<sup>+</sup> condition: BAT2, A14, PDC6, PCK1, SSZ1, and three proteins were up-regulated or only present under the AA<sup>-</sup> condition. A more complete comparative analysis of the protein expression patterns for both conditions and their expression ratios (Tables 1 and 2) show noticeable differences in the expression of

many metabolic enzymes before and after amino acids supplementation, reflected by the distribution of protein expression through the different functional categories. In AA<sup>-</sup>, the identified proteins with up-regulated expression are involved in cell rescue and defense. On the other hand, in AA<sup>+</sup>, the major fraction of the proteins with a higher expression level represents proteins involved in amino acids catabolism. It can also be observed that amino acids supplementation induces a response in the expression of proteins related to carbon metabolism, discussed below.

**Defense mechanisms.** Under AA<sup>-</sup> conditions, proteins such as CTT1, PRX1, GSY1 and TSA1, involved in defense mechanisms, were mainly induced. In the yeast *S. cerevisiae*, it has been shown that, starvation for essential amino acids could induce oxidative stress due to the accumulation of reactive oxygen species (ROS) [8]. Oxygen is a highly reactive molecule and can be partially reduced to form a number of chemically-reactive agents known as ROS that include hydroxyl radical (HO<sup>•</sup>), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and superoxide anions (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). These forms of oxygen are highly damaging to cellular constituents, including DNA, lipids and proteins. The formation of ROS linked to the mitochondrial respiratory chain is the main source of oxygen radicals.

Owing to the toxicity of such highly reactive molecules, cells of all aerobic organisms possess an efficient oxidant defense system. The CTT1 (EC 1.11.1.6) up-regulated protein encodes a cytosolic catalase that catalyses the breakdown of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. It has been shown that in the yeast *S. cerevisiae*, *CTT1* gene expression is induced by oxidative stress and nutritional starvation [22]. Furthermore, TSA1 and PRX1, two proteins encoding thioredoxin peroxidase are also induced. Derek *et al.* [22] showed that, in *S. cerevisiae*, thioredoxin peroxidase levels are increased about two-fold in response to growth in the presence of 95% O<sub>2</sub> and that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is reduced. Moreover, the mitochondrial protein PRX1 appears to use the mitochondrial thioredoxin system as an electron donor against oxidative stress generated by mitochondrial metabolism [23]. The GCY1 encoding an aldo-keto reductase is also known to be involved in the modulation of stress response in the yeast *S. cerevisiae* [24].

The proteome analysis of *Y. lipolytica* in the AA<sup>-</sup> medium showed that this yeast produced antioxidant enzymes such as catalase, peroxidase and thioredoxin to protect essential cellular components against oxidative modifications.

Under AA<sup>+</sup> conditions, we observed an induction of three heat shock proteins: SSC1, SSZ1 and SSB1. SSC1 encodes a chaperone protein of the HSP70 family, which is localized in the mitochondria, while SSB1 and SSZ1 are cytosolic. HSP70 is a large family of proteins whose main function is to serve as molecular chaperones, binding unfolded peptides to assist in proper folding and prevent aggregation/misfolding [25, 26]. HSP70s are also involved in

disassembling aggregates of misfolded proteins, translocating selected proteins into the mitochondria and ER, and degrading aberrant proteins [25, 27]. It has been reported in the yeast *S. cerevisiae* that the addition of amino acids can induce protein synthesis. Our observations are in agreement with data reported by Pham *et al.* [28], showing that the accumulation of heat-shock proteins may play a role in protecting the protein biosynthesis machinery.

**Amino acids metabolism.** A number of proteins related to amino acids catabolism and conversion, as well as to protein expression, are up-regulated under the AA<sup>+</sup> condition. These findings are in accordance with the general trend, a decrease in metabolic functions when *Y. lipolytica* is grown in AA<sup>-</sup> medium. Three proteins involved in amino acids catabolism were identified: LEU4, LYS1 and BAT2. LEU4 (EC 2.3.3.13) is an  $\alpha$ -isopropylmalate synthase, which is the main isozyme responsible for the conversion of  $\alpha$ -isopropylmalate into keto-isovalerate [29] in the leucine pathway. The LYS1 protein, which encodes a saccharopine dehydrogenase (EC 1.5.1.7), an enzyme involved in the lysine catabolism, was also up-regulated under AA<sup>+</sup> conditions. This enzyme could catalyze the conversion of L-lysine to saccharopine and NAD<sup>+</sup>[30]. The cytosolic branched-chain amino acid transaminase BAT2 (EC 2.6.1.42) was also induced. This protein catalyzes the conversion of the amino acids, valine, isoleucine and leucine, to their corresponding  $\alpha$ -keto-acids [31]. It has also been shown that a branched-chain aminotransferase could also convert methionine to volatile sulfur compounds in *Y. lipolytica* [10, 11].

An enzyme, HIS3, involved in amino acids biosynthesis was also identified. This enzyme encodes an imidazoleglycerol-phosphate dehydratase (EC 4.2.1.19), which catalyzes the sixth step of histidine biosynthesis [32]. In addition, a protein SAH1 involved in the methionine biosynthetic pathway was up-regulated. SAH1 encodes an *S*-adenosyl-L-homocysteine hydrolase (EC 3.3.1.1.), which is a key enzyme of methylation metabolism in different molecule classes including DNA, RNA, proteins, phospholipids and sterols [33]. This observation suggests that amino acids supplementation induces protein synthesis in *Y. lipolytica*.

**Protein synthesis and fate.** Under AA<sup>+</sup> conditions, we observed the up-regulation of two translational elongation factors: TEF4 (EF-1 $\gamma$ ) and TUF1 (EF-Tu). Two enzymes involved in the protein fate were also up-regulated, a general transcription factor EGD1 [34] and RNA1, which is a GTPase-activating protein involved in nuclear transport [35]. As expected, amino acids supplementation enhances protein biosynthesis by increasing the expression of protein involved in the translation and elongation steps.

**Carbon metabolism.** Several proteins related to carbon metabolic enzymes were up-regulated under AA<sup>+</sup> conditions. The protein PDC6 encodes a pyruvate decarboxylase (EC 4.1.1.72), an enzyme that catalyzes the degradation of pyruvate into acetaldehyde and carbon dioxide. PDC6 can also contribute to the catabolism of the amino acids, isoleucine, phenylalanine, tryptophan and valine [36]. In addition, PCK1, a phosphoenolpyruvate carboxykinase (EC 4.1.1.49), is also induced. PCK1 is a key enzyme in gluconeogenesis and catalyzes early reaction in carbohydrate biosynthesis. Furthermore, we found an induction of the INO1 protein under AA<sup>+</sup> conditions. This protein encodes an inositol 1-phosphate synthase (EC 5.5.1.4). The induction of INO1 is not unexpected following the amino acids addition since a previous study demonstrated that nitrogen limitation caused *INO1* repression [37]. Additionally, the IDP2 protein, which encodes a cytosolic NADP-specific isocitrate dehydrogenase (EC 1.1.1.42), is up-regulated under AA<sup>+</sup> conditions [38]. The detected up-regulation can probably be explained by an increased demand for NADPH for the ROS detoxification systems.

The proteomic data described here show that yeast cells reorganize their metabolism after amino acids addition to amino acids catabolism processes, leading to a higher induction of protein related to the biosynthesis machinery. Although a proteomic approach allows an overview of the proteins before and after the amino acids addition, we evaluated the expression of genes encoding target metabolism.

### **3.3 RT-PCR analyses 30 minutes after the amino acids addition in *Y. lipolytica* culture**

In order to complement proteomic results, a transcriptomic approach was performed using real-time quantitative PCR on some genes encoding induced proteins. In fact, only cytosolic proteins are revealed in the 2-D analysis. The expression of 2 genes, *JEN1* and *GAP1*, respectively encoding for membrane proteins involved in the lactate and amino acids transport were also studied. The expression levels of a total of 9 genes encoding for cytosolic proteins (*BAT2*, *PDC6*, *SSZI*, *PRX1*, *CTT1*, *SAHI*, *TSAI*, *JEN1*, *GAP1*) were measured (Table 3) before and 30 minutes following the amino acids addition. The comparison of the transcriptome and proteome data revealed a concordance of the observed effect for only three genes (Table 3). In fact, the expressions levels of *BAT2*, *PDC6*, *SSZI* (selected from the proteins induced after the amino acids addition) *GAP1* and *JEN1* (membrane proteins) increased up to 304.6, 27.3, 10.9, 71.7 and 3.8 fold, respectively, under AA<sup>+</sup> condition compared to AA<sup>-</sup> conditions. For the *PRX1*, *CTT1*, *SAHI* and *TSAI* genes, the mRNA was not detected. In fact, the mRNA concentration may be poorly related to the protein concentration

due to post-transcriptional modifications [5, 39]. These observations revealed an induction of carbon and amino acids metabolism under the AA<sup>+</sup> condition compared to the AA<sup>-</sup> conditions. In fact, a change in nitrogen availability may induce a response in carbon fixation pathways, most likely to maintain the carbon to nitrogen (C/N) ratio at a steady level [6]. Furthermore, it confirms the induction of protein synthesis under AA<sup>+</sup> conditions by the up-regulation of the HSP70 protein SSZ1 involved in proper folding and the prevention of aggregation/misfolding [25, 26].

### **3.4. Volatile compound analysis by dynamic headspace/GC-MS**

The catabolism of branched-chain amino acids (leucine, valine and isoleucine), aromatic amino acids (phenylalanine, tyrosine and tryptophan), and the sulfur-containing amino acid, methionine, leads to the formation of aldehydes, acids and alcohols through the Ehrlich pathway [40]. Such compounds have been shown to play an important role in aroma compound production during cheese ripening [9]. Amino acids also represent the major source of nitrogen and carbon in the yeast *Y. lipolytica* [12]. The analysis of catabolic volatile compounds produced under the different culture conditions provided a good indicator of amino acids catabolism.

The production of volatile compounds was measured before and after amino acids addition. The medium containing amino acids was, by far, the most efficient at producing volatile compounds. The most frequently produced volatile compounds were ketones (2-propanone, 2-butanone), alcohols and dimethyldisulfide (DMDS). The DMDS produced from methionine oxidation products, methional and methanethiol [9], is an indicator of methionine catabolism. An indicator for leucine degradation, 3-methylbutanal, was also identified. This compound is associated with a spicy chocolate-like flavor in Parmesan, and with malty flavor in Swiss cheeses [41]. In Emmental cheese, 3-methylbutanal was among the most potent aroma compounds detected [9].

#### 4. Concluding remarks

We have studied the response in protein abundance when *Y. lipolytica* is subjected to different amino acids availability. We have identified thirty four differentially expressed proteins in gels containing an average of  $491 \pm 35$  (in AA<sup>-</sup>) and  $506 \pm 45$  (in AA<sup>+</sup>) proteins spots per gel. The proteins induced in AA<sup>+</sup> medium are mainly involved in carbon metabolism, amino acids catabolism and protein biosynthesis. Conversely, proteins involved in the defense mechanisms are highly expressed in the AA<sup>-</sup> medium.

The expression of three genes encoding BAT2, PDC6 and SSZ1 proteins confirmed that gene expression significantly varies between AA<sup>-</sup> and AA<sup>+</sup> conditions. These observations strongly suggest the induction of genes involved in amino acids and carbon catabolism, together with protein synthesis.

Flavor compound analysis confirmed the induction of amino acids catabolism by *Y. lipolytica*, with the most efficient production of volatile compounds in the AA<sup>+</sup> medium, which is in accordance with the recognized importance of the role of amino acids in volatile compound production in cheese ripening.

*Soulaf Mansour is grateful to the ABIES Doctoral School for her Ph.D. scholarship.*

*We would like to thank A. Delile, C. Durrieu, J. Colle and P. Courtin for their excellent technical assistance. We are also grateful to the PAPSS, the French Platform for Proteomic Analysis through Sequencing and Mass Spectrometry.*

*The authors have declared no conflict of interest.*



## 5 References

- [1] Mounier, J., Monnet, C., Vallaëys, T., Arditi, R., *et al.*, Microbial interactions within a cheese microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, 74, 172-181.
- [2] Eisler, H., Fröhlich, K.-U., Heidenreich, E., Starvation for an essential amino acid induces apoptosis and oxidative stress in yeast. *Exp. Cell. Res.* 2004, 300, 345-353.
- [3] Yvon, M., Rijnen, L., Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *I. Dairy. J.* 2001, 11, 185-201.
- [4] Cernat Bondar, D., Beckerich, J.-M., Bonnarme, P., Involvement of a branched-chain aminotransferase in production of volatile sulfur compounds in *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 4585-4591.
- [5] Cholet, O., Henaut, A., Hebert, A., Bonnarme, P., Transcriptional analysis of L-methionine catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica* in relation to volatile sulfur compound biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, 74, 3356-3367.
- [6] Mansour, S., Beckerich, J. M., Bonnarme, P., Lactate and amino acid catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, 74, 6505-6512.
- [7] Morín, M., Monteoliva, L., Insenser, M., Gil, C., Domínguez, Á., Proteomic analysis reveals metabolic changes during yeast to hypha transition in *Yarrowia lipolytica*. *J. Mass Spectrom.* 2007, 42, 1453-1462.
- [8] Otto, R., Ten Brink, B., Veldkamp, H., Konings, W. N., The relationship between growth rate and electrochemical proton gradient of *Streptococcus cremoris*. *FEMS Microbiol Lett* 1983, 16, 69-74.
- [9] Leclercq-Perlat, M. N., Oumer, A., Bergere, J. L., Spinnler, H. E., Corrieu, G., Behavior of *Brevibacterium linens* and *Debaryomyces hansenii* as ripening flora in controlled production of smear soft cheese from reconstituted milk: growth and substrate consumption dairy foods. *J Dairy Sci* 2000, 83, 1665-1673.
- [10] Grunau, J. A., Swiader, J. M., Chromatography of 99 amino acids and other ninhydrin-reactive compounds in the Pickering lithium gradient system. *J. Chromato A.* 1992, 594, 165-171.
- [11] Guillot, A., Gitton, C., Anglade, P., Mistou, M.-Y., Proteomic analysis of *Lactococcus lactis*, a lactic acid bacterium. *Proteomics* 2003, 3, 337-354.
- [12] Blanchin-Roland, S., Costa, G. D., Gaillardin, C., ESCRT-I components of the endocytic machinery are required for Rim101-dependent ambient pH regulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiol.* 2005, 151, 3627-3637.

- [13] Pfaffl, M. W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.* 2001, 29, e45-.
- [14] Arfi, K., Amarita, F., Spinnler, H.-E., Bonnarme, P., Catabolism of volatile sulfur compounds precursors by *Brevibacterium linens* and *Geotrichum candidum*, two microorganisms of the cheese ecosystem. *J. Biotechnol.* 2003, 105, 245-253.
- [15] Kondjoyan N, JL, B., *A compilation of relative retention indices for the analysis of aromatic compounds*, Station de recherche sur la viande, INRA de Theix, Saint Genes Champanelle 1996.
- [16] Derek, J. J., Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1998, 14, 1511-1527.
- [17] Pedrajas, J. R., Miranda-Vizueté, A., Javanmardy, N., Gustafsson, J.-A., Spyrou, G., Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 16296-16301.
- [18] Chang, Q., Harter, T. M., Rikimaru, L. T., Petrash, J. M., Aldo-keto reductases as modulators of stress response. *Chemico-Biological Interact.* 2003, 143-144, 325-332.
- [19] Becker, J., Craig, E. A., Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem* 1994, 219, 11-23.
- [20] Bukau, B., Horwich, A. L., The Hsp70 and Hsp60 Chaperone machines. *Cell* 1998, 92, 351-366.
- [21] Voos, W., Röttgers, K., Molecular chaperones as essential mediators of mitochondrial biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Mol. Cell Res.* 2002, 1592, 51-62.
- [22] Pham, T. K., Wright, P. C., The Proteomic Response of *Saccharomyces cerevisiae* in Very high glucose conditions with amino acid supplementation. *J. Proteome Res.* 2008, 7, 4766-4774.
- [23] Kohlhaw, G. B., Leucine biosynthesis in fungi: Entering metabolism through the back door. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003, 67, 1-15.
- [24] Zabriskie, T. M., Jackson, M. D., Lysine biosynthesis and metabolism in fungi. *Nat. Prod. Rep.* 2000, 17, 85-97.
- [25] Lilly, M., Bauer, F. F., Styger, G., Lambrechts, M. G., Pretorius, I. S., The effect of increased branched-chain amino acid transaminase activity in yeast on the production of higher alcohols and on the flavour profiles of wine and distillates. *FEMS Yeast Res* 2006, 6, 726-743.

- [26] Pearce, D. A., Sherman, F., Toxicity of copper, cobalt, and nickel salts is dependent on histidine metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 1999, *181*, 4774-4779.
- [27] Tehlivets, O., Hasslacher, M., Kohlwein, S. D., S-Adenosyl--homocysteine hydrolase in yeast: key enzyme of methylation metabolism and coordinated regulation with phospholipid synthesis. *FEBS Lett.* 2004, *577*, 501-506.
- [28] Shi, X., Parthun, M. R., Jaehning, J. A., The yeast EGD2 gene encodes a homologue of the  $\alpha$ -NAC subunit of the human nascent-polypeptide-associated complex. *Gene* 1995, *165*, 199-202.
- [29] Hayashi, N., Kobayashi, M., Shimizu, H., Yamamoto, K.-i., *et al.*, Mutations in Ran system affected telomere silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2007, *363*, 788-794.
- [30] Dickinson, J. R., Salgado, L. E. J., Hewlins, M. J. E., The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 2003, *278*, 8028-8034.
- [31] Graves, J. A., Henry, S. A., Regulation of the yeast INO1 gene: The products of the INO2, INO4 and OPI1 regulatory genes are not required for repression in response to inositol. *Genetics* 2000, *154*, 1485-1495.
- [32] Haselbeck, R. J., McAlister-Henn, L., Function and expression of yeast mitochondrial NAD- and NADP-specific isocitrate dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* 1993, *268*, 12116-12122.
- [33] Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R., Aebersold, R., Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 1999, *19*, 1720-1730.
- [34] Herve-Jimenez, L., Guillouard, I., Guedon, E., Gautier, C., *et al.*, Physiology of *Streptococcus thermophilus* during the late stage of milk fermentation with special regard to sulfur amino-acid metabolism. *Proteomics* 2008, *8*, 4273-4286.
- [35] Selao, T. T., Nordlund, S., Norén, A., Comparative proteomic studies in *Rhodospirillum rubrum* grown under different nitrogen conditions. *J. Prot. Res.* 2008, *7*, 3267-3275.
- [36] Hazelwood, L. A., Daran, J.-M., van Maris, A. J. A., Pronk, J. T., Dickinson, J. R., The Ehrlich Pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, *74*, 2259-2266.
- [37] Juan, B., Barron, L. J. R., Ferragut, V., Trujillo, A. J., Effects of high pressure treatment on volatile profile during ripening of ewe milk cheese. *J. Dairy Sci.* 2007, *90*, 124-135.

Figure 1. Percentage in the supernatant of lactate and amino acids measured in *Y. lipolytica* 1E07 culture, and biomass under AA<sup>-</sup> (A) and AA<sup>+</sup> (B) conditions.

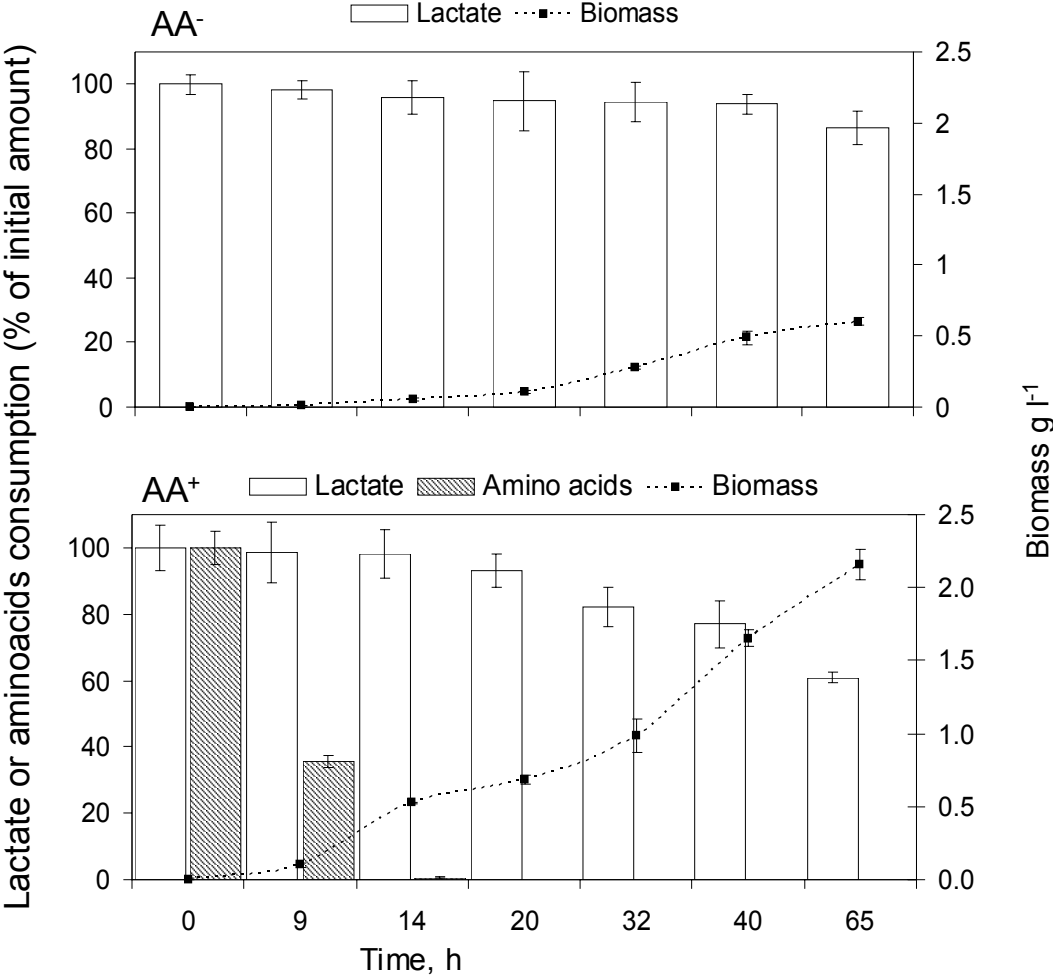


Figure 2. 2-D gel of *Y. lipolytica* 1E07 cytoplasmic yeast extracts before (A) and after (B) the amino acids supplementation. Symbols show proteins differentially expressed (○, protein found in the 2 conditions, □, protein present only in one condition). Identified spots are numbered according to tables 1 and 2.

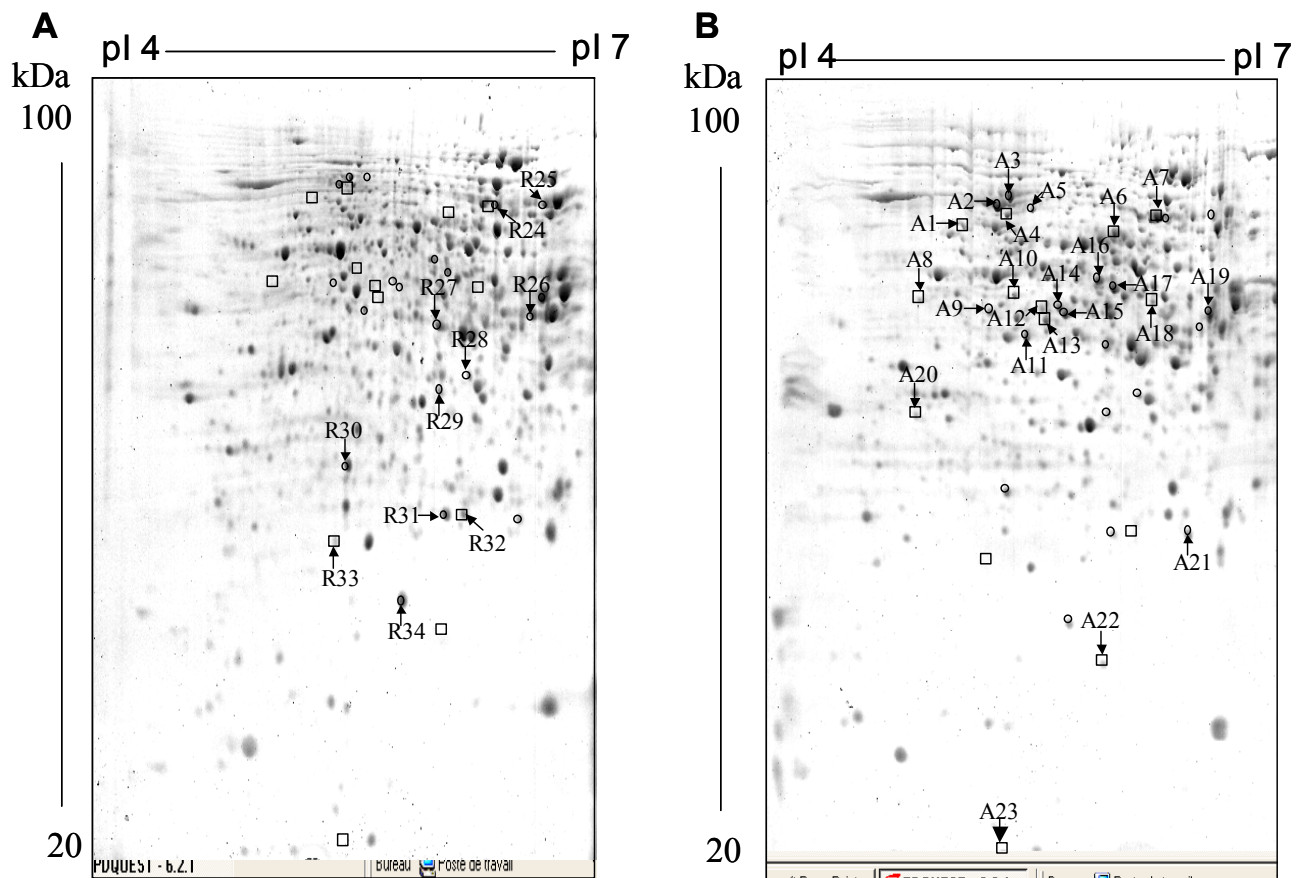


Figure 3. Enlarged sectors of 2-D *Y. lipolytica* gels indicating several identified proteins that showed changes in their expression levels following amino acids addition. Yeast map is shown before (on the left) and after (on the right) amino acids supplementation. Graphs show the normalized amount of protein for each spot. Values are mean  $\pm$  SD for triplicate assays. Arrows indicate the location of the protein of interest. Normalized protein amount was calculated according to the PDQuest 2-D Gel Analysis Software (Bio-Rad, version 7.3.0). In the normalization method, the raw quantity of each spot in a member gel is divided by the total quantity of all the spots in that gel that have been included to the standard.

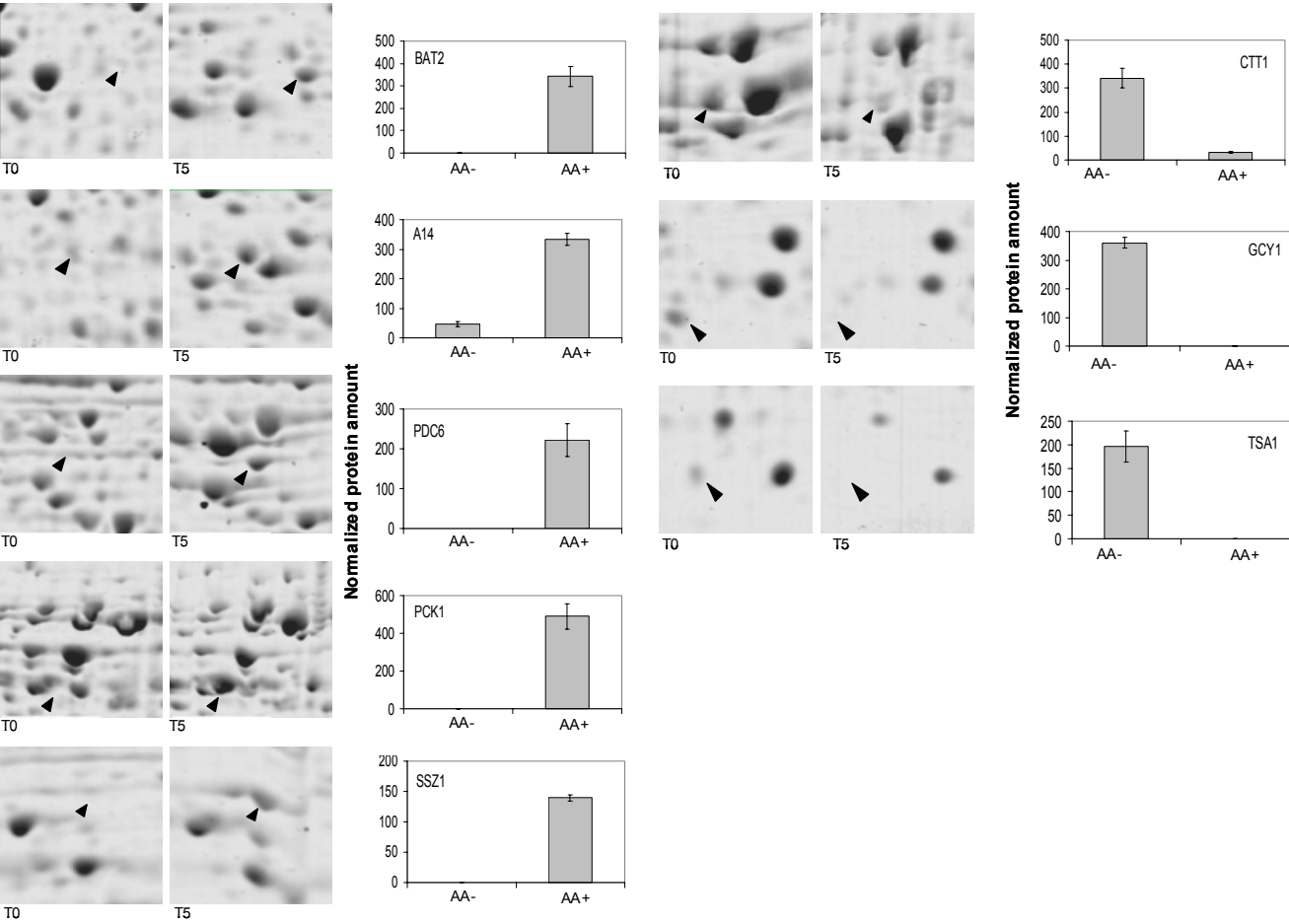


Figure 4. Cytosolic proteins of *Y. lipolytica* 1E07 cells recovered only at AA<sup>-</sup> (Δ) or AA<sup>+</sup> (▲) (A). Down-regulated (○), up-regulated (●) and not differentially produced proteins (▲) in AA<sup>+</sup> vs. AA<sup>-</sup> conditions are shown in (B). Normalized protein amount was calculated according to the PDQuest 2-D Gel Analysis Software (Bio-Rad, version 7.3.0). In the normalization method, the raw quantity of each spot in a member gel is divided by the total quantity of all the spots in that gel that have been included to the standard.

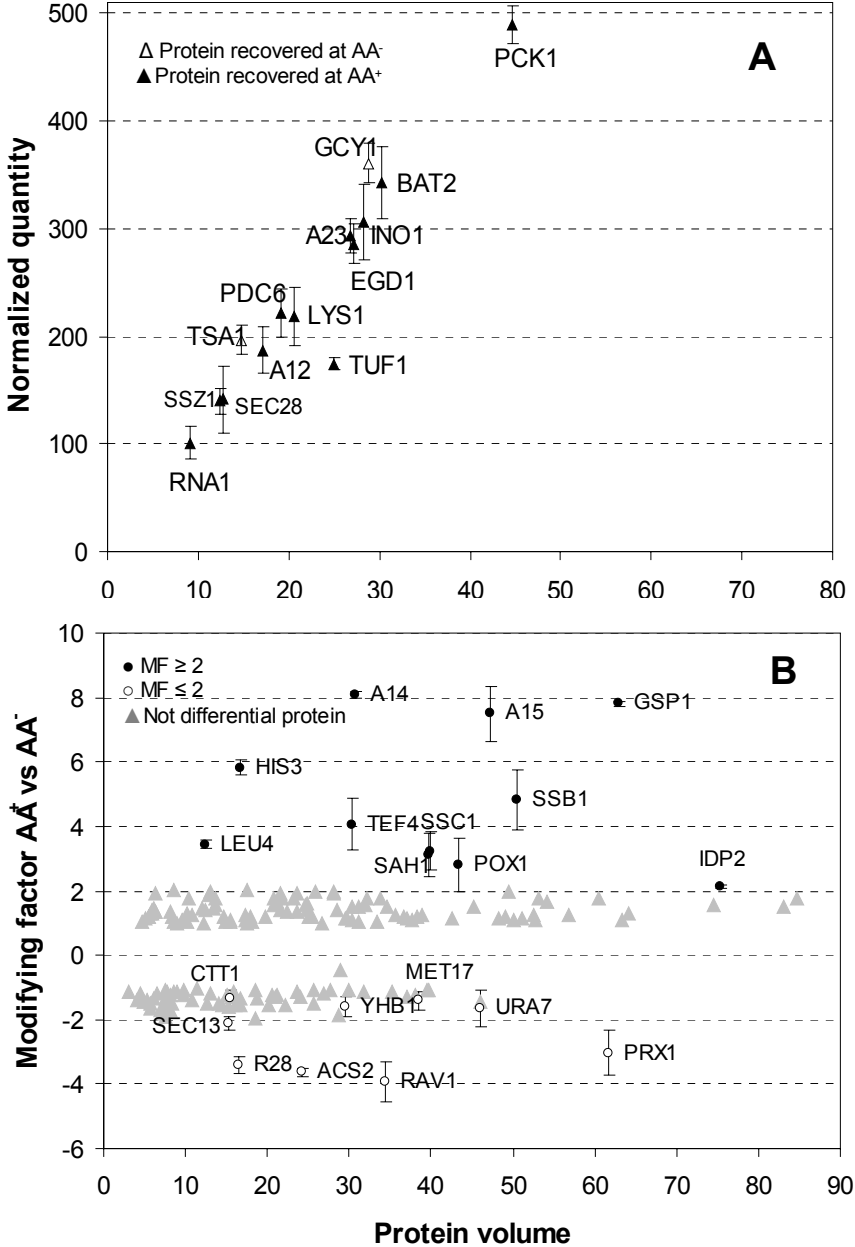


Table 1: Up-regulated proteins after the amino acids addition.

The modifying factor was calculated as the ratio between the normalized intensity of the protein spot in the medium supplemented with amino acids (AA+) and the normalized intensity of the same spot under the reference condition (AA-).

Spot no.	Isoelectric point	Molecular weight (Kda)	Modifying factor AA <sup>+</sup> vs AA <sup>-</sup>	Function or homology	Gene name	MOWSE score	Coverage (%)	Identified peptides
<i>Amino acid metabolism</i>								
A5	5.17	63.9	3.44	Alpha-isopropylmalate synthase	LEU4	$1.18 \times 10^9$	33	16
A9	5	42.5	5.72	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	HIS3	$1.82 \times 10^5$	20	7
A10	5.12	40.6	T5	Saccharopine dehydrogenase	LYS1	$7.01 \times 10^4$	23	8
A13	5.22	40.9	T5	Branched chain amino acid aminotransferase	BAT2	$1.29 \times 10^4$	11	5
A14	5.9	44.8	7.09	Isovaleryl-coenzyme A dehydrogenase	-	$9.50 \times 10^{12}$	52	21
A17	5.59	49	3.10	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	SAH1	$4.64 \times 10^8$	35	20
<i>Carbon and carbohydrate metabolism</i>								
A4	5.11	66.2	T5	Pyruvate decarboxylase	PDC6	$9.79 \times 10^9$	35	15
A6	5.53	58.2	T5	Inositol-1-phosphate synthase	INO1	$1.14 \times 10^9$	36	16
A7	5.66	62.04	T5	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	PCK1	$1.49 \times 10^{12}$	47	22
A19	6.35	48.8	2.14	NADP-Isocitrate dehydrogenase	IDP2	$1.31 \times 10^{11}$	47	24
<i>Lipid metabolism</i>								
A11	5.73	45.9	2.79	Fatty-acyl coenzyme A oxidase	POX1	$6.50 \times 10^9$	43	18
<i>Protein fate</i>								
A8	4.61	42.9	T5	GTPase activating protein	RNA1	$1.73 \times 10^5$	17	9
A22	5.51	17.29	T5	DNA-binding enhancer protein	EGD1	$8.89 \times 10^3$	29	4
<i>Vesicular function</i>								
A20	4.75	19.3	T5	Regulates Golgi-to-ER protein traffic	SEC28	$4.62 \times 10^5$	44	7
<i>Cell rescue, defense and virulence</i>								
A1	4.94	56.3	T5	Hsp70 protein	SSZ1	$2.07 \times 10^{15}$	67	26
A2	5.12	66.2	6.34	Hsp70 protein	SSB1	$2.44 \times 10^{13}$	50	24
A3	5.26	68.6	3.24	Hsp70 protein	SSC1	$1.86 \times 10^{13}$	50	25
<i>Protein synthesis</i>								
A16	5.45	45	3.20	Translation elongation factor	TEF4	$4.14 \times 10^6$	36	13
A18	6.16	46.6	T5	Translation elongation factor	TUF1	$2.71 \times 10^8$	38	13
<i>Transcription</i>								
A21	6.11	24.16	7.80	GTP-binding protein	GSP1	$2.63 \times 10^5$	45	8
<i>Poorly or not characterized</i>								
A12	5.37	44.2	T5	Not identified	-	-	-	-
A15	5.37	44.2	7.51	4-Hydroxyphenylpyruvate hydroxylase	-	$5.46 \times 10^9$	39	15
A23	5.25	13.64	T5	Not identified	-	-	-	-

*Ai* indicates proteins whose intensities were greater after the amino acids addition



T5: Protein presents only 5 h after the amino acids addition

Table 2: Down-regulated proteins after the amino acids addition

The modifying factor was calculated as the ratio between the normalized intensity of the protein spot in the medium supplemented with amino acids (AA+) and the normalized intensity of the same spot under the reference condition (AA-).

Spot no.	Isoelectric point	Molecular weight (Kda)	Modifying factor AA <sup>+</sup> vs AA <sup>-</sup>	Function or homology	Gene name	MOWSE score	Coverage (%)	Identified peptides
<i>Cell rescue, defense and virulence</i>								
R25	6.1	59.9	0.20	Cytosolic catalase T	CTT1	$1.35 \times 10^{11}$	40	16
R27	5.7	41.4	0.39	Flavo-hemoglobin	YHB1	$2.48 \times 10^9$	43	16
R30	6.3	28.2	0.39	Mitochondrial isoform of thioredoxin peroxidase	PRX1	$5.14 \times 10^6$	45	11
R32	5.7	36.2	T0	Galactose induced protein of aldo/keto reductase family	GCY1	$3.73 \times 10^6$	35	11
R33	5.3	21.4	T0	Thioredoxin peroxidase	TSA1	$6.98 \times 10^6$	57	10
<i>Vacuolar function</i>								
R34	5.3	21.1	0.28	Regulator of (H <sup>+</sup> )-ATPase in vacuolar membrane	RAV1	$2.44 \times 10^3$	6	6
<i>Cellular transport</i>								
R29	5.5	32.7	0.35	Protein transport protein	SEC13	$2.26 \times 10^4$	25	6
<i>Amino acid metabolism</i>								
R26	6	45.9	0.44	O-acetylhomoserine sulfhydrylase	MET17	$9.94 \times 10^7$	40	11
<i>Carbon and carbohydrate metabolism</i>								
R24	6	72.3	0.29	Acetyl-coenzyme A synthetase	ACS2	$4.48 \times 10^{15}$	48	29
<i>Nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism</i>								
R31	5.9	23.3	0.35	CTP- synthase 1	URA7	$5.77 \times 10^5$	50	9
<i>Poorly or not characterized</i>								
R28	6.06i	41.5	0.26	Not identified	-	$1.65 \times 10^4$	10	8

*Ri* indicates proteins whose intensities were greater before the amino acids addition (in the reference gel)

T0: Protein present before the amino acids addition

Table 3: Analysis by RT-qPCR of the expression of target genes. The expression levels was calculated by comparing the expression of the gene before (reference condition) and 30 minutes following the amino acids addition.

Gene name	Expression level
<i>BAT2</i>	304.57 ± 70
<i>PDC6</i>	27.32 ± 8
<i>SSZ1</i>	10.91 ± 4
<i>JEN1</i>	3.78 ± 0.7
<i>GAP1</i>	71.75 ± 17
<i>PRX1</i>	nd
<i>CTT1</i>	nd
<i>SAH1</i>	nd
<i>TSA1</i>	nd

nd: not detected

### II. 2. 3. Bilan de l'étude de la levure *Yarrowia lipolytica* en mono-culture

La levure *Y. lipolytica* n'a, pour l'instant, jamais été utilisée comme flore d'affinage, mais est systématiquement retrouvée dans les fromages à pâte molle et à croûte lavée. Cette levure étant connue pour ses qualités protéolytique et lipolytique, son utilisation par certains fabricants fromagers a montré que dans la majorité des cas, sa présence empêcherait la croissance des autres micro-organismes inoculés. L'étude de *Y. lipolytica* en monoculture a donc pour but une meilleure connaissance de son activité métabolique vis-à-vis des sources d'azote et/ou de carbone. La souche *Y. lipolytica* 1E07 a été isolée du Livarot.

La source principale d'azote retrouvée dans le fromage est essentiellement constituée d'acides aminés dont la quantité est très variable et ne peut être connue précisément. La concentration des acides aminés libres est dépendante de divers paramètres tels que i) l'activité protéolytique de divers micro-organismes, ii) leur capacité à consommer les acides aminés iii) le temps d'affinage. Afin de réaliser l'étude du métabolisme de la levure *Y. lipolytica*, deux concentrations en acides aminés ont été retenues de manière à se rapprocher des concentrations déjà calculés à différents temps dans un fromage de type Camembert.

Initialement cette étude devait être réalisée en utilisant une approche transcriptomique globale par puce à ADN, couplé à des analyses biochimiques. Cette approche aurait dû permettre de connaître l'expression de l'ensemble des gènes de la levure face à la variation des sources d'azote et de carbone. Hélas, l'utilisation des puces à ADN ainsi que la mise au point du protocole de marquage des ARN de la levure s'est avéré très complexe. En effet, différents kits de marquage direct ou indirect de l'ARN ont été testés, en utilisant uniquement des Oligo-dT ; ces différents tests ne se sont pas avérés concluants. De plus, le « spotting » des oligonucléotides (60-mers) sur les puces de *Y. lipolytica* s'est avéré de mauvaise qualité sur plusieurs lots, ce qui a mis un frein supplémentaire à l'utilisation de cette approche. Afin de surpasser ces problèmes, il a été indispensable de remplacer l'approche puce à ADN par une approche plus ciblée par RT-PCR quantitative, sur des gènes impliqués dans des métabolismes d'intérêts. Au vu des résultats biochimiques, des gènes clés du métabolisme du lactate et des acides aminés ont été sélectionnés en se basant à la fois sur des études antérieures menées au laboratoire ainsi que sur des travaux réalisés sur la levure *S. cerevisiae*. L'analyse par RT-PCR quantitative a été réalisée en comparant l'expression des gènes cibles avant et 15, 30 et 60 min après ajout d'acides aminés.

Afin d'aller plus loin dans cette étude et de combler le manque d'information concernant l'analyse transcriptomique (limitée à l'étude de l'expression d'un nombre limité

de gènes), il nous a semblé intéressant de compléter ce travail une étude protéomique de la levure en comparant l'abondance des protéines avant et après ajout d'acides aminés. Pour cela, trois temps de prélèvements des protéines ont été initialement choisis. Un premier temps avant ajout d'acides aminés (T0) et deux prélèvements à une (T1) et cinq heures (T5) après l'ajout d'acides aminés. Le choix des temps T1 et T5 a été effectué en considérant que la synthèse protéique nécessite un temps supérieur à l'expression des gènes. Des résultats concluants ont été obtenus uniquement pour les temps T0 et T5. Malgré la répétition de l'analyse protéomique pour le temps T1, les résultats se sont avérés inexploitable. Pour cela, l'approche protéomique a été réalisée en comparant uniquement le temps T0 au T5.

Cette étude a toutefois permis de mettre en évidence une réelle capacité d'adaptation de la levure face à des variations de source de carbone et d'azote.

## **II. 3. Etude transcriptomique de la levure *Y. lipolytica* 1E07 en association avec deux bactéries : *L. lactis* LD61 et *S. xylosus* C2a**

### II. 3. 1. Etude de l'association dans un milieu chimiquement défini (MCD)

#### II. 3. 1. 1. Résumé

L'écosystème fromager est un milieu complexe où les bactéries, levures et moisissures sont en interaction. L'activité métabolique de chaque micro-organisme dépend à la fois de l'écosystème (et donc des micro-organismes qui le composent), des interactions générées et des paramètres physico-chimiques. Les études des micro-organismes en mono-culture reflètent rarement leurs facultés à s'adapter dans l'écosystème fromager. De plus la majorité des études réalisées dans un écosystème aborde le plus souvent la question de la diversité des micro-organismes et non leur fonctionnalité. L'utilisation de l'approche transcriptomique pour l'étude des interactions microbiennes demeure un véritable défi du fait de la difficulté d'extraction de l'ARNm et la possibilité d'hybridation croisée entre les différents micro-organismes.

La levure ubiquitaire *Y. lipolytica* se trouve souvent en association avec des lactocoques et des staphylocoques [1, 2]. L'étude transcriptomique de la levure en interaction nécessite un choix de souches dont les génomes soient séquencés. Deux bactéries ont été sélectionnées pour cette étude. Une bactérie lactique, *Lactococcus lactis* LD61 a été retenue, cette dernière est retrouvée dans de nombreux produits fermentés [3-6]. Le principal rôle de la bactérie lactique est l'acidification du produit par production d'acide lactique. Concernant le staphylocoque, la souche *S. xylosus* C2a a été retenue. Cette bactérie est principalement utilisée dans la fabrication du saucisson du fait de ses propriétés organoleptiques [7, 8]. Dans le but de s'affranchir des complications de l'étude transcriptomique en association, en particulier en ce qui concerne l'extraction d'ARN, un milieu liquide de culture chimiquement défini (MCD) a été dans un premier temps choisi pour l'étude en co-culture. De plus l'étude transcriptomique est réalisée à l'aide d'une approche ciblée sur des gènes d'intérêt, par RT-PCR quantitative.

Les résultats microbiologiques mettent en évidence un effet de la présence de *L. lactis* LD61 et/ ou de *S. xylosus* C2a sur la croissance de la levure. Notons que c'est en présence du staphylocoque que la croissance de la levure est la plus faible. Concernant la croissance du *S. xylosus* C2a, on observe un arrêt de croissance en association avec la levure et la bactérie lactique. Aucun effet des différentes associations sur la croissance de *L. lactis* LD61 n'a été

observé. Les résultats biochimiques ont montré une consommation du lactose et une production d'acide lactique par les deux bactéries.

Afin de déterminer l'effet des différentes associations sur le métabolisme des trois micro-organismes, l'expression de gènes impliqués dans les métabolismes du glucose, du lactate et des acides aminés ont été suivis par RT-PCR quantitative. Les résultats ont permis de mettre en évidence une induction de la lactate déshydrogénase *CYB2* chez la levure *Y. lipolytica* 1E07 en présence des deux bactéries qui produisent de l'acide lactique. De plus, on a pu observer une répression de l'ensemble des gènes impliqués dans le catabolisme des acides aminés chez la levure, en présence du staphylocoque. De ce fait, il est fort probable qu'une compétition pour les acides aminés existe entre *Y. lipolytica* 1E07 et *S. xylosus* C2a.

La combinaison des résultats microbiologiques, biochimiques et transcriptomiques a permis une meilleure compréhension des phénomènes d'interactions dans cet écosystème modèle.

II. 3. 1. 2. *Publication n°3*: “Study of culture associations of *Yarrowia lipolytica*, *Staphylococcus xylosus* and *Lactococcus lactis*: a first step towards microbial interaction analysis”.

**Soumis dans le Journal : Applied and Environmental Microbiology**

**Study of culture associations of *Yarrowia lipolytica*, *Staphylococcus xylosus* and *Lactococcus lactis*: a first step towards microbial interaction analysis.**

**S. Mansour<sup>1a</sup>, J. Bailly<sup>1a</sup>, S. Landaud<sup>1</sup>, C. Monnet<sup>1</sup>, A.S. Sarthou<sup>1</sup>, M. Cocaign-Bousquet<sup>2</sup>, S. Leroy<sup>3</sup>, F. Irlinger<sup>1</sup> and P. Bonnarme<sup>1\*</sup>**

<sup>a</sup> these authors contributed equally to the article

<sup>1</sup>Agro Paris Tech-INRA, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, 78850, Thiverval Grignon, France.

<sup>2</sup>UMR 5504, UMR 792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, CNRS, INRA, INSA, 31400, Toulouse, France.

<sup>3</sup>INRA, Centre de Clermont-Ferrand-Theix, Unité Microbiologique, Qualité et Sécurité des Aliments, F-63122, Saint-Genès Champenelle, France.

\* Corresponding author. Phone: +33 (0)1 30 81 53 88. Fax: +33 (0)1 30 81 55 97. E-mail: [bonnarme@grignon.inra.fr](mailto:bonnarme@grignon.inra.fr)

**KEYWORDS:** Real-time RT-PCR, co-cultures, microbial interaction, *Yarrowia lipolytica*, *Staphylococcus xylosus*, *Lactococcus lactis*.

## ABSTRACT

The interactions that may occur between microorganisms in different ecosystems have not yet been adequately studied. We investigated yeast-bacterium interactions in a synthetic medium using different culture associations composed of the yeast *Yarrowia lipolytica* 1E07 and two bacteria, *Staphylococcus xylosus* C2a and *Lactococcus lactis* LD61. The growth and biochemical characteristics of each microorganism in the different culture associations were studied. The expression of genes related to glucose, lactate and amino acid catabolism was analysed by reverse transcription (RT) followed by quantitative polymerase chain reaction (PCR). Our results show that the growth of *Y. lipolytica* 1E07 is dramatically reduced by the presence of *S. xylosus* C2a. As a result of a low amino acids concentration in the medium, the expression level of *Y. lipolytica* genes involved in amino acids catabolism was down-regulated in the presence of *S. xylosus* C2a, even when *L. lactis* was present in the association. Furthermore, the lactate production by both bacteria has an impact on the lactate dehydrogenase gene expression of the yeast, which increases up to 30-fold in the complete association, compared to the *Y. lipolytica* 1E07 pure culture. *S. xylosus* C2a growth dramatically decreases in the presence of *Y. lipolytica* 1E07. Lactic acid bacteria growth was not affected by the presence of *S. xylosus* C2a or *Y. lipolytica* 1E07, although the study of the gene expression showed significant variations.



## INTRODUCTION

Complex microbial activities play an important role in numerous biological transformations such as the cheese-ripening process. The global activity of a mixed microbial community is determined by the functions of each species (e.g., yeast, bacteria), which are strongly influenced by the interactions between the different partners. However, current knowledge of microbial physiology is generally based on pure culture studies, under conditions that are different from those encountered in a complex ecosystem. As a consequence, performing mixed culture studies is an essential way to get closer to the reality of a complex community.

One key limitation in this respect is that most of the approaches to study microbial communities are essentially descriptive, and examine the influence of one microbial species on another only based on their identification (e.g., 16S rRNA phylogeny) or their enumeration (e.g., fluorescent *in-situ* hybridisation). Nevertheless, some articles mention the use of DNA biochips using ribosomal DNA sequences without quantifying their expressions levels (48, 50). Additional insights into functional interactions are difficult to obtain.

In food processes such as cheese making, molecular approaches are still exploratory. The use of a transcriptomic approach to study mixed culture associations could only be found in the literature until recently using two (25) or three microorganisms (9). Real-time RT-PCR is the most sensitive method for the detection and quantification of gene expression levels, in particular for low abundance mRNA (8, 40). However, the application of this method to the study of heterogeneous microbial community represents a scientific challenge.

Lactate and amino acids (AA) metabolisms plays a central role during cheese ripening. Lactate is involved in the pH variation (19) and AA are precursors for cheese flavor formation (45, 49).

*Y. lipolytica* is a ubiquitous yeast that naturally occurs in a variety of food products. It has been isolated from dairy products such as cheese and yoghurt, as well as kefir and shoyu, and from salads containing meat or shrimps (3). Previous study demonstrated the involvement of the yeast *Y. lipolytica* in the production of cheese aroma compounds (7, 10). Moreover, the impact of *Y. lipolytica* in association with other ripening yeasts was studied. Results suggested that its presence inhibited mycelial expansion of *Geotrichum candidum*, and *Debaryomyces hansenii* cell viability (32).

However, in most cases, the yeast *Y. lipolytica* lives with other microorganisms such as *Lactococci* and *Staphylococci* (16, 29). It is therefore important to be able to study its behaviour in mixed cultures. The lactic acid bacterium (LAB) *Lactococcus lactis* was shown to coexist with *Y. lipolytica* strains in cheese (2). *L. lactis* is encountered in numerous food fermentation processes, particularly in

cheese production (11, 24, 38, 46). Its contribution primarily consists in the formation of lactate from the available carbon source, which results in a rapid acidification of the food raw material. In addition, starter cultures containing LAB and *S. xylosus* are widely used in the production of fermented sausages to enhance organoleptic properties of the product (33, 37). Moreover, *S. xylosus* was found to naturally occur in many food microflora such as in cheese and sausages (30, 46).

In this paper, the transcriptional study of three cheese-ripening microorganisms in association was investigated focusing on glucose, lactate and AA metabolisms.

Due to the difficulty of transcriptional ecosystem study in a real food environment, pure and mixed *Y. lipolytica* 1E07, *L. lactis* LD61 and *S. xylosus* C2a batch cultures were grown in a synthetic medium. The growth behaviour of each microorganism was analyzed together with nutritional parameters and the expression levels of target genes involved in important metabolism (AA, lactate) of cheese-ripening process. Possible microbial interactions were investigated by comparison for each species, of combinations of single, dual and triple species associations. This paper provides an efficient way to investigate the microbial interaction using a transcriptional approach.

## MATERIALS AND METHODS

**Strains and storage conditions.** The microorganisms used throughout this work were *Yarrowia lipolytica* 1E07, *Staphylococcus xylosus* C2a and *Lactococcus lactis* LD61. *Y. lipolytica* 1E07 was originally isolated from Livarot cheese and obtained from the LMILA (Laboratoire des Micro-organismes d'Interêt Laitier et Alimentaire, Caen, France) and selected for its biotechnological potential. *Staphylococcus xylosus* C2a is derived from the type strain DSM20267 of human skin origin and is cured of its endogenous plasmid, pSX267 (13). *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar diacetylactis LD61 was provided by Soredab (Bongrain, La Boissière-Ecole, France). This strain contains plasmids that allow optimal growth in milk (42). Strains were stored in a 5% glycerol non-fat dry milk at -80°C until used.

**Culture conditions.** The microorganisms were cultivated in a 500-ml flask containing 100 ml of medium. A preculture of each microorganism was grown in a 100-ml flask containing 20 ml of potato dextrose broth (PDB) (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) for the yeast, brain heart infusion broth (BHI) (Biokar Diagnostc, Beauvais, France) for *S. xylosus* C2a, and M17 (Biokar Diagnostc, Beauvais, France) for *L. lactis* LD61. These media were inoculated with 200 µl of the strain stock solution suspension for 48 h at 25°C under agitation (100 rpm) for *Y. lipolytica* 1E07 and *S. xylosus* C2a. The anaerobic bacterium *L. lactis* LD61 was cultivated at 30°C without agitation. These precultures served as inoculates for the cultures. A defined synthetic medium

(SM), adapted from the one described by Otto et al. (35), was chosen for all the culture conditions since it contains the substrates that allow us to study glucose and AA metabolism. It essentially contained 48 components, including glucose as the main carbon source, 19 free AA, 14 vitamins, five metallic ions and four nucleic acid bases (see supplemental data). The pH of the culture media was adjusted to 6.7. Cultures were incubated at 30°C (100 rpm) for either 14 h or 24 h.

**Microbial and substrate analyses.** Viable cell counts, expressed as colony-forming units (cfu ml<sup>-1</sup>), were determined following a standard aerobic plate count procedure. Different media were used for each microorganism: a) extract glucose chloramphenicol agar (Biokar Diagnostics, Paris, France) for *Y. lipolytica*, b) brain heart infusion agar supplemented with 50 mg/litre amphotericin (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) for *S. xylosus*, and c) M17 agar supplemented with 50 mg/litre amphotericin (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) for *L. lactis*. Colonies were enumerated after incubation for two days at 25°C or 30°C for the LAB.

The amino acid production was analysed using the ninhydrin method, as previously described by Grunau and Swiader (14).

Glucose and lactate were quantified by performing high-performance liquid chromatography (HPLC, Waters TCM; Waters, Saint Quentin en Yvelines, France) with a cation exchange column (diameter: 7.8 mm; length, 300 mm; Aminex HPX-87H; Bio-Rad, Ivry-sur-Seine, France) and thermostated at 35°C. The culture supernatants were filtered using a polyethersulfone membrane filter (pore size: 0.22 µm; diameter: 25 mm). The mobile phase was sulphuric acid (0.01N) dispensed at a rate of 0.6 ml.min<sup>-1</sup>. Detection of compounds of interest was performed with a Waters 486 tunable UV/Visible detector, regulated at 210 nm. All compounds were quantified from calibration curves established with pure chemicals.

### **Genomic DNA extraction**

Yeast or bacterial cultures (5 ml) were centrifuged for 5 min at 5000 x g, washed with 1 ml of distilled water, and then harvested again for 5 min at 5000 x g. Fifty-five microlitres of TES were added to the pellet (Tris 50 mM, 0.1 mol l<sup>-1</sup> EDTA, 6.7% of sucrose, pH 8), with 75 µl of lysozyme (3 mg)-lyticase (20 µl of 5000U/ml solution) mix. The mixture was incubated for 60 min at 37°C. Forty µl of proteinase K (14 mg mL<sup>-1</sup>) and 100 µl SDS solution at 20% were added and incubated for 30 min at 65°C. The solution was mixed every 30 min and then poured into 2-ml tubes containing 200 mg zirconium beads (diameters: 0.1 and 0.5 mm; BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA) for better efficiency. The tubes were vigorously shaken in a bead beater (Fast-Prep®-24; MP Biomedicals, France) by using three 45-s mixing sequences at a speed of 6 m s<sup>-1</sup>. They were cooled on ice for 5 min before each mixing sequence. After centrifugation for 45 min at 12000 x g and 4°C, the supernatant was collected. It was transferred to a 2-ml tube (Eppendorf,

Hamburg, Germany), and 500  $\mu$ l of Phenol/Chloroform/ Isoamyl Alcohol (v:v:v/25:24:1), pH 8, were added. The tubes were gently mixed by inversion and then centrifuged for 15 min at 12000 x g and 4°C. The aqueous phase was treated with RNase A (20 mg/ml; SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) and was transferred to two tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany). A volume of sodium acetate 3M corresponding to 1/10 of the final volume and two volumes of cool pure ethanol were added. The tubes were then incubated overnight at -20°C. The DNA was recovered by centrifugation for 15 min at 12000 g and 4°C, and the pellet was subsequently washed three times with 2 ml of 80% (v/v) ethanol. The pellet was then dried for 15 min in an incubator at 42°C and dissolved in 100  $\mu$ l of TE.

**Extraction and purification of total RNA.** Cultures were centrifuged for 5 min at 8200 x g and 4°C. The pellet was re-suspended in 1.25 ml of Trizol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and poured into 2-ml tubes containing 800 mg zirconium beads (diameter: 0.1 and 0.5 mm; BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA). The tubes were vigorously shaken in a bead beater (Fast-Prep<sup>®</sup>-24; MP Biomedicals, France) by using three 60-s mixing sequences at a speed of 6.5 m s<sup>-1</sup>. They were cooled on ice for 5 min before each mixing sequence. After centrifugation of 10 min at 12000 x g and 4°C, the supernatant was collected. It was transferred to a 2-ml tube (Phase Lock Gel<sup>™</sup> Heavy; Eppendorf, Hamburg, Germany), and 230  $\mu$ l of chloroform were added. The tubes were gently mixed by inversion and centrifuged for 15 min at 12000 x g and 4°C. The aqueous phase was transferred to a fresh tube and an equal volume of phenol-chloroform-isoamyl alcohol, pH 4.7, (Sigma) was added. Tubes were gently mixed by inversion and centrifuged for 10 min at 12000 x g and 4°C. The upper phase was collected. An equal volume of 100% ethanol was added to the aqueous phase, after which the purification with an RNeasy kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) was performed, according to manufacturer's instructions. DNase treatment was done to RNA samples using DNase Turbo DNA-free<sup>™</sup> Kit (Ambion, Austin, TX, USA). RNA quality and quantification were analysed using a NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and a Bioanalyser Agilent 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA).

**Real-time RT-PCR analyses.** The RNA extraction and purification procedures are described above. In order to study the gene expression of the microorganisms, samples were taken after 14 h of culture. The cDNAs were subsequently synthesized using the SuperScript<sup>™</sup> III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). A mixture containing up to 5  $\mu$ g of total RNA, Random and dNTP (10mM) was prepared and incubated at 65°C for 5 min and then placed on ice for at least 1 min. The cDNA synthesis mix containing 10X RT buffer, MgCl<sub>2</sub> (25 mM), DTT (0.1 M), RNaseOUT<sup>™</sup>

(40 U  $\mu\text{l}^{-1}$ ) and SuperScript<sup>TM</sup> III RT (200 U  $\mu\text{l}^{-1}$ ) was added to each RNA/primer mixture and then incubated for 50 min at 50°C. The reaction was stopped by incubation for 5 min at 85°C.

The primers for real-time RT-PCR were designed to have a length of about 20-25 bases, a G/C content of over 50%, and a  $T_m$  of about 60°C. The length of the PCR products ranged between 90 and 150 bp. LightCycler<sup>TM</sup> software (Roche, Mannheim, Germany) was used to select primer sequences. All the primers were synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium) (Tables 1, 2 and 3). SYBR green I PCR amplification was performed using a LightCycler (Roche). Amplification was carried out in a 10- $\mu\text{l}$  (final volume) mixture containing 250 ng of an RNA sample, 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5  $\mu\text{M}$  of primer, and 1  $\mu\text{l}$  of LightCycler-FastStart DNA Master SYBR green I (Roche). Five dilutions of cDNA were made to determine the efficiencies of real-time RT-PCR. A negative control without cDNA added was systematically included. The amplification procedure involved incubation at 95°C for 8 min for the initial denaturation, followed by 40 cycles consisting of: (i) denaturation at 95°C for 10-s; (ii) annealing at a temperature that was 5°C below the melting temperature of the primers for 7-s; (iii) extension at 72°C for 6-s; and (iv) fluorescence acquisition (530 nm) at the end of extension. The temperature transition rate was 20°C/s for each step. After real-time RT-PCR, a melting curve analysis was performed by continuously measuring fluorescence during heating from 65 to 95°C at a transition rate of 0.1°C/s. The threshold cycle ( $C_T$ ) values were determined with the LightCycler software (version 3.3), using the second derivative method. Standard curves were generated by plotting the  $C_T$  values as a function of the log of the initial RNA concentration. PCR efficiency ( $E$ ) was then calculated using the following formula:  $E=10^{-1/\text{slope}}$ . A suitable internal control gene to normalise the results was used for each microorganism. The actin gene (6) was chosen for *Y. lipolytica*, the purine M gene for *L. lactis* and the gyrase A (47) gene for *S. xylosus*. The Pffaf method (39) was used to calculate the fold change in transcript abundance normalised to the control gene and relative to the pure culture sample. Statistical analysis was performed using Student's t-test. A  $P$  value lower than 0.05 was considered as significant.

**(i) Housekeeping gene.** Appropriate normalisation strategies are required to control the experimental error introduced during the multistage process required to extract and process the RNA. An appropriate housekeeping gene was therefore chosen for each microorganism. An important aspect for the validation is to ensure that the gene chosen for normalisation of RNA expression level is truly invariant throughout the different sample conditions (data not shown). The actin gene was chosen for *Y. lipolytica* (6), the purine M for *L. lactis* and the gyrase A for *S. xylosus* (47).

**(ii) Confirmation of primer specificity. Real-time RT-PCR** experiments were performed in order to confirm the absence of cross-hybridisation between a specific microorganism primer and the other associated microorganisms. All the primers were tested against the DNA samples from the two other microorganisms. In these conditions, no unspecific hybridisation was found. In addition, a LightCycler melting curve analysis was performed by continuously measuring the fluorescence during heating from 65°C to 95°C at a transition rate of 0.1°C/s. No primer-dimers were generated during the 40 real-time RT-PCR amplification cycles that were performed.

**(iii) Method of quantification.** The  $\Delta\Delta CT$  method uses a single sample, referred to as the calibrator sample, for comparison of every sample's gene expression level. The calibrator sample is analysed on every assay with the samples of interest. In this study, the calibrator samples are the pure cultures of each microorganism and the unknown samples are the mixed cultures. The  $CT$  value corresponds to the time (measured cycle numbers) at which the reporter fluorescent emission increases beyond a threshold level (based on the background fluorescence of the system). The formula that is used is: Fold induction =  $2^{-[\Delta\Delta Ct]}$ , where  $\Delta\Delta CT = [CT_{GI}(\text{mixed culture}) - CT_{HG}(\text{mixed culture})] - [CT_{GI}(\text{pure culture}) - CT_{HG}(\text{pure culture})]$ . GI is the gene of interest and HG the housekeeping gene used for each microorganism. The pure culture will thus represent 1X expression of the gene of interest. The major problem of the study of a microbial co-culture is that the concentration of each microorganism may vary depending on the association. Consequently, the proportion of the RNA of each microorganism may also fluctuate. The normalisation method that we used in the present study has the advantage of circumventing this problem.

## RESULTS

For simplicity, abbreviations were used for each culture association: Y: *Y. lipolytica* 1E07 pure culture; S: *S. xylosus* C2a pure culture; L: *L. lactis* LD61 pure culture; YL: *Y. lipolytica* 1E07 and *L. lactis* LD61 co-culture; YS: *Y. lipolytica* 1E07 and *S. xylosus* C2a co-culture; LS: *L. lactis* LD61 and *S. xylosus* C2a co-culture; YLS: *Y. lipolytica* 1E07, *L. lactis* LD61 and *S. xylosus* C2a co-culture.

**Growth properties of the microorganisms.** The growth characteristics of the microorganisms as a function of the association are presented in Fig. 1. There was good reproducibility (a difference of less than 0.5 log<sub>10</sub> units) between the results of duplicate experiments.

Up to 8 h of culture, the cell counts of *Y. lipolytica* 1E07 were similar in Y, YL, YS and YLS cultures (Fig. 1A). Between 8 h and 22 h, the presence of *L. lactis* LD61 in the YL association slightly decreased the growth of *Y. lipolytica* 1E07. In the YS and YLS associations, *Y. lipolytica* 1E07 cells did not grow to the same high density as in the Y and YL cultures, and reached 10<sup>6</sup> cfu ml<sup>-1</sup> at 22 h of culture. At 29 h of culture, the growth of *Y. lipolytica* 1E07 was 100-fold lower in the YS association, compared to the *Y. lipolytica* pure culture.

Up to 8 h of culture in the YLS association, the presence of *L. lactis* LD61 or *Y. lipolytica* 1E07 had no impact on the growth of *S. xylosus* C2a (Fig. 1B). From 8 to 15 h, *S. xylosus* C2a growth reached the stationary phase in pure culture (10<sup>9</sup> cfu ml<sup>-1</sup>) and in the YS association (10<sup>9</sup> cfu ml<sup>-1</sup>). In addition, in the LS and YLS associations, the *S. xylosus* C2a cell counts steadily decreased and reached 10<sup>8</sup> cfu ml<sup>-1</sup> at 15 h of culture. At 20 h of culture, the cell counts of *S. xylosus* C2a in the YLS association were 10000-fold lower compared to the pure culture. The growth of *L. lactis* LD61 remained similar regardless of the culture association (Fig. 1C).

**pH, glucose, lactate and AA dynamics.** Changes in pH are shown in Fig. 2. Results showed that at 29 h of culture, the pH dropped to 4.2 and 5 in the *L. lactis* LD61 and *S. xylosus* C2a pure cultures, respectively (Fig. 2A). Furthermore, the pH decreased in YL, YS, LS and YLS associations (Fig. 2B). The acidification was highly correlated with the lactate production from glucose by *S. xylosus* C2a and *L. lactis* LD61 (data not shown).

The glucose and lactate measured in the supernatant of the microorganism associations at 14 h of culture are shown in Fig. 3. After 14 h of culture, 4 g l<sup>-1</sup> of glucose were consumed by *Y. lipolytica* 1E07. In pure cultures, *L. lactis* LD61 and *S. xylosus* C2a consumed 7 g l<sup>-1</sup> and 5 g l<sup>-1</sup> of glucose, respectively, and produced 5 g l<sup>-1</sup> and 2 g l<sup>-1</sup> of lactate. Glucose was totally exhausted after 14 h in the YL and YLS associations, and 4 g l<sup>-1</sup> and 5 g l<sup>-1</sup> of lactate were produced, respectively.

Only 4 g l<sup>-1</sup> of glucose were consumed in the YS association, with the production of 2.5 g l<sup>-1</sup> of lactate. AA were highly consumed in the YS and YLS cultures, with a higher consumption in the YS association (threonine, alanine, glutamine, glycine and lysine were the main AA consumed) (data not shown).

**Real-time RT-PCR analysis of the different microorganism associations.** In order to better understand possible interactions between microorganisms, real-time RT-PCR analyses were carried out by focusing on glucose, lactate and AA metabolisms, which are the main energy sources in the SM. Total RNA was extracted after 14 h of culture. The time of extraction was chosen in order to have enough cells (the minimum required is about 10<sup>6</sup> cells) and so that the culture was at the end of the exponential phase. Real-time RT-PCR analyses were then performed with primers specific to target genes involved in glucose, AA and lactate catabolism.

***Expression level of investigated gene transcripts in the different culture associations.***

The expression level of several genes involved in glucose, lactate and AA metabolisms was investigated. Seventeen genes were chosen to study the possible effect of *S. xylosus* C2a and/or *L. lactis* LD61 on *Y. lipolytica* 1E07. Real-time RT-PCR was then performed with primers specific to eight genes involved in AA catabolism, six genes of the lactate catabolism and three genes of the glucose catabolism (Table 1).

Nine genes of *Y. lipolytica* whose expression levels significantly differ in the pure versus co-culture are shown in Fig. 4. The expression level of the gene *HXT2* involved in glucose catabolism was lower than in the YL culture, probably due to the total glucose consumption by *L. lactis* LD61 at 14 h of culture, which corresponds to the time of the RNA extraction. In addition, the lactate dehydrogenase *CYB2* expression levels were higher in all the associations in which lactate is produced to some extent, compared to the *Y. lipolytica* 1E07 pure culture where lactate is not produced. The *CYB2* gene was expressed 35, 2.5 and 5 times more in YL, YS and YLS associations, respectively, than in the pure culture. Moreover, the expression level of several genes related to the AA catabolism, such as *BATI*, *KAD* and *GDH2*, were lower in the presence of *S. xylosus* C2a. Additionally, the anabolic gene GDH encoding the NADP<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase *GDH3* is induced in the opposite way compared to the catabolic gene *GDH2* encoding a NAD<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase. Besides, the two sub-units of the pyruvate dehydrogenase, *PDA1* and *PDB1*, are similarly induced.

In order to study the effect of *S. xylosus* C2a and/or *Y. lipolytica* 1E07 on the gene expression of *L. lactis* LD61, six genes of *L. lactis* LD61 were selected: one gene involved in the AA catabolism,



three genes in the lactate catabolism and two genes in the glucose pathway (Table 2). The expression levels of four genes were significantly different in co-culture compared to the *L. lactis* LD61 pure culture (Fig. 5). For instance, the genes *NoxE* and *PoxL* involved in the oxidative catabolism of glucose or lactate are higher in the YL association compared to the *L. Lactis* LD61 pure culture. Moreover, the lactate dehydrogenase *LDH* expression level decreased in the mixed culture of YL, whereas it increased in the YLS association. At 14 h of culture, glucose was not completely exhausted, which could explain the higher expression level of the *pgiA* gene involved in glucose catabolism in *L. lactis* LD61 pure culture compared to the two associations, YL and YLS. The effect of *Y. lipolytica* 1E07 and/or *L. lactis* LD61 on *S. xylosus* C2a was also investigated. For that, six genes were selected: a gene involved in AA catabolism, three genes involved in lactate catabolism and two genes involved in the glucose pathway (Table 3). Four genes of *S. xylosus* C2a, whose expression levels significantly differed in the pure versus co-culture, are shown in Fig. 6. The results show that the expression level of the lactate dehydrogenase (*LDH*) decreased in the YS and YLS associations compared to *S. xylosus* C2a pure culture. Furthermore, the expression level of the pyruvate dehydrogenase, which is involved in the catabolism of glucose, is higher in the YS association, whereas its expression decreased in the complete association. The expression level of the gene involved in the AA transport significantly decreased regardless of the microbial association (Fig. 6).

## DISCUSSION

In this study, the interaction of three microorganisms and the effects on the expression level of genes of the glucose, lactate and AA catabolisms were investigated in a SM. To our knowledge, little is known about the gene expression of microorganisms in co-cultures. Most of the mixed culture studies were limited to a biochemical approach using two (27, 28) or, rarely, more microorganisms (1, 9, 31). Recently, transcriptomic approaches have been developed to investigate possible interactions between two or three microorganisms (17, 25), indicating that such alternative approaches could be used to investigate co-culture behaviour.

**Efficiency of the quantification method.** The method used to generate quantitative values must be taken into account when interpreting gene expression data. Previous studies have demonstrated the linearity of real-time RT-PCR and described the use of standard curves for relative quantification of target genes. The relative expression of a given gene can be obtained by the  $\Delta\Delta CT$  method (39). The housekeeping gene chosen for each microorganism is used to normalise each gene expression level. The expression of the housekeeping gene has to be truly invariant throughout the different

sample conditions (41). This normalisation makes it possible to avoid the problem of cell concentration in the different association samples.

#### **Effect of *L. lactis* LD61 and/or *S. xylosus* C2a on *Y. lipolytica* 1E07.**

The presence of both bacteria considerably reduced the growth of *Y. lipolytica* 1E07. The presence of *S. xylosus* C2a resulted in a 100-fold decrease in *Y. lipolytica* 1E07 cells counts, compared to the pure culture. Competition for AA consumption between *Y. lipolytica* 1E07 and *S. xylosus* C2a may explain this phenomenon. In fact, the AA were dramatically consumed in YS culture. As a result of the low AA concentration in the medium, the expression level of genes involved in AA catabolism (*GDH2*, *BAT1*, *KAD*, *CHAI*) are down-regulated in the presence of *S. xylosus* C2a, regardless of the type of association (YS and YLS). In addition, the expressions of the *GDH3* (anabolic) and *GDH2* (catabolic) genes encoding for a NADP<sup>-</sup> and a NAD<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase, respectively, are induced in the opposite way. DeLuna et al. (12) indicated that the coordinated regulation of *GDH3*-, and *GDH2*-encoded enzymes resulted in glutamate biosynthesis and balanced utilisation of  $\alpha$ -ketoglutarate under respiratory conditions in the yeast *S. cerevisiae*. The increase in the expression levels of *Y. lipolytica* 1E07 genes involved in the AA catabolism strongly suggests that AA are preferentially consumed by this yeast. A recent study on *Y. lipolytica* demonstrated the involvement of this yeast in the AA degradation (26). It showed that the AA are primarily used by *Y. lipolytica* 1E07 as a main energy source, where lactate is consumed following AA depletion. Cholet et al. (10) investigated the expression patterns of target genes related to L-methionine and lactate catabolisms in this yeast. They found that *Y. lipolytica* was mainly involved in L-methionine catabolism.

In YL or YLS cultures, lactate produced by *L. lactis* LD61 from glucose led to a 30-fold increase in the lactate dehydrogenase *CYB2* expression level, compared to *Y. lipolytica* 1E07 pure culture where no lactate was produced. Our results are in good agreement with those of Lodi et al. (21) who found that in *S. cerevisiae*, the *CYB2* gene was subject to several metabolic controls at the transcription level, namely inhibition due to glucose fermentation and induction by lactate. At the same time, the expression level of the glucose transporter encoding gene *HXT2* was decreased two-fold. In fact, after 14 h of culture, the glucose was totally consumed by *L. lactis* LD61 and partially converted to lactate, which accumulated in the medium. A 50-fold decrease in the expression of the *HXT2* gene has also been reported by Higgins et al. (15) in glucose-depleted media. In contrast, Özcan et al. (36) showed that the transcription of the genes *HXT2* of the yeast *S. cerevisiae* is repressed when glucose levels are high and induced after glucose depletion. There are several potential reasons for these discrepancies, including the type of culture, strain differences, microorganism associations and culture medium composition.

### **Effects of *Y. lipolytica* 1E07 and/or *S. xylosus* C2a interactions on *L. lactis* LD61.**

We found that some genes were differentially expressed depending on the association, despite the fact that the growth of *L. lactis* LD61 was not affected by the microorganisms with which it was associated.

*L. lactis* LD61 has a homofermentative sugar metabolism with lactate as a major end product under most fermentation conditions. The presence of oxygen provokes radical changes in the carbon metabolism of *L. lactis* (23). It has been previously shown that the principal metabolic shifts observed under aerobic conditions coincided with the induction of NADH-oxidase (NOX) activity (4, 23). The overproduction of this enzyme will result in a decrease in the NADH/NAD ratios. In fact, as a result of NOX activity, the electrons originating from sugar metabolism would be used for reduction of oxygen and not for reduction of pyruvate to lactate. Lopez de Felipe et al. (22) demonstrated that the metabolic level of the key cofactor NADH can shift *L. lactis* from a homolactic bacterium to a highly acetoin- or diacetyl-producing bacterium. Under aerobic conditions, the NADH is used as a substrate by the lactate dehydrogenase (LDH) enzyme. As a consequence, when NOX is highly expressed, the LDH activity is low and lactate production is further decreased, which is essentially what was found in our culture associations.

The pyruvate produced from the consumption of glucose and/or lactate could be transformed into acetyl-phosphate via the pyruvate oxidase (POX) enzyme involved in its oxidative decarboxylation. A second pathway could be the conversion of pyruvate into lactate via the LDH. In the YL culture, the expression level of *LDH* decreases while the *POX* increases, compared to the *L. lactis* LD61 pure culture. This result shows that *L. lactis* LD61 mainly produces acetyl-phosphate from pyruvate in the presence of *Y. lipolytica* 1E07.

Opposite regulation of the genes *poxL*, *noxE* and *LDH* is shown in the YLS association. This result may suggest that in the presence of *S. xylosus*, the NADH/NAD ratios would be used for the reduction of pyruvate to lactate.

The expression level of the *pgiA* gene encoding a glucose-6P-isomerase decreased in the YL and YLS associations compared to the *L. lactis* LD61 pure culture, due to the glucose total consumption. In fact, this enzyme is highly regulated and its activity is correlated to the substrate abundance (5).

### **Effects of *L. lactis* LD61 and/or *Y. lipolytica* 1E07 interactions on *S. xylosus* C2a.**

*Y. lipolytica* 1E07 and/or *L. lactis* LD61 association with *S. xylosus* C2a considerably affected the growth of this bacterium. Two main reasons could be responsible for the growth decrease of *S. xylosus* C2a in co-culture. The first is the acidification of the medium due to lactate production by the lactic acid bacterium and *S. xylosus* C2a. The effect of pH on the growth of *S. xylosus* has been

studied. Results showed that lowering pH (from 6.0 to 4.6) decreased the growth of *S. xylosus* (43, 44). Second, the competition towards AA may occur in the presence of *Y. lipolytica* 1E07, which is known to preferentially consume AA at the expense of lactate (26). Lincoln et al. (20) found that seven *S. aureus* strains required arginine, proline, cysteine, valine, leucine and glycine for their growth. The same results were obtained by Onoue and Mori (34) in a chemically defined medium. Keller et al. (18) observed that *S. aureus* could utilise glutamate, proline, histidine, aspartate, alanine, threonine, serine or glycine as a major energy source. The combination of both acidification and AA competition could explain the dramatic decrease in the *S. xylosus* C2a population in the complete association, YLS. Moreover, as a consequence of the growth decay of *S. xylosus* C2a, all the genes expressed in the mixed culture with *Y. lipolytica* 1E07 and/or *L. lactis* LD61 significantly decreased, compared to the pure culture. The same profile was obtained in the mixed culture with *Y. lipolytica* 1E07 with the exception of pyruvate dehydrogenase gene, which is slightly more expressed compared to the *S. xylosus* C2a pure culture.

This study has provided an efficient way to investigate the microbial interaction using a transcriptional approach. For a better understanding of the interactions that may occur, it would be interesting to use a microarray technology that would provide an overview of the whole cell response to environmental changes at the transcriptional level.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors wish to thank J. Colle, V. Laroute and R. Tâche for their technical assistance. We would also like to thank D<sup>r</sup> N. Desmogures (LMILA, Laboratoire des Micro-organismes d'Interêt Laitier et Alimentaire, Caen, France) and Soredab (Bongrain, La Boissière Ecole, France) for providing microbial strains.

Soulaf Mansour is grateful to the ABIES Doctoral School for awarding him a Ph.D. scholarship.

This work was supported by an ANR (French National Research Agency) grant within the framework of the “Genoferment” 2E.11 PNRA programme.

## REFERENCES

1. **Addis, E., G. H. Fleet, J. M. Cox, D. Kolak, and T. Leung.** 2001. The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* **69**:25-36.
2. **Álvarez-Martín, P., A. B. Flórez, A. Hernández-Barranco, and B. Mayo.** 2008. Interaction between dairy yeasts and lactic acid bacteria strains during milk fermentation. *Food Control* **19**:62-70.
3. **Barnett, J. A., R. W. Payne, and D. Yarrow.** 2000. *Yeasts: characteristics and identification.* Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
4. **Bassit, N., C.-Y. Boquien, D. Picque, and G. Corrieu.** 1993. Effect of initial oxygen concentration on diacetyl and acetoin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1893-1897.
5. **Bhosale, S. H., M. B. Rao, and V. V. Deshpande.** 1996. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiol. Rev.* **60**:280-300.
6. **Blanchin-Roland, S., G. D. Costa, and C. Gaillardin.** 2005. ESCRT-I components of the endocytic machinery are required for Rim101-dependent ambient pH regulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiol.* **151**:3627-3637.
7. **Bonaïti, C., F. Irlinger, H. E. Spinnler, and E. Engel.** 2005. An iterative sensory procedure to select odor-active associations in complex consortia of microorganisms: application to the construction of a cheese model. *J. Dairy Sci.* **88**:1671-1684.
8. **Bustin, S. A.** 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* **25**:169-193.
9. **Cholet, O., A. Henaut, S. Casaregola, and P. Bonnarme.** 2007. Gene expression and biochemical analysis of cheese-ripening yeasts: Focus on catabolism of L-methionine, lactate, and lactose. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:2561-2570.
10. **Cholet, O., A. Henaut, A. Hebert, and P. Bonnarme.** 2008. Transcriptional analysis of L-Methionine catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica* in relation to volatile sulfur compound biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:3356-3367.
11. **Corsetti, A., J. Rossi, and M. Gobbetti.** 2001. Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* **69**:1-10.

12. **DeLuna, A., A. Avendano, L. Riego, and A. Gonzalez.** 2001. NADP-Glutamate Dehydrogenase Isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. *J. Biol. Chem.* **276**:43775-43783.
13. **Götz, F., J. Zabielski, L. Philipson, and M. Lindberg.** 1983. DNA homology between the arsenate resistance plasmid pSX267 from *Staphylococcus xylosus* and the penicillinase plasmid pI258 from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* **9**:126-137.
14. **Grunau, J. A., and J. M. Swiader.** 1992. Chromatography of 99 amino acids and other ninhydrin-reactive compounds in the Pickering lithium gradient system. *J. Chromato A.* **594**:165-171.
15. **Higgins, V. J., A. G. Beckhouse, A. D. Oliver, P. J. Rogers, and I. W. Dawes.** 2003. Yeast genome-wide expression analysis identifies a strong ergosterol and oxidative stress response during the initial stages of an industrial lager fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:4777-4787.
16. **Irlinger, F., and A. Morvan.** 1997. Taxonomic characterization of coagulase-negative staphylococci in ripening flora from traditional french cheese. *Syst. Appl. Microbiol.* **20**:319-328.
17. **Jakubovics, N. S., S. R. Gill, S. E. Lobst, M. M. Vickerman, and P. E. Kolenbrander.** 2008. Regulation of gene expression in a mixed-genus community: stabilized arginine biosynthesis in *Streptococcus gordonii* by coaggregation with *Actinomyces naeslundii*. *J. Bacteriol.* **190**:3646-3657.
18. **Keller, G. M., R. S. Hanson, and M. S. Bergdoll.** 1978. Molar growth yields and enterotoxin B production of *Staphylococcus aureus* S-6 with amino acids as energy Sources. *Infect. Immun.* **20**:151-157.
19. **Leclercq-Perlat, M. N., F. Buono, D. Lambert, H. E. Spinnler, and G. Corrieu.** 2004. Controlled Production of Camembert-Type Cheeses : Part I. Microbiological and physicochemical evolutions. *J. Dairy Res.* **71**:346-354.
20. **Lincoln, R. A., J. A. Leigh, and N. C. Jones.** 1995. The amino acid requirements of *Staphylococcus aureus* isolated from cases of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* **45**:275-279.
21. **Lodi, T., and B. Guiard.** 1991. Complex transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* CYB2 gene encoding cytochrome b2: CYP1(HAP1) activator binds to the CYB2 upstream activation site UAS1-B2. *Mol. Cell. Biol.* **11**:3762-3772.

22. **Lopez de Felipe, F., M. Kleerebezem, W. M. de Vos, and J. Hugenholtz.** 1998. Cofactor engineering: a novel approach to metabolic engineering in *Lactococcus lactis* by controlled expression of NADH oxidase. *J. Bacteriol.* **180**:3804-3808.
23. **Lopez de Felipe, F., M. J. C. Starrenburg, and J. Hugenholtz.** 1997. The role of NADH-oxidation in acetoin and diacetyl production from glucose in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363. *FEMS Microbiol. Lett.* **156**:15-19.
24. **Lücke, F.-K.** 2000. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Sci.* **56**:105-115.
25. **Maligoy, M., M. Mercade, M. Cocaign-Bousquet, and P. Loubiere.** 2008. Transcriptome analysis of *Lactococcus lactis* in coculture with *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:485-494.
26. **Mansour, S., J. M. Beckerich, and P. Bonnarme.** 2008. Lactate and amino acid catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:6505-6512.
27. **Masoud, W., and M. Jakobsen.** 2005. The combined effects of pH, NaCl and temperature on growth of cheese ripening cultures of *Debaryomyces hansenii* and coryneform bacteria. *Int. Dairy J.* **15**:69-77.
28. **Masoud, W., and M. Jakobsen.** 2003. Surface ripened cheeses: the effects of *Debaryomyces hansenii*, NaCl and pH on the intensity of pigmentation produced by *Brevibacterium linens* and *Corynebacterium flavescens*. *Int. Dairy J.* **13**:231-237.
29. **Mounier, J., R. Gelsomino, S. Goerges, M. Vancanneyt, K. Vandemeulebroecke, B. Hoste, S. Scherer, J. Swings, G. F. Fitzgerald, and T. M. Cogan.** 2005. Surface microflora of four smear-ripened cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:6489-6500.
30. **Mounier, J., S. Goerges, R. Gelsomino, M. Vancanneyt, K. Vandemeulebroecke, B. Hoste, N. M. Brennan, S. Scherer, J. Swings, G. F. Fitzgerald, and T. M. Cogan.** 2006. Sources of the adventitious microflora of a smear-ripened cheese. *J. Appl. Microbiol.* **101**:668-681.
31. **Mounier, J., C. Monnet, T. Vallaey, R. Arditi, A.-S. Sarthou, A. Helias, and F. Irlinger.** 2008. Microbial interactions within a cheese microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:172-181.
32. **Mounier, J., C. Monnet, T. Vallaey, R. Arditi, A.-S. Sarthou, A. Helias, and F. Irlinger.** 2008. Microbial interactions within a cheese microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:172-181.



33. **Nychas, G. J., and J. S. Arkoudelos.** 1990. Staphylococci: their role in fermented sausages. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* **19**:167S-188S.
34. **Onoue, Y., and M. Mori.** 1997. Amino acid requirements for the growth and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* in chemically defined media. *Int. J. Food Microbiol.* **36**:77-82.
35. **Otto, R., B. Ten Brink, H. Veldkamp, and W. N. Konings.** 1983. The relationship between growth rate and electrochemical proton gradient of *Streptococcus cremoris*. *FEMS Microbiol Lett* **16**:69-74.
36. **Ozcan, S., and M. Johnston.** 1995. Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol. Cell. Biol.* **15**:1564-1572.
37. **Papamanoli, E., P. Kotzekidou, N. Tzanetakis, and E. Litopoulou-Tzanetaki.** 2002. Characterization of *Micrococcaceae* isolated from dry fermented sausage. *Food Microbiol.* **19**:441-449.
38. **Patrignani, F., R. Lanciotti, J. M. Mathara, M. E. Guerzoni, and W. H. Holzappel.** 2006. Potential of functional strains, isolated from traditional Maasai milk, as starters for the production of fermented milks. *International J. Food Microbiol.* **107**:1-11.
39. **Pfaffl, M. W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.* **29**:e45-.
40. **Pfaffl, M. W., and M. HageleitDOI.** 2001. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotech. Lett.* **23**:275- 282.
41. **Radonic, A., S. Thulke, I. M. Mackay, O. Landt, W. Siegert, and A. Nitsche.** 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **313**:856-862.
42. **Raynaud, S., R. Perrin, M. Coccagn-Bousquet, and P. Loubiere.** 2005. Metabolic and transcriptomic adaptation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* in response to autoacidification and temperature downshift in skim milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:8016-8023.
43. **Søndergaard, A. K., and L. H. Stahnke.** 2002. Growth and aroma production by *Staphylococcus xylosus*, *S. carnosus* and *S. equorum*--a comparative study in model systems. *Int. J. Food Microbiol.* **75**:99-109.

44. **Sørensen, B. B., and M. Jakobsen.** 1996. The combined effects of environmental conditions related to meat fermentation on growth and lipase production by the starter culture *Staphylococcus xylosum*. *Food Microbiol.* **13**:265-274.
45. **Spinnler, H. E., C. Berger, C. Lapadatescu, and P. Bonnarme.** 2001. Production of sulfur compounds by several yeasts of technological interest for cheese ripening. *Int. Dairy J.* **11**:245-252.
46. **Talon, R., I. Lebert, A. Lebert, S. Leroy, M. Garriga, T. Aymerich, E. H. Drosinos, E. Zanardi, A. Ianieri, M. J. Fraqueza, L. Patarata, and A. Lauková.** 2007. Traditional dry fermented sausages produced in small-scale processing units in Mediterranean countries and Slovakia. 1: Microbial ecosystems of processing environments. *Meat Sci.* **77**:570-579.
47. **Theis, T., R. A. Skurray, and M. H. Brown.** 2007. Identification of suitable internal controls to study expression of a *Staphylococcus aureus* multidrug resistance system by quantitative real-time PCR. *J Microbiol Methods* **70**:355-62.
48. **Wu, L., X. Liu, C. W. Schadt, and J. Zhou.** 2006. Microarray-based analysis of subnanogram quantities of microbial community DNAs by using whole-community genome amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:4931-4941.
49. **Yvon, M., and L. Rijnen.** 2001. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int. Dairy J.* **11**:185-201.
50. **Zhou, J.** 2003. Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:288-294.

Figure1. Growth of *Y. lipolytica* 1E07 (A), *S. xyloso* C2a (B) and *L. lactis* LD61 in a SM. Y: *Y. lipolytica* 1E07; S: *S. xyloso* C2a; L: *L. lactis* LD61; YL: *Y. lipolytica* 1E07 + *L. lactis* LD61; YS: *Y. lipolytica* 1E07 + *S. xyloso* C2a; LS: *L. lactis* LD61 + *S. xyloso* C2a; YLS: *Y. lipolytica* 1E07 + *L. Lactis* LD61 + *S. xyloso* C2a.

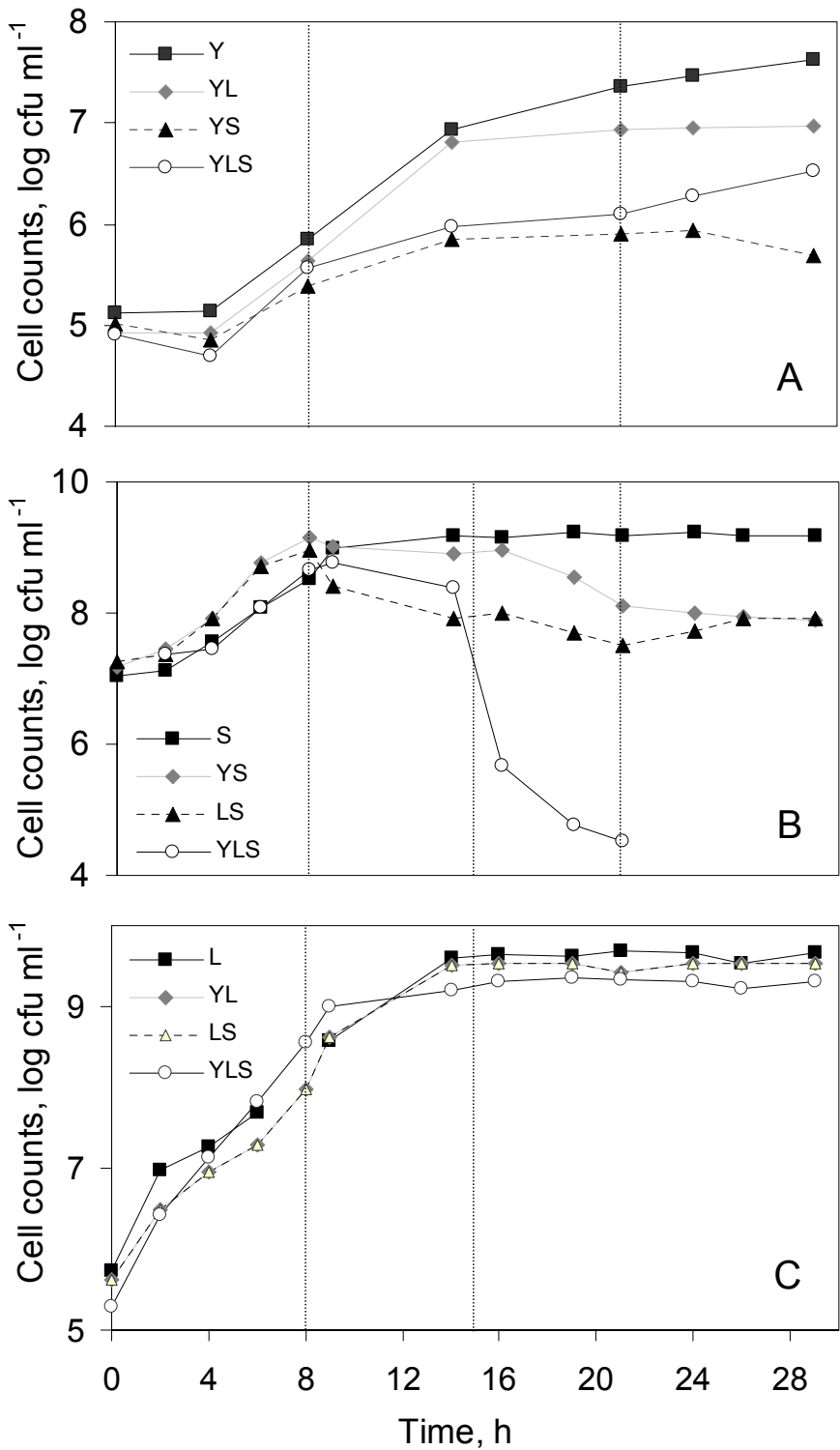


Figure 2. pH variation of microorganisms in pure cultures (A) and in mixed cultures (B). Y: *Y. lipolytica* 1E07; S: *S. xylosum* C2a; L: *L. lactis* LD61; YL: *Y. lipolytica* 1E07 + *L. lactis* LD61; YS: *Y. lipolytica* 1E07 + *S. xylosum* C2a; LS: *L. lactis* LD61 + *S. xylosum* C2a; YLS: *Y. lipolytica* 1E07 + *L. Lactis* LD61 + *S. xylosum* C2a.

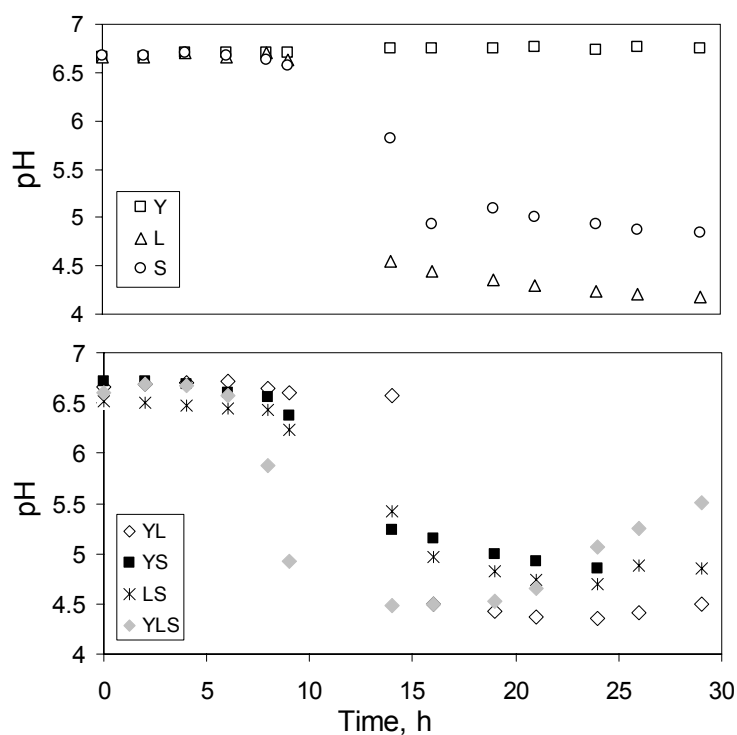


Figure 3. Glucose and lactate measured in the supernatant of the microorganism associations at 14 h of culture in a synthetic medium. B: Blank; Y: *Y. lipolytica* 1E07; S: *S. xylosum* C2a; L: *L. lactis* LD61; YL: *Y. lipolytica* 1E07 + *L. lactis* LD61; YS: *Y. lipolytica* 1E07 + *S. xylosum* C2a; YLS: *Y. lipolytica* 1E07 + *L. Lactis* LD61 + *S. xylosum* C2a.

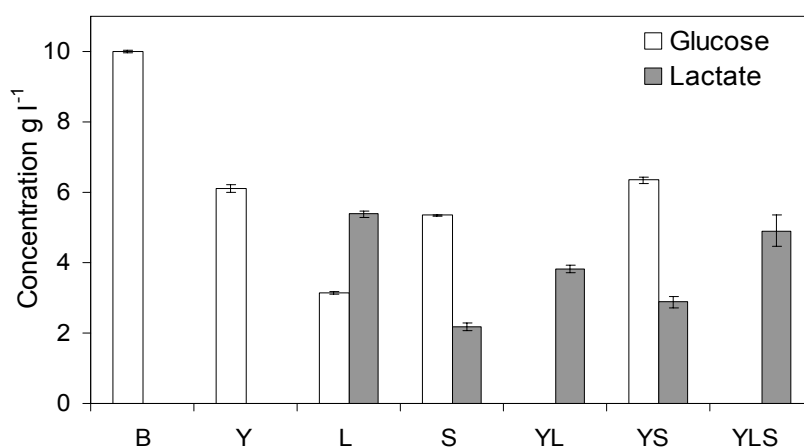


Figure 4. Expression level of *GDH2*, *GDH3*, *BAT1*, *HXT2*, *CHA1*, *KAD*, *PDA1*, *PDB1* and *CYB2-2* genes, measured by real-time PCR. The expression levels of *Y. lipolytica* 1E07 pure culture genes were compared to those obtained in co-cultures after 14 h of culture in a synthetic medium. Y: *Y. lipolytica* 1E07; YL: *Y. lipolytica* 1E07 + *L. lactis* LD61; YS: *Y. lipolytica* 1E07 + *S. xylosum* C2a; YLS: *Y. lipolytica* 1E07 + *L. Lactis* LD61 + *S. xylosum* C2a.

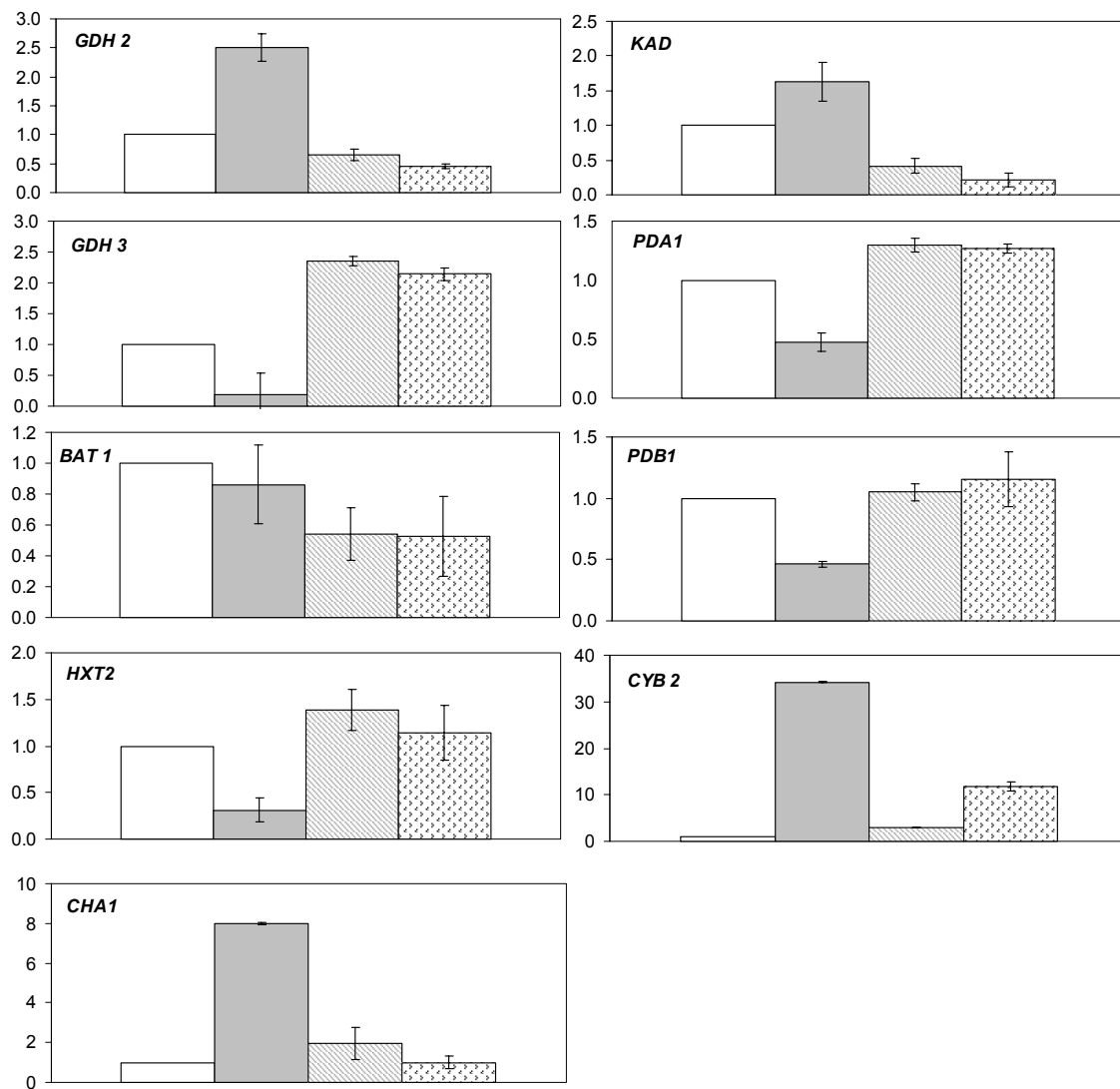


Figure 5. Expression level of *poxL*, *noxE*, *LDH* and *pgiA* genes, measured by real-time PCR. The expression levels of *L. lactis* LD61 pure culture genes were compared to those obtained in co-cultures after 14 h of culture in a SM. L: *L. lactis* LD61; YL: *Y. lipolytica* 1E07 + *L. lactis* LD61; YLS: *Y. lipolytica* 1E07 + *L. Lactis* LD61 + *S. xylosus* C2a.

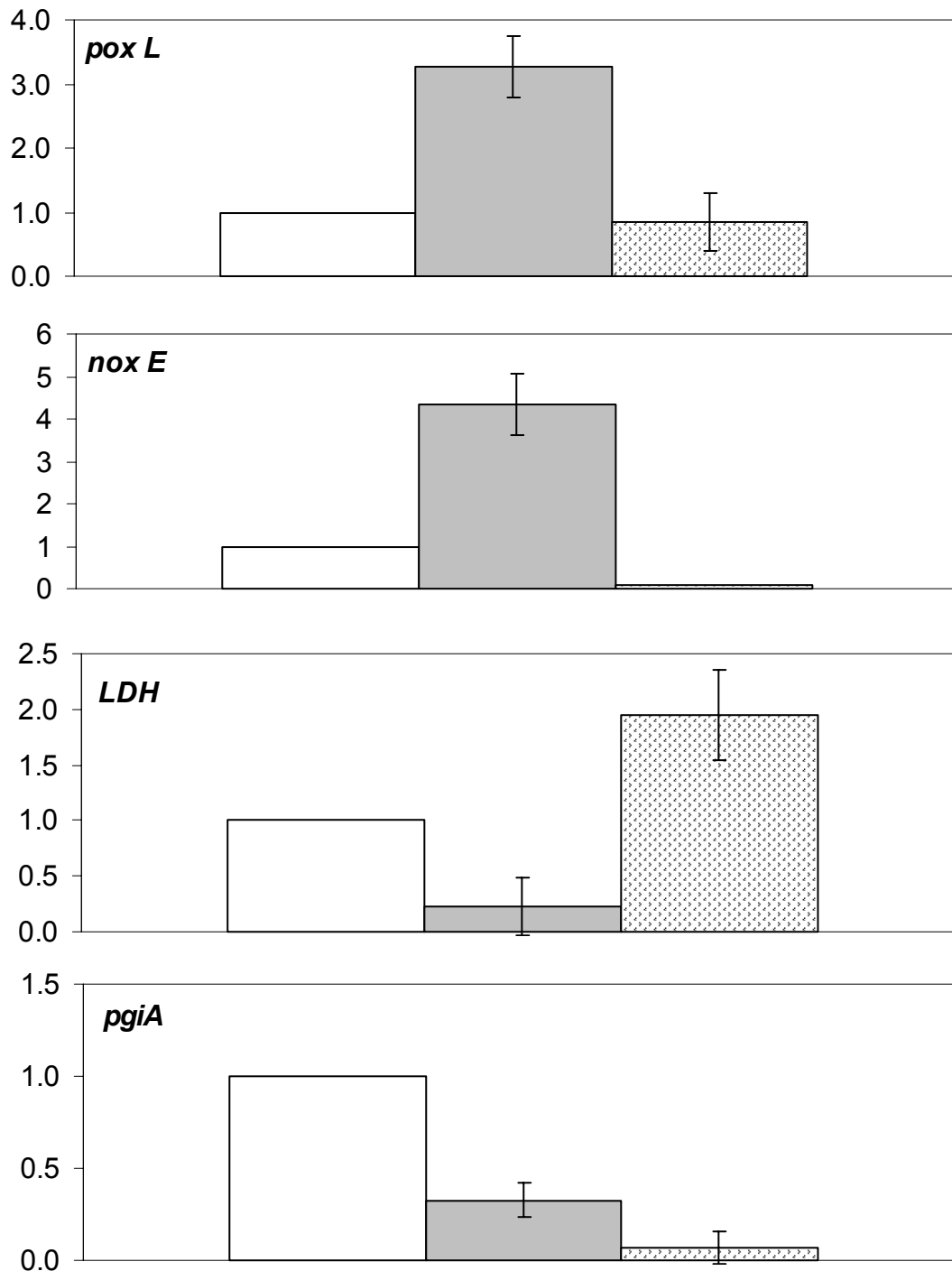


Figure 6. Expression level of *LDH*, *PDHA*, *pgiA* and *AAT* genes, measured by real-time PCR. The expression levels of *S. xylosus* C2a pure culture genes were compared to those obtained in co-cultures after 14 h of culture in SM.

S: *S. xylosus* C2a; YS: *Y. lipolytica* 1E07 + *S. xylosus* C2a; YLS: *Y. lipolytica* 1E07 + *L. Lactis* LD61 + *S. xylosus* C2a.

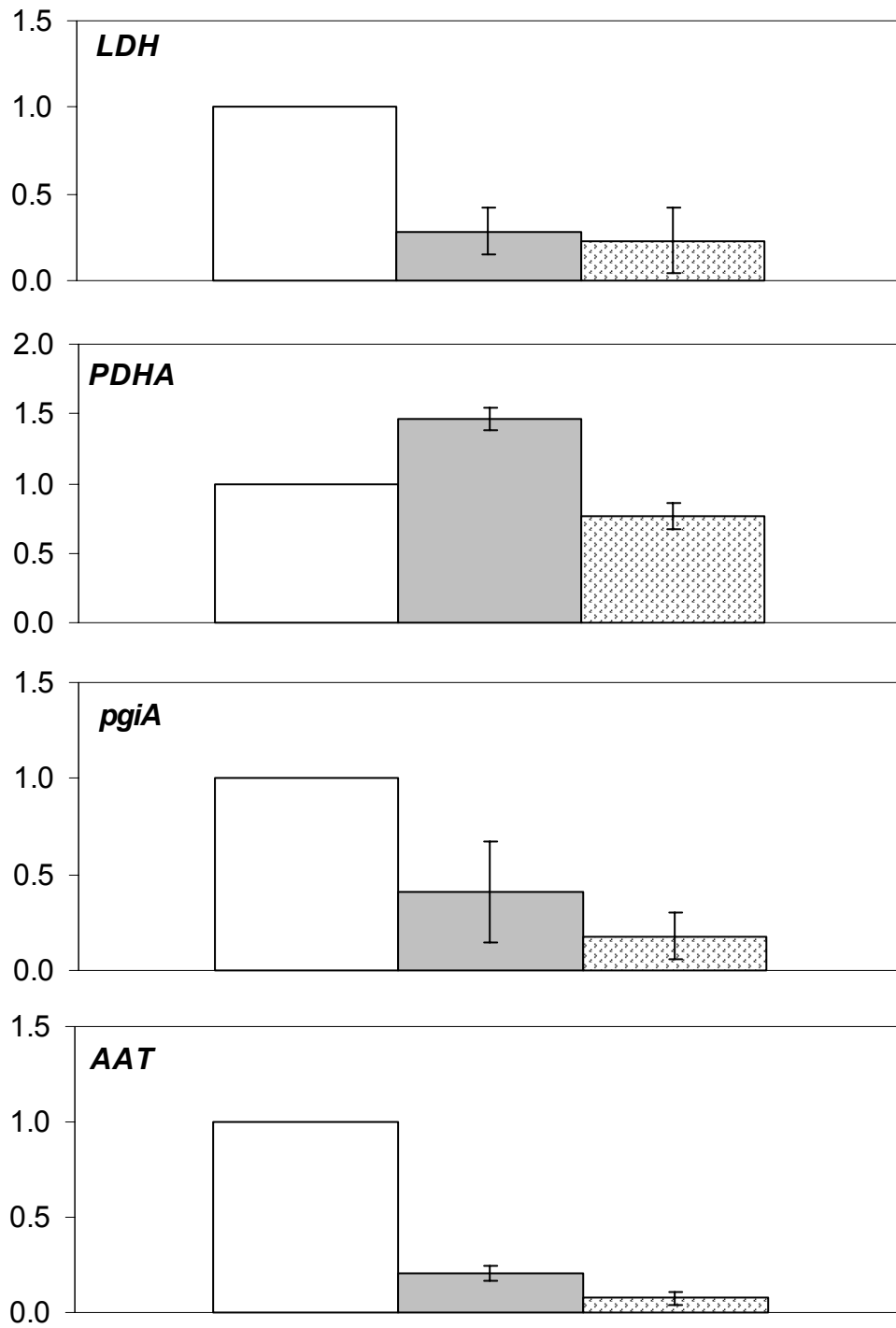


TABLE 1. Primers used for the transcriptomic study of *Y. lipolytica* 1E07 genes.

Primer	Accession no. <sup>a</sup>	Sequence (5'-3')	Putative function <sup>b</sup>
GAP1-R GAP1-F	YALI0B16522g	CGACCACAGCAATGACTTTAATA AACTACTGGAATGAAGCTAACG	Amino acid transporter
ARO8-R ARO8-F	YALI0E20977g	GGCTCCGACCCAGTTGT TTCTCCTCCGCCATCGAGTG	Aromatic aminotransferase
BAT1-R BAT1-F	YALI0D01265g	GTTGGCTCCCAGCTTCTTGT CTCTCGGCGTCGGAACC	Branched-chain amino acid aminotransferase
BAT2-R BAT2-F	YALI0F19910g	TCCAACGGCCTTGGAGTTCT CCTCAAGCTCTACTGCTCCGA	Branched-chain amino acid aminotransferase
JEN1-R JEN1-F	YALI0D20108g	TTAATGTGAGCGTCACAGATATCAC AGCTCCAGCACAAATAAATAGAACAC	Organic acid transporter
GHD2-R GDH2-F	YALI0E09603g	CTTGAGGAGCAAATCAATGACC TCCATGTTCCGACGAGAACTAC	Glutamate dehydrogenase
GHD3-R GDH3-F	YALI0F17820g	CTTAGAGTCGGACATGGAGACAAC TACGTTGAGAAGATGATTGAGTACG	Glutamate dehydrogenase
GND1-R GND1-F	YALI0B15598g	GATGTCCTGGAAAATCTTCTTAATG GATATCATCATTGACGGTGGTAACT	PentosePpathway
PGI1-R PGI1-F	YALI0F07711g	GGTTCTCTGTGAAGTTGATCTTGTC CTTTGATGACTCCAAGATTCTGTTT	Glycolyse
PYC1-R PYC1-F	YALI0C24101g	CAGAGATAACCATCTCCATCTTCAT GAAAGATTTCTGTTGAGGACAAGAA	Pyruvate carboxylase
CHA1-R CHA1-F	YALI0B16214g	TTTCTCCAGAAGAAGAAAAGAAAGT TGCTTCTCAAATACGAACTACACA	L-serine/L-threonine deaminase
HXT2-R HXT2-F	YALI0F19184g	ATAGAAAAAGTAGTTGGCACCACAG GAACTCAAGGCTATTGAGAACTCTG	high-affinity hexose transporter
DLD1-R DLD1-F	YALI0E03212g	AAACGTATTCTCACCGATAG TGGCCCTTAAGAAGGAAGAT	Lactate oxidoreductase
KAD-R KAD-F	YALI0D08690g	CTACTACTCGGTAAGTAGGCATGGA AAAACATGTCCATAAGACCCAGTT	2-oxoisovalerate dehydrogenase
PDA1-R PDA1-F	YALI0F20702g	TAGATATCCTCAAACAGAACCTTGG AACGATCCTATTTCTGGTCTCAAG	Pyruvate dehydrogenase
PDB1-R PDB1-F	YALI0E27005g	AGTCTTCTTGATGGAGTTGAAAATG TAAGGATATCACTCTTGTCGGTCCAC	Pyruvate dehydrogenase
CYB2-R CYB2-F	YALI0E21307g	TGCATCCACTGAGTCTGTTT TACATCACCGCTACAGCTCTA	Lactate dehydrogenase
Act21r Act20	YALI0D08272g*	GGCCAGCCATATCGAGTCGCA TCCAGGCCGTCCTCTCCC	Gene encoding Actin

<sup>a</sup>\*Blanchin-Roland *et al.*, 2005.

<sup>b</sup>Annotations are from Génolevures (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/>)

TABLE 2. Primers used for the transcriptomic study of *L. lactis* LD61 genes.

Primer	Accession no.	Sequence (5'-3')	Putative function
pgiA-R pgiA-F	L0012	TCT TTA CCT TGC AAG TAT CCA AGT C TTC AGC TAA CTT CTC AAC AGA CCT T	Glucose-6-phosphate isomerase
BcaT-R BcaT-F	L0086	GTT TGC TTT CAC CA TTG TTT AAC T ATT AAA AGC CTA TCG AAC AAA GGA T	Branched-chain amino acid aminotransferase
LacC-R LacC-F	L0032	CAA AGA TTG CTT CTA GTT CTT CTC G GTG AAG ATT TCT ATG AGC GTT TGA T	Putative 1-phosphofructokinase
noxE-R noxE-F	L196579	ATT TCC TGC AAT TAT TTC ACT CTT G AAT CGG CCT AGA AGT TTC ATT TAG T	NADH oxidase
poxL-R poxL-F	L0199	GAT GCC AAA CTG ACA ATT AAG AAA T GAT GCC AAA CTG ACA ATT AAG AAA T	Pyruvate oxidase
ptnD-R ptnD-F	L147466	CTG GTT TAC AGT ACG TCC TAT CGT T CTT TAG TGA TTG CAG AAC CTG ATT T	Mannose-specific PTS system component IID
purM -R purM -F	L165202*	GCC ACT CCA GCC ACA ACT TG GAT TGC GTA GCC ATG TGC GTC	Phosphoribosyl-aminoimidazole synthetase

\* Theis *et coll.*, 2007.



TABLE 3. Primers used for the transcriptomic study of *S. xylosus* C2a genes.

Primer	Sequence (5'-3')	Putative function
<i>ILVE-R</i>	CCG AAA GTT GAT GAA GAG ACA GTA T	Glucose-6-phosphate isomerase
<i>ILVE-F</i>	AAT AAG AAG GAC GTA CGC CTA GAA T	
<i>GyrA-R</i>	TAC AAT GTT ACC GTT ACG CTC AGT A	Branched-chain amino acid aminotransferase
<i>GyrA-F</i>	ATG TTA CAA ATG CTG AAA GTG ATG A	
<i>LDH-R</i>	TCT TCA ATT CTG TGT TGT CTT TCA G	Putative 1-phosphofructokinase
<i>LDH-F</i>	ATT AGC AGA AGA ATT TGG TGT TTC A	
<i>pgiA-R</i>	ACG ACA AAT GTT TCA TAA CCT TCA T	NADH oxidase
<i>pgiA-F</i>	AAA TCA GGT ACT ACG ACT GAA CCA G	
<i>PDHA-R</i>	TCA ACA ACT GTT TGT TTT TCA GTG T	Pyruvate oxidase
<i>PDHA-F</i>	GAA AAA GGA TCC ATT AGT ACG CTT T	
<i>PDHB-R</i>	CTA GAG CTA AAC CAC CAA TAC CAG A	Mannose-specific PTS system component IID
<i>PDHB-F</i>	AAA CCG AAT TAC AAA ATG ATG AAA A	
<i>Lac-permease-R</i>	CCA TCT GTC CAT TCT TCT TTA GGT A	Lactate permease
<i>Lac-permease-F</i>	GCT AGC GCT AAT TGG TAT TGT GTA T	
<i>Glucose transporter-R</i>	GTA CAA AGG CTG CAA TAA CGA TAA G	Glucose transporter
<i>Glucose transporter-F</i>	CAA AAG TTG GTG TAG CGA CTA GTT T	
<i>AA transporter-R</i>	ATC GCT TTT ACT TTA GCG TTA GGT T	Amino acid transporter
<i>AA transporter-F</i>	TAG CAA AAT CTA AAG GTG CAG AAC T	
<i>GyrA-R</i>	TAC AAT GTT ACC GTT ACG CTC AGTA	DNA Gyrase subunit A
<i>GyrA-F</i>	ATG TTA CAA ATG CTG AAA GTG ATG A	

### S1. Composition of the complete defined synthetic medium

Constituent	Concentration 1X (g l <sup>-1</sup> )	Constituent	Concentration 1X (g l <sup>-1</sup> )
Glucose	10	Adenine	0.010
sodium lactate 60 %	18	Guanine	0.010
sodium acetate	1	Uracil	0.010
ammonium citrate	0.6	Xanthin	0.010
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7.5	L-Alanine	0.24
		L-Arginine	0.12
MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0.2	L-Asparagine	0.34
FeCl <sub>2</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	0.011	L-Glutamine	0.51
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0.050	L-Glycine	0.17
ZnCl <sub>2</sub> ,	0.005	L-Histidine	0.11
CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0.0025	L-Isoleucine	0.20
		Leucine	0.47
P-aminobenzoic acid	0.010	L-Lysine	0.35
Biotine	0.010	L-Methionine	0.12
Cyano-cobalamine	0.001	Proline	0.68
Folic acid	0.001	L-Serine	0.34
Inosine	0.005	Threonine	0.23
Nicotinique acid	0.001	Tryptophan	0.05
Orotic acid	0.005	Valine	0.33
Ca-Pantothenate	0.001	Glutamate	0.68
Pyridoxamine	0.005	Phenylalanine	0.28
Pyridoxine	0.002	Tyrosine	0.29
Riboflavine	0.001	Cysteine	0.17
Thiamine	0.001		
D,L 6-8 thioctic acid	0.0025		
Thymidine	0.005		

## II. 3. 2. Etude de l'association dans une matrice fromagère, le rétentat

### II. 3. 2. 1. Résumé

Cette étude a pour objectif l'étude de l'association *Y. lipolytica* 1E07, *S. xylosus* C2a et *L. lactis* LD61 dans une matrice modèle fromagère : Le rétentat. C'est un milieu caillé solide, contenant 6 % de matières grasses, ce qui nous permettra par rapport à l'étude précédente, de se rapprocher des conditions fromagères.

Dans le but de mieux comprendre les effets de l'interaction de *S. xylosus* C2a et/ou *L. lactis* LD61 sur *Y. lipolytica* 1E07, la combinaison d'outils microbiologiques, biochimiques ainsi qu'une analyse globale de l'expression des gènes par l'utilisation de la puce à ADN complète de *Y. lipolytica* a été réalisée. L'analyse transcriptomique des associations *Y. lipolytica* 1E07/*L. lactis* LD61 et *Y. lipolytica* 1E07/*L. lactis* LD61/*S. xylosus* C2a a été comparée à celle obtenue en culture pure de *Y. lipolytica* 1E07. De plus, les résultats de puce à ADN ont été validés par RT PCR quantitative. Pour cela, plusieurs gènes ont été sélectionnés et leur expression a été suivie dans les trois conditions de cultures de *Y. lipolytica* 1E07.

Les résultats de suivi microbiologique des différentes associations ont montré une similarité de croissance de *S. xylosus* C2a et de *L. lactis* LD61 dans les différentes associations. Une légère augmentation du temps de latence de la levure a été observée dans la croissance de *Y. lipolytica* 1E07 en présence du staphylocoque. De plus, le suivi du pH met en évidence une acidification du milieu par la bactérie lactique qui consomme le lactose et le transforme en lactate.

Les résultats transcriptomique obtenus mettent en évidence une répression des gènes de *Y. lipolytica* 1E07 impliqués dans le catabolisme des acides aminés dans l'association *Y. lipolytica* 1E07/*L. lactis* LD61/*S. xylosus* C2a (*BAT1*, *GAP1*, *LYS5*, *DUR3*, *BNA1* et *NPR1*), par rapport à la culture pure de la levure. Cette répression n'est pas observée dans l'association *Y. lipolytica* 1E07/*L. lactis* LD61. Sachant que la plupart de ces gènes sont sous le contrôle de la NCR (« Nitrogen Catabolite Repression »), on peut supposer une production d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) supérieure dans l'association *Y. lipolytica* 1E07/*L. lactis* LD61/*S. xylosus* C2a que dans l'association *Y. lipolytica* 1E07/*L. lactis* LD61. La concentration de  $\text{NH}_4^+$  du milieu dépend en effet de la consommation des acides aminés [9] qui serait à l'origine d'un équilibre entre l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) et le  $\text{NH}_4^+$ . Plusieurs études ont mis en évidence le rôle du  $\text{NH}_3$  comme molécule signal chez les levures [10-15]. La production de  $\text{NH}_3$  permettrait aux levures de rentrer en phase de ralentissement de croissance dans le but de

faire face aux conditions stressantes de l'environnement. Dans notre étude on émet l'hypothèse d'une possible compétition pour l'oxygène entre la levure qui est en aérobie stricte et le staphylocoque qui est en anaérobie facultatif. Cette étude a mis en évidence un état de stress oxydatif chez la levure en présence de *S. xylosus*, ainsi qu'une modification du fonctionnement mitochondriale et de l'expression des gènes de la chaîne respiratoire.

II. 3. 2. 2. *Publication n°4*: "Transcriptomic study of culture association in model cheese".

**A soumettre dans le Journal Applied and Environmental Microbiology, article en cours de rédaction**

# **Transcriptomic study of culture association in model cheese**

**J. Bailly<sup>1</sup>, S. Mansour<sup>1</sup>, J. Aubert<sup>2</sup>, P. Bonnarme<sup>1</sup>, C. Monnet<sup>1</sup>, S. Landaud<sup>1</sup>, A.S. Sarthou<sup>1</sup>  
and F. Irlinger<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Agro Paris Tech-INRA, UMR 782 Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, 78850  
Thiverval Grignon, France.

<sup>2</sup>Agro Paris Tech-INRA, UMR 518 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris Cedex 05, France.

Corresponding author. Phone: +33 (0)1 30 81 54 91. Fax: +33 (0)1 30 81 55 97. E-mail:  
irlinger @grignon.inra.fr

## **ABSTRACT**

Whole-genome microarray of *Yarrowia lipolytica* 1E07 was used to determine relative transcripts levels in cell to final exponential phase in pure culture, or cultivated with one lactic acid bacteria (*Lactococcus lactis*) or with two bacterium (lactic acid bacteria and *Staphylococcus xylosus*) on an experiential ultrafiltration (UF) cheese. The results showed that 102 and 216 genes were differentially expressed when comparing culture pure to culture inoculated with one or two bacteria. Functional analyses suggested that the yeast *Y. lipolytica* 1E07 have the ability to adapt it metabolism to oxygen availability and microbial associations. In presence of *S. xylosus*, the genes involved in the oxydative stress are induced. Moreover, the expressions of genes involved in the mitochondrial and respiratory chain of the yeast are modified depending on the culture association. The study provides the first global description and functional interpretation of transcriptomic response to metabolic adaptation on a UF cheese.

**KEY WORDS:** *Yarrowia lipolytica* 1E07, Microarray, RT quantitative PCR, cheese.

## INTRODUCTION

The cheese production involves many microorganisms such as yeast, bacteria and molds. The cheese sensory properties depend on the presence of the cheese microbiota, whose community structure evolves through a succession of different microbial groups which are essential for the texture, taste and color of these (6, 18, 19, 44). With difficulty controllable, the yeast species, *Yarrowia lipolytica* is never inoculated in the manufacturing processes cheese maker. However, it develops systematically on the surface of smeared soft cheeses and has a positive or negative impact on the sensory quality of the product according to its concentration.

*Yarrowia lipolytica* is known to be an adventitious yeast species, that exists in diverse environments, especially in wide cheese ecosystem and displays a large spectrum of metabolic capabilities (9, 31, 36). The cheese yeast strains have been naturally selected over hundred of years to efficiently use dairy components under rather stressful environmental cheese conditions and to compete with other cheese microorganisms. These conditions are substantially different from laboratory conditions, especially with regard to the high fat and casein content, evolutive pH value (4,5 to 7,0). All these conditions lead to gene expression changes and structural modifications of yeast cells as they adapt to these extreme conditions.

Thanks to the progress of the genomics of microorganisms and to the development of methodologies of expression analysis in technological conditions (methods of RNA extraction from cheese, transcriptomic and proteomic analysis), it becomes possible to characterize the *in situ* microbial expression of yeasts within complex matrix as cheese, on the scale of the gene (16, 28, 35).

The knowledge of genes of a microbial genome can lead to the construction of microarray with DNA allowing then to measure simultaneously the level of expression of several thousand genes in a large number of different conditions. In particular, these techniques allow to observe the differences of expression of the genes when a micro-organism is cultivated only (in pure culture) or in association (in co-culture).

Nevertheless, the current knowledge of molecular mechanisms of the functioning of a micro-organism in a complex environment and in the presence of the others is still conceptual and a methodological challenge. So far, the biochip used with mixed cultures are partial and serve only rarely for transcript detection (11). Most of them are devoted to the detection of microbial species in complex ecosystems though ribosomal DNA sequences or to the detection of a reduced number of DNA sequences without quantifying their expression levels (37, 42, 45). One of a major problem of the microarray technique utilization when studying a complex ecosystem, is the cross-hybridization of cDNA sample from the partner species on

the microarray spots containing DNA of the species of interest. The specific signal is consequently corrupted by the hybridization of foreign cDNA (33).

The purpose of this investigation is to seek global information regarding the metabolic gene expression response of *Y. lipolytica* grown in culture pure or in association with two others cheese bacteria (*Staphylococci xylosus* C2a and *Lactococcus lactis* LD61) on cheese medium, using DNA microarray technology. The yeast strain used in this work was a cheese strain that was originally isolated in Livarot, a smeared soft cheese. Technically, we used DNA microarrays bearing 6688 ORFs from the laboratory-sequenced strain E150. A microarray protocol was optimized in order to reduce the non specific cross-hybridization of the cDNA from two bacteria on the yeast genome. In addition, to make any biological interpretation of transcriptomic data meaningful, we measured physiological and metabolic data such as growth dynamics (cells viability), consumption of lactate, lactose and amino-acids. This functional analysis is the first study carried out under simulated but complex cheese conditions.



## MATERIALS AND METHODS

**Strains and storage conditions.** The microorganisms used in this work were *Yarrowia lipolytica* 1E07, *Staphylococcus xylosus* C2a and *Lactococcus lactis* LD61. *Y. lipolytica* 1E07, originally isolated from the Livarot French cheese was a kind gift from the LMILA (Laboratoire des Micro-organismes d'Interêt Laitier et Alimentaire, Caen, France) and selected for its biotechnological potential. *Staphylococcus xylosus* C2a was a kind gift from S. Leroy, INRA Theix, France, is derived from the type strain DSM20267 of human skin origin and was cured of its endogenous plasmid, pSX267 (20). *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar diacetylactis LD61 was provided by SOREDAB (Bongrain, La Boissière Ecole, France). This strain contains plasmids that allow optimal growth in milk (41). Strains were stored in a 5% glycerol non-fat dry milk at -80°C until it was used.

**Precultures conditions.** A preculture of each microorganism was grown in a 100 ml flask containing 20 ml of potato dextrose broth (PDB) (Difco Laboratories, Detroit, MI) for the yeast, Brain heart infusion broth (BHI) (Biokar Diagnostc, Beauvais, France) for *S. xylosus* C2a and M17 (Biokar Diagnostc, Beauvais, France) for *L. lactis* LD61. These media were inoculated with 200 µl of the strain stock solution suspension and incubated for 48 h at 25°C under agitation (100 rpm) for *Y. lipolytica* 1E07 and *S. xylosus* C2a. The anaerobic bacteria *L. lactis* LD61 was cultivated into 100 ml of reconstituted skim milk (100 g/ liter; Difco Laboratories, Detroit, MI) for 15 h at 30°C without agitation.

**Cheese production.** Ultrafiltered milk was produced as described by Hannon et al. (22) and stored at -20°C. Its final fat concentration was 5.5 %. Ultrafiltered milk was inoculated using precultures with a concentration of 10<sup>7</sup> CFU/ml for *L. lactis* LD61, 10<sup>5</sup> CFU/ml for *Y. lipolytica* 1E07 and 10<sup>8</sup> CFU/ml for *S. xylosus* C2a. Moreover, rennet (chymosin with an activity of 180 international milk-clotting units/ml; Maxiren 180; DSM Food Specialitoes, Delf, The Netherlands) was added at a final concentration of 60µl/ liter. After incubation for 7 h at 30 °C, the curd was transferred onto a grid in a sterile crystallizing basin. Ripening was then performed at 14 °C for 24 h, 48 h or 72 h.

**Measurement of culturable microorganism concentration.** One gram of cheese was mixed with 9 ml of physiological saline (9 g/ liter NaCl). After dispersion with a mechanical blender (Ultra-Turrax model T25; Ika Labortechnik, Staufen, Germany) for 1 min at 11,500 rpm, 10-fold serial dilutions in physiological saline were prepared. Yeast and bacterial growth as monitored by counting the viable cells after plating on YEPD agar medium (Biokar diagnostics, Paris, France) for *Y. lipolytica*, brain heart infusion agar supplemented with 50

mg/liter amphotericin (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) for *S. xylosus* and M17 agar supplemented with 50 mg/liter amphotericin (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) for *L. lactis*. The values were expressed in CFU ml<sup>-1</sup> (colony forming unit).

**pH, lactate, lactose and amino acids analysis.** The surface pH was measured by using a surface electrode Blue line 27 (Schott). The pH values were the arithmetic means of three measurements. The lactose and lactate contents were determined for the whole cheese by using high-performance liquid chromatography as previously described by Leclercq-Perlat et al. (26). The release of free amino acids was measured for the whole cheese as described by Grunau and Swiader (21).

**Extraction of mRNA.** Cheese samples (pure culture of *Y. lipolytica* and culture of *Y. lipolytica* in association with *L. lactis* or with *L. lactis* and *S. xylosus*) are taken (approximately 125 mg) after 48 hours of ripening when the biomass of *Yarrowia lipolytica* reaches a value close to 5 x 10<sup>7</sup> CFU / g of cheese. RNA was extracted as previously described RNA was extracted as previously described (35).

**DNase treatment of the RNA.** Total RNA was treated with the TURBO DNA-free kit (Ambion, Austin, TX) to eliminate a genomic DNA contamination and then was stored at -80 °C.

**Quantification of RNA and quality control.** Purified RNA was quantified at 260 nm using a NanoDrop (Technologies, Wilmington, DE). The quality of total RNA was checked by microcapillary electrophoresis using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

**Microarray of *Yarrowia lipolytica*.** The microarray we used in this study contained 6688 ORFs and was manufactured by Eurogentec (Seraing, Belgium) using 60-mer oligonucleotides representing 99 % of the yeast genome.

**Extraction of DNA.** DNA of culture of *S. xylosus*, *Y. lipolytica* and *L. lactis* were extracted from cheese as previously described (34).

**Genomic DNA Labeling.** In order to verify the biochip specificity of *Y. lipolytica*, the DNA coming from pure culture was fluorescently labelled with the cyanine dye (Cy 3 and Cy 5) according to the manufacture's instructions of BioPrime<sup>®</sup> Array CGH Genomic Labeling System (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). *Y. lipolytica* 1E07 DNA was labeled with Cy5 and the other species DNA (*S. xylosus*, *L. lactis*) with Cy3 and both were hybridized on the same biochip.

**Labeling of cDNA targets.** Fluorescent labelled cDNA was synthesized from 5 µg of total RNA using the Cy-Scribe first-strand cDNA labelling kit (Amersham Biosciences,

Piscataway, NJ) without any amplification, using both anchored oligo(dT) and random nonamer priming methods together. Reverse transcription labeling reactions were performed at 42 °C for 2 h with a thermocycler (GeneAmp PCR system 9700; Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster city, CA) using direct incorporation of dCTP-Cy3 and dCTP-Cy5 (Amersham Biosciences) according to the manufacture's instructions. The RNA template and unincorporated fluorescent nucleotides were then eliminated by chemical treatment (15 min at 37 °C with 2 M NaOH). After neutralization with 2 M HEPES (pH 6.8) (Sigma-Aldrich), labelled cDNA was purified using QIAquick<sup>®</sup> Nucleotide Removal kit (Qiagen, Hilden, Germany) and then concentrated using a Microcon YM-30 filter (Millipore, Bedford, MA).

**Microarray processing and data analysis.** Experiments were carried out at the Biochips platform of Jouy en Josas with DNA Microarray Hybridization Oven (Agilent. Palo Alto. CA). In order to validate the specific hybridization of *Y. lipolytica* on the microarray, two independent biological replicates of the 3 cultures conditions (*Y. lipolytica*, *Y. lipolytica* + *L. lactis* and *Y. lipolytica* + *L. lactis* + *S. xylosus*) were used. RNA from these duplicates was independently extracted as described above. The labelled cDNA were fragmented by adding 8 µl of RNA Fragmentation Buffer (Agilent). Then water is added to obtain 200 µl of the final reaction volume. The mix was incubated for 30 min at 60°C, then 200 µl of 2x GEx Hybridization buffer HI-RPM (Agilent) was added to stop the reaction. The slides were hybridized for 16 h at 42°C or 60°C. After hybridization, the slides were washed three time in 2X SSC (0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate), 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) (Roche Applied System, IN) solution at 50 °C, then twice in 0.5X SSC, 0.1% SDS, once in 0.1X SSC, 0.1% SDS and finally three time in 0.1X SSC solution. The slide was then dried by centrifugation 1 min at 3000g.

The hybridization signal was detected by scanning using an Agilent G2565BA DNA microarray scanner at 5 µm resolutions. Signal quantification was transformed to numerical values using the integrated *Feature extraction Software* 9.5.1. The software returns a set of spot quality measures in order to evaluate the goodness and the reliability of spot intensity estimates.

The analyses were performed twice by swapping the fluorescent dyes Cy3 and Cy5 to reduce the false-positive, negative value due to dye effects. The statistical analysis was based on two dye swap. For each array, the raw data comprised the logarithm of median feature pixel intensity at wavelengths 635 nm (red) and 532 nm (green). No background was subtracted. In the following description, log ratio refers to the differential expression between two conditions. It is either  $\log_2$  (red/green) or  $\log_2$  (green/red), according to the experiment

design. An array-by array normalization was performed to remove systematic biases. First, we excluded spots that were considered badly formed features. Then, we performed a global intensity-dependent normalization with the Loess procedure to correct the dye bias. Finally, for each block, the log-ratio median calculated over the values for the entire block was subtracted from each individual log-ratio value to correct print tip effects on each metablock. To determine differentially expressed genes, we performed a paired t test on the log ratios, assuming that the variance of the log ratios is the same for all genes. Spots displaying extremes of variance (too small or too large) were excluded. The raw P values were adjusted by the Bonferroni method, which controls the family-wise error rate (FWER). We use the Bonferroni method (with a type I error equal to 5%) in order to keep a strong control of the false positives in a multiple-comparison context.

Positive and negative genes were placed into the functional categories following the classification of clusters of orthologous groups of proteins (COGs) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>).

**Reverse transcription and real-time RT-PCR conditions for Microarray-Data Validation.** cDNAs was synthesized from DNase-treated RNA using the SuperScript™ III First –Strand Synthesis System (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). A mix containing up to 5 µg of total RNA, Random and dNTP (10mM) was prepared and incubated at 65°C for 5 min, then placed on ice for at least 1 min. The cDNA synthesis mix containing 10X RT buffer, MgCl<sub>2</sub> (25 mM), DTT (0.1 M), RNaseOUT™ (40 U µl<sup>-1</sup>) and SuperScript™ III RT (200 U µl<sup>-1</sup>) was added to each RNA/primer mixture and then incubated for 50 min at 50°C. The reaction was stopped by incubation for 5 min at 85°C. The resulting cDNA samples were stored at -20 °C. Quantitative real-time RT-PCR validation was performed for 22 genes on biological replicates. Samples have been taken after 48 h of culture. The primers for real-time PCR were designed to have a length of about 20-25 bases, a G/C content of over 50%, and a T<sub>m</sub> of about 60°C. The length of the PCR products ranged between 90 and 150 bp. LightCycler™ software (Roche, Mannheim, Germany) was used to select primer sequences. All the primers were synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium) (Table 1).

SYBR green I PCR amplification was performed using a LightCycler (Roche). Amplification was carried out in a 10-µl (final volume) mixture containing 250 ng of RNA sample, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µM of primer, and 1 µl of LightCycler-FastStart DNA Master SYBR green I (Roche). Five dilutions of cDNA were made to determine the efficiencies of real-time PCR. A negative control without cDNA added, was systematically included. The amplification procedure involved incubation at 95°C for 8 min for the initial denaturation, followed by 40

cycles consisting of (i) denaturation at 95°C for 10-s; (ii) annealing at a temperature that was 5°C below the melting temperature of the primers for 7-s; (iii) extension at 72°C for 6-s, and; (iv) fluorescence acquisition (530 nm) at the end of extension. The temperature transition rate was 20°C/s for each step. After real-time PCR, a melting curve analysis was performed by continuously measuring fluorescence during heating from 65 to 95°C at a transition rate of 0.1°C/s. The threshold cycle ( $C_T$ ) values were determined with the LightCycler software (version 3.3), using the second derivative method. Standard curves were generated by plotting the  $C_T$  values as a function of the log of the initial RNA concentration. PCR efficiency ( $E$ ) was then calculated using the following formula:  $E=10^{-1/\text{slope}}$  (39). The Actin gene (8) was chosen for *Y. lipolytica*, as a suitable internal control gene to normalize the results. The Pffaf1 method (38) was used to calculate the fold change in transcript abundance normalized to the control gene and relative to the pure culture sample. Statistical analysis was performed using Student's t-test. A  $P$  value lower than 0.05 was considered as significant. The baseline of each gene is the average of 3 measurements for the experimental condition chosen as the reference (*Y. lipolytica* pure culture), and standard deviation was calculated for each gene as well. Genes were considered as responsive if, when compared with their reference, they had an mRNA concentration that changed 2 fold or more.

## RESULT AND DISCUSSION

For simplicity, abbreviations were used for each culture association. YL: *Y. lipolytica* 1E07 and *L. lactis* LD61 co-culture; YS: *Y. lipolytica* 1E07 and *S. xylosus* C2a co-culture; LS: *L. lactis* LD61 and *S. xylosus* C2a co-culture; YLS: *Y. lipolytica* 1E07, *L. lactis* LD61 and *S. xylosus* C2a co-culture.

### Microbial and biochemical dynamics during the development of the ecosystem on model cheese.

**(i) Microorganisms growth.** The growth characteristics of the microorganisms as a function of the association are presented in Figure 1. There was a good reproducibility (a difference of less than 0.5 log<sub>10</sub> units) between the results of duplicate experiments.

*Y. lipolytica* 1E07 growth. *Y. lipolytica* 1E07 growth in the different cultures associations is shown in the Figure 1 A, B and C. Since the beginning and up to 24 h of culture, the cells counts of *Y. lipolytica* 1E07 slightly decrease YLS associations (Figure 1C), and reach 7.28 x 10<sup>5</sup> CFU ml<sup>-1</sup> at 24 h compared to 1.73 10<sup>6</sup> CFU ml<sup>-1</sup> in the Y (Figure 1A) and YL (Figure 1B) cultures. Between 24 h to 48 h of culture, *Y. lipolytica* 1E07 growth fluctuates in the YLS association. At 72 h of culture, *Y. lipolytica* 1E07 cells counts increase up to 4.42 x 10<sup>7</sup> CFU ml<sup>-1</sup> and 3.45 x 10<sup>7</sup> CFU ml<sup>-1</sup> respectively in the YL and YLS associations.

*L. lactis* LD61 growth. *L. lactis* LD61 growth in the YL and YLS cultures associations is respectively shown in the Figure 1B and 1C. It remains similar regardless of the culture association.

*S. xylosus* C2a growth. *S. xylosus* C2a growth in the YLS association is shown in the Figure 1C. The growth of *S. xylosus* C2a reach the stationary phase at 48 h of culture, and reached 9 x 10<sup>7</sup> CFU ml<sup>-1</sup> cells counts.

**(ii) pH variations.** The pH evolution as a function of the association is presented in Figure 1. The pH increases steadily up to 6.8 in *Y. lipolytica* 1E07 culture (Figure 1A). In contrast, the pH considerably decreases in the two cultures associations containing the lactic acid bacteria (LAB). In fact, at 72 h of culture, the pH respectively reached 5.1 and 5.2 in the YL (Figure 1B) and YLS (Figure 1C) associations.

**(iii) Lactose and lactate dynamics.** Lactose and lactate dynamics are shown in figure 2. After 48 h of culture, only ~1 g l<sup>-1</sup> of lactose was used in *Y. lipolytica* 1E07 culture. In the YL and YLS associations, ~ 3.5 g l<sup>-1</sup> of lactose was used and respectively 2 g l<sup>-1</sup> and 1 g l<sup>-1</sup> of lactate produced.

**(iv) Amino acids dynamics.** The amino acids measured in the supernatant of the different culture association are shown in figure 4. The glutamine (200 μM) is the only amino acid

measured in the cheese deprived of microorganism (Figure 3). Except for asparagine, cysteine and ornithine, all amino acids were produced in large quantities in the cheese inoculated with the different microorganism association. Due to the balance between amino acids production and consumption, the consumed amino acids can not be determined in the different cultures (Figure 3). We observed the lowest amino acids concentration in the YLS association after 48 h of culture, which may due to a possible competition for the amino acids between the yeast and *S. xylosus* C2a.

### **Microarray validation**

Changes in the global expression of *Y. lipolytica* genes in pure culture or in association at 48h of ripening were analyzed with microarrays containing 60mer oligonucleotides corresponding to 6690 ORFs from the annotated genome of *Y. lipolytica*. The microarray results were confirmed by real time PCR.

**(i)Microarray specificity.** The specificity of the array was tested due to the difference between the sequencing strain genome (*Y. lipolytica* E150) (10, 15) and the strain of our interest (*Y. lipolytica* 1E07). For that, the *Y. lipolytica* 1E07 DNA was labeled and hybridized at 60 °C. The result showed a specificity of *Y. lipolytica* 1E07 strain for the microarray. In fact 100 % of the genes were hybridized on the biochip by using the Agilent technology method for hybridization. The good rate of hybridization between the two different strains of *Y. lipolytica* may due to phylogenetic similarity between *Y. lipolytica* strains (supplemental data).

**(ii)Percentage of non specific hybridization.** The percentage of hybridization was statistically calculated using the R program. The signal frequency was calculated and relative to log 2 (red signal/green signal). The gene signal higher than 8 was considerer as a hybridized spot, whereas the inferior than 8 was considered as a background. The study of the *Y. lipolytica* 1E07 association with the two bacteria: *S. xylosus* C2a and *L. lactis* LD61 need primarily experiment in order to maximally reduce the interspecies cross-hybridization. Indeed, the extraction of RNA from the ultrafiltration cheese in will be constituted of all the species partners'. In order to investigate the percentage of non specific hybridization Cy5-labelled DNA of *Y. lipolytica* 1E07 was hybridized with the Cy3-labelled DNA of *S. xylosus* C2a or the Cy3-labelled DNA of *L. lactis* LD61. Results shown that only 1 % and 3.6 % of respectively *S. xylosus* C2a and of *L. lactis* LD61 genes were cross hybridized with the *Y. lipolytica* 1E07 genome (Supplemental data).

### **Transcriptomic study of *Y. lipolytica* 1E07 in association in the model cheese.**

Samples for transcriptome analyses were taken after 48 h of culture in the 3 cultures conditions. The goal of the experiment was to compare *Y. lipolytica* 1E07 gene expression changes in ultrafiltration cheese in pure culture or in association with *L. lactis* LD61, or with *L. lactis* LD61 and *S. xylosus* C2a. The transcription profiles of *Y. lipolytica* strain 1E07 were determined at the second day of ripening by hybridizing on *Y. lipolytica* E150 microarray, labelled cDNA from ultrafiltration cheese inoculated with 3 strains (*Y. lipolytica* 1E07, *L. lactis* LD61 and *S. xylosus* C2a) and 2 strains (*Y. lipolytica* 1E07, *L. lactis* LD61) relative to the cheese inoculated by only *Y. lipolytica* 1E07, used as the reference. The analyses were performed twice by swapping the fluorescent Cy3 and Cy5 dyes using RNAs extracted from two independent cheese experimentations. According to our statistical test, respectively 102 and 216 genes showed a significant variation in fluorescence intensity, between *Y. lipolytica* 1E07 pure culture and YL or YLS associations (Figure 4). Fifty four genes were expressed similarly in the two associations compared with *Y. lipolytica* 1E07 pure culture (Figure 4). These differentially expressed genes were classified by functional categories following the classification of clusters of orthologous groups of proteins (COGs) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) in order to search for correlations between expression profiles of the three datasets. The main functional categories were genes that encode proteins implicated in DNA and RNA metabolism and repair, in growth-associated functions (maintenance, cell cycle) but also fatty acid, amino acids, lactate, ammonia/ammonium and energy conversion metabolisms (Table 2 and 3).

The RT quantitative PCR approach has been integrated to validate the results of primary differential gene expression screening method (cDNA microarrays). Twelve candidates genes with known sequence has been selected among the genes differentially expressed in mixed compared to the pure culture (Tables 2 and 3). Moreover, eleven genes which were not showed a significant variation in fluorescence intensity, according to our statistical test were also selected.



### ***Lactate, lactose and Proteins metabolism***

Lactate was produced in the presence of the lactic acid bacteria and *S. xylosus* from the lactose consumption in the YL and YLS association (Figure 2). The production of lactate induced the up-regulation of *CYB2* and *DLD1* genes. They respectively encode L-lactate ferricytochrome c oxidoreductase (EC 1.1.2.3) and D-lactate ferricytochrome c oxidoreductase (EC 1.1.2.4). These 2 enzymes are activated by the lactate production and respectively oxidize L- and D-lactate to pyruvate (29-32). Therefore this result may indicate a possible lactate consumption by the yeast in the YL and YLS associations.

Moreover, in the YL and YLS associations, the *XPR2* gene expression encoding an extracellular alkaline protease, is down-regulated compared to *Y. lipolytica* pure culture. *Y. lipolytica* is able to secrete different types of proteases depending on the pH of the environment. At 48 h of culture (the time of RNA extraction), the pH was about 6.6 in the *Y. lipolytica* 1E07 pure culture, and 5.1, 5.2 respectively in the YL and YLS associations. The *XPR2* gene is only induced at neutral pH (40). The higher expression of *XPR2* in *Y. lipolytica* pure culture may due to an absence of free substrate such as lactate which could be directly consumed by the yeast.

### ***Possible hypoxia condition in presence of S. xylosus***

Gene's expressions involved in the respiratory pathway varied considerably in the YLS association compared to the YL culture condition and to pure culture condition (Tables 2 and 3). The genes which are important for mitochondrial oxidative phosphorylation like *COX5A* and *ATP1* were repressed in the YLS association. The *COX5A* encodes a subunit Va of cytochrome c oxidase, which is the terminal member of the mitochondrial inner membrane electron transport chain whereas *ATP1* encodes the alpha subunit of mitochondrial ATP synthase. These enzymes are good indicator of the mitochondrial respiratory functions which appear to be kept turned down in the YLS association. The expression of *COX5A* and *COX5B* is tightly regulated by oxygen. *COX5A* is switched off when the O<sub>2</sub> concentration drops below a threshold of a 0.5  $\mu$ M O<sub>2</sub>. Being strictly aerobic yeast, its growth and metabolite secretion are affected by the amount of oxygen available in the culture medium (24).

Several genes involved in sterol homeostasis (*ERG8*, *PDR16*, *OYE3*), redox regulation and/or oxidative stress (*SOD2*, *CTT1*), detoxification lipid and fatty acid metabolism were differentially expressed, in association with *L. lactis* and *S. xylosus*, and with only the lactic acid bacteria; and may have a role in modifications in cell wall porosity, in modulation of lipid levels in sub-cellular compartments as mitochondria.

In the YLS association the expression of the lipase *LIP2*, was 1.5-fold increased compared to *Y. lipolytica* pure culture, whereas in the YL association the expression level remain steady. One of the most important products secreted by this yeast is lipase. Lipase productivity is affected by different environmental factors (13, 25) such as the amount of oxygen available (4), which could be lower in the YLS association compared to YL culture condition. The *ERG8* encodes a phosphomevalonate kinase (EC 2.7.4.2), an enzyme of isoprene and ergosterol biosynthesis that was up-regulated in the two associations compared to *Y. lipolytica* 1E07 pure culture, and the result was confirmed by the RT quantitative PCR. Ergosterol is an essential component of yeast plasma membranes which affects membrane fluidity, permeability, and the activity of membrane-bound enzymes (12, 14). In *S. cerevisiae*, ergosterol is also a major component of secretory vesicles and has an important role in mitochondrial respiration (14, 46) and has been predicted to play a role in oxygen sensing (43). Moreover, the *PDR16* gene encodes a phosphatidylinositol transfer protein, is up-regulated in the complete association. This protein, which controls the levels of various lipids may regulate lipid synthesis.

Microarray statistical analyses could not show up differentially genes involved in the defense pathway of the yeast. In order to highlight the possible stress condition of the yeast in the different associations, three genes involved in the defense pathway were selected for the RT quantitative PCR analysis. The expression level of *CTT1* and *SOD2* encodes respectively a catalase and a superoxide dismutase, were up-regulated in the YL and YLS association. *CTT1* and *SOD2* are crucial antioxidant enzymes. *SOD2* removes  $O_2^-$  by converting it to  $H_2O_2$ , which, in turn, it is disproportionate to water by catalase or glutathione peroxidase. Cytosolic catalase, *CTT1* is thought to play a general role, as *CTT1* expression regulated by various stresses, including oxidative stress, osmotic stress, and starvation (5, 17). Various stress effects are known to lead to development of adaptive mechanisms in microorganisms, which strengthens their resistance to unfavorable environmental factors. The formation of reactive oxygen species (ROS) during cellular respiration is an unavoidable side effect of aerobic life relying on oxygen as the final electron acceptor. The influence of stressors on cells is directly or indirectly caused by formation of reactive oxygen species (ROS), whose effect results in cell death. Analysis of the literature indicates that mitochondria, in particular, the respiratory chain are one of the targets of ROS effect. ROS can directly inactivates electron transfer via the respiratory chain, ATPase, and other protein (27). ROS including hydrogen peroxide  $H_2O_2$ , superoxide radical  $O_2^-$ , and hydroxyl ion  $OH^-$  are toxic to microbial cells. The toxicity of these species is determined by their ability to oxidize lipids, proteins and DNA (23).

Previous study showed that the activity of antioxidant enzymes in *Y. lipolytica* (catalase, superoxide dismutase) increased in the process of adaptation to stress conditions (7).

Moreover the production of lactate by *L. lactis* LD61 and *S. xylosus* C2a, may also have an impact on the induction of the antioxidant pathway. In fact, the prooxidant effects of organic acids have been demonstrated. The presence of lactate enhanced the production of hydroxy radical (OH<sup>•</sup>) (1). Lactate interacts with the ferric ion (Fe<sup>3+</sup>) to form a stable complex of Fe<sup>3+</sup>-lactate at a molar ratio 1:2. Then this complex reacts with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to enhance the OH<sup>•</sup> generation via the Fenton reaction (2, 3).

### ***Amino acids metabolism modification***

In the complete association, genes involved in the amino acids metabolism were down-regulated (*DUR3*, *LYS5*, *BAT1*, *BNA1*, *NPRI*), except the *GDH2*, *BAT2* and *GAP1* which respectively encode a glutamate dehydrogenase, a branched chain aminotransferase and an amino acids transporter. *LYS5*, *NPRI*, *GAP1* and *GDH2* expressions are under the nitrogen catabolite repression (NCR). The NCR is active on good (preferential: ammonium) and inactive on poor (non preferential: amino acids) nitrogen source.

We suggest a possible competition between *Y. lipolytica* 1E07 and *S. xylosus* for oxygen. This competition is accompanied by extensive changes in gene expression suggesting activation of the metabolism, which enables the yeast colonies to escape the stress. Changes in the yeast metabolism are observed in the YL culture compared to the YLS association, since genes involved in the amino acids catabolism were not repressed in the YL association. The ammonium transportation into the yeast cells was activated, with the up-regulation of *MEP1*. In the YLS association the expression of *MEP1* remains steady. This result shows a change in the yeast metabolism which highly depends on the nitrogen source in the medium.

### **CONCLUSION.**

To our knowledge, this is the first time that interactions of three microorganisms in associations were studied, using a combination of transcriptomic methods in a model cheese ecosystem. Our results showed that the ubiquitous yeast *Y. lipolytica* 1E07 has the ability to adapt its metabolism to different conditions of nutrient and oxygen availability depending on the microbial interaction. This study underlines the induction of an oxidative stress response in yeast in the presence of *S. xylosus*, and a modification of mitochondrial function as well as a repression of gene expression involved in the respiratory chain. Studying microbial interaction in cheese ecosystem is essential since the performance of a microorganism is largely determined by interactions at the level of substrates, the exchange of metabolites and

growth factors or inhibiting compounds. The increasing number of available full genome sequences of cheese-related microorganisms opens up new avenues to study microbial interaction. The improvement of RNA extraction in a higher fatty acid cheese matrix remains a methodological challenge to study “in situ” microbial interaction.

1. **Abbott, D. A., E. Suir, G.-H. Duong, E. de Hulster, J. T. Pronk, and A. J. A. van Maris.** 2009. Catalase Overexpression Reduces Lactic Acid-Induced Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:2320-2325.
2. **Ali, M. A., and T. Konishi.** 1998. Enhancement of hydroxyl radical generation in the Fenton reaction by alpha-hydroxy acid. *Biochemistry and Molecular Biology International* **46**:137-145.
3. **Ali, M. A., F. Yasui, S. Matsugo, and T. Konishi.** 2000. The lactate-dependent enhancement of hydroxyl radical generation by the Fenton reaction. *Free Radical Research* **32**:429-438.
4. **Amaral, P. F. F., A. P. R. de Almeida, T. Peixoto, M. A. Z. Coelho, J. A. P. Coutinho, and M. H. M. Rocha-Leão.** 2006. Beneficial effects of enhanced aeration using perfluorodecalin in *Yarrowia lipolytica* cultures for lipase production *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **23**:339-344.
5. **Belazzi, T., A. Wagner, R. Wieser, M. Schanz, G. Adam, A. Hartig, and H. Ruis.** 1991. Negative regulation of transcription of the *Saccharomyces cerevisiae* catalase T (CTT1) gene by cAMP is mediated by a positive control element. *EMBO Journal* **10**:585-592.
6. **Beresford, T. P., N. A. Fitzsimons, N. L. Brennan, and T. M. Cogan.** 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* **11**:259-274.
7. **Biriukova, E. N., A. G. Medentsev, A. Arinbasarova, and V. K. Akimenko.** 2006. Tolerance of the yeast *Yarrowia lipolytica* to oxidative stress. *Mikrobiologiya* **75**:293-298.
8. **Blanchin-Roland, S., G. D. Costa, and C. Gaillardin.** 2005. ESCRT-I components of the endocytic machinery are required for Rim101-dependent ambient pH regulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology* **151**:3627-3637.
9. **Bonaldi, C., F. Irlinger, H. E. Spinnler, and E. Engel.** 2005. An iterative sensory procedure to select odor-active associations in complex consortia of microorganisms: application to the construction of a cheese model. *Journal of Dairy Science* **88**:1671-1684.
10. **Casaregola, S., C. Neugeglise, A. Lepingle, E. Bon, C. Feynerol, F. Artiguenave, P. Wincker, and C. Gaillardin.** 2000. Genomic Exploration of the Hemiascomycetous Yeasts: 17. *Yarrowia lipolytica*. *FEBS Letters* **487**:95-100.
11. **Cholet, O., A. Henaut, S. Casaregola, and P. Bonnarme.** 2007. Gene Expression and Biochemical Analysis of Cheese-Ripening Yeasts: Focus on Catabolism of L-Methionine, Lactate, and Lactose. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:2561-2570.
12. **Cobon, G. S., and J. M. Haslam.** 1973. The effect of altered membrane sterol composition on the temperature dependence of yeast mitochondrial ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **52**:320-326.
13. **Corzo, G., and S. Revah.** 1999. Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. *Bioresource Technology* **70**:173-180.

14. **Daum, G., N. D. Lees, M. Bard, and R. Dickson.** 1998. Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**:1471-1510.
15. **Dujon, B., D. Sherman, G. Fischer, P. Durrens, S. Casaregola, I. Lafontaine, J. de Montigny, C. Marck, C. Neuveglise, E. Talla, N. Goffard, L. Frangeul, M. Aigle, V. Anthouard, A. Babour, V. Barbe, S. Barnay, S. Blanchin, J.-M. Beckerich, E. Beyne, C. Bleykasten, A. Boisrame, J. Boyer, L. Cattolico, F. Confanioleri, A. de Daruvar, L. Despons, E. Fabre, C. Fairhead, H. Ferry-Dumazet, A. Groppi, F. Hantraye, C. Hennequin, N. Jauniaux, P. Joyet, R. Kachouri, A. Kerrest, R. Koszul, M. Lemaire, I. Lesur, L. Ma, H. Muller, J.-M. Nicaud, M. Nikolski, S. Oztas, O. Ozier-Kalogeropoulos, S. Pellenz, S. Potier, G.-F. Richard, M.-L. Straub, A. Suleau, D. Swennen, F. Tekaiia, M. Wesolowski-Louvel, E. Westhof, B. Wirth, M. Zeniou-Meyer, I. Zivanovic, M. Bolotin-Fukuhara, A. Thierry, C. Bouchier, B. Caudron, C. Scarpelli, C. Gaillardin, J. Weissenbach, P. Wincker, and J.-L. Souciet.** 2004. Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**:35-44.
16. **Epstein, C. B., and R. A. Butow.** 2000. Microarray technology -- enhanced versatility, persistent challenge. *Current Opinion in Biotechnology* **11**:36-41.
17. **França, M. B., A. D. Panek, and E. C. Eleutherio.** 2005. The role of cytoplasmic catalase in dehydration tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Stress and Chaperones* **10**:167-170.
18. **Galaup, P., A. Gautier, Y. Piriou, A. de Villeblanche, A. Valla, and L. Dufossé.** 2007. First pigment fingerprints from the rind of French PDO red-smear ripened soft cheeses Epoisses, Mont d'Or and Maroilles. *Innovat. Food. Sci. Emerg. Tech.* **8**:373-378.
19. **Galaup, P., C. Flamin, E. Carlet, and L. Dufosse.** 2005. HPLC analysis of the pigments produced by the microfora isolated from the 'Protected Designation of Origin' French red-smear soft cheeses Munster, Epoisses, Reblochon and Livarot. *Food Research International* **38**:855-860.
20. **Götz, F., J. Zabielski, L. Philipson, and M. Lindberg.** 1983. DNA homology between the arsenate resistance plasmid pSX267 from *Staphylococcus xylosus* and the penicillinase plasmid pI258 from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* **9**:126-137.
21. **Grunau, J. A., and J. M. Swiader.** 1992. Chromatography of 99 amino acids and other ninhydrin-reactive compounds in the Pickering lithium gradient system. *J. Chromato A.* **594**:165-171.
22. **Hannon, J. A., S. M. Deutsch, M. N. Madec, J. Y. Gassi, M. P. Chapot-Chartier, and S. Lortal.** 2006. Lysis of starters in UF cheeses: Behaviour of mesophilic lactococci and thermophilic lactobacilli. *International Dairy Journal* **16**:324-334.
23. **Imlay, J. A.** 2003. Pathways of oxidative damage *Annual Review of Microbiology* **57**:395-418.
24. **Kamzolova, S. V., N. V. Shishkanova, I. G. Morgunov, and T. V. Finogenova.** 2003. Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research* **3**:217-222.
25. **Kar, T., F. Delvigne, M. Masson, J. Destain, and P. Thonart.** 2008. Investigation of the effect of different extracellular factors on the lipase production by *Yarrowia lipolytica* on the basis of a scale-down approach. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **35**:1053-1059.
26. **Leclercq-Perlat, M.-N., A. Oumer, J.-L. Bergere, H.-E. Spinnler, and G. Corrieu.** 1999. Growth of *Debaryomyces hansenii* on a bacterial surface-ripened soft cheese. *Journal of Dairy Research* **66**:271-281.
27. **Lenaz, G.** 1998. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1366**:53-67.

28. **Lennon, G. G.** 2000. High-throughput gene expression analysis for drug discovery. *Drug Discovery Today* **5**:59-66.
29. **Lodi, T., A. Alberti, B. Guiard, and I. Ferrero.** 1999 Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* DLD1 gene encoding the mitochondrial protein D-lactate ferricytochrome c oxidoreductase by HAP1 and HAP2/3/4/5. *Mol Gen Genet.* **262**:623-632.
30. **Lodi, T., and I. Ferrero.** 1993. Isolation of the DLD gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding the mitochondrial enzyme D-lactate ferricytochrome c oxidoreductase. *Molecular and General Genetics* **238**:315-324.
31. **Lodi, T., F. Fontanesi, and B. Guiard.** 2002. Co-ordinate regulation of lactate metabolism genes in yeast: the role of the lactate permease gene JEN1. *Molecular Genetics and Genomics* **Volume 266**:838-847.
32. **Lodi, T., and B. Guiard.** 1991. Complex transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* CYB2 gene encoding cytochrome b2: CYP1(HAP1) activator binds to the CYB2 upstream activation site UAS1-B2. *Mol. Cell. Biol.* **11**:3762-3772.
33. **Maligoy, M., M. Mercade, M. Coccagn-Bousquet, and P. Loubiere.** 2008. Transcriptome analysis of *Lactococcus lactis* in coculture with *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **74**:485-494.
34. **Monnet, C., K. Correia, A.-S. Sarthou, and F. Irlinger.** 2006. Quantitative detection of *Corynebacterium casei* in cheese by Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:6972-6979.
35. **Monnet, C., V. Ulve, A.-S. Sarthou, and F. Irlinger.** 2008. Extraction of RNA from cheese without prior separation of microbial cells. *Applied and Environmental Microbiology* **74**:5724-5730.
36. **Mounier, J., C. Monnet, N. Jacques, A. Antoinette, and F. Irlinger.** 2009. Assessment of the microbial diversity at the surface of Livarot cheese using culture-dependent and independent approaches. *Journal of Food Microbiology*, In press.
37. **Palmer, C., E. M. Bik, M. B. Eisen, P. B. Eckburg, T. R. Sana, P. K. Wolber, D. A. Relman, and P. O. Brown.** 2006. Rapid quantitative profiling of complex microbial populations. *Nucl. Acids Res.* **34**:e5-.
38. **Pfaffl, M. W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.* **29**:e45-.
39. **Pfaffl, M. W.** 2004. Quantification strategies in real-time PCR, La Jolla, CA.
40. **Poza, M., A. B. F. Sestelo, J. M. Ageitos, J. A. Vallejo, P. Veiga-Crespo, and T. G. Villa.** 2007. Cloning and Expression of the XPR2 Gene from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**:3944-3948.
41. **Raynaud, S., R. Perrin, M. Coccagn-Bousquet, and P. Loubiere.** 2005. Metabolic and Transcriptomic Adaptation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Biovar diacetylactis in Response to Autoacidification and Temperature Downshift in Skim Milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:8016-8023.
42. **Sessitsch, A., E. Hackl, P. Wenzl, A. Kilian, T. Kostic, N. Stralis-Pavese, B. T. Sandjong, and L. Bodrossy.** 2006. Diagnostic microbial microarrays in soil ecology. *New Phytol* **171**:719-35.
43. **Smith, S. J., and L. W. Parks.** 1997. Requirement of heme to replace the sparking sterol function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1345**:71-76.
44. **Yvon, M., and L. Rijnen.** 2001. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal* **11**:185-201.

45. **Zhou, J.** 2003. Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. *Current Opinion in Microbiology* **6**:288-294.
46. **Zinser, E., F. Paltauf, and G. Daum.** 1993. Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism. *J. Bacteriol.* **175**:2853-2858.

FIG. 1. Kinetics of *Y. lipolytica* 1E07 in pure culture (A) or in association with *L. lactis* LD61 (B), or with *L. lactis* LD61 and *S. xylosus* C2a (C) on a ultrafiltration cheese. pH measurements in the 3 cultures conditions were also represented. Y: *Y. lipolytica* 1E07; S: *S. xylosus* C2a; L: *L. lactis* LD61; YL: *Y. lipolytica* 1E07 + *L. lactis* LD61; YLS: *Y. lipolytica* 1E07 + *L. lactis* LD61 + *S. xylosus* C2a.

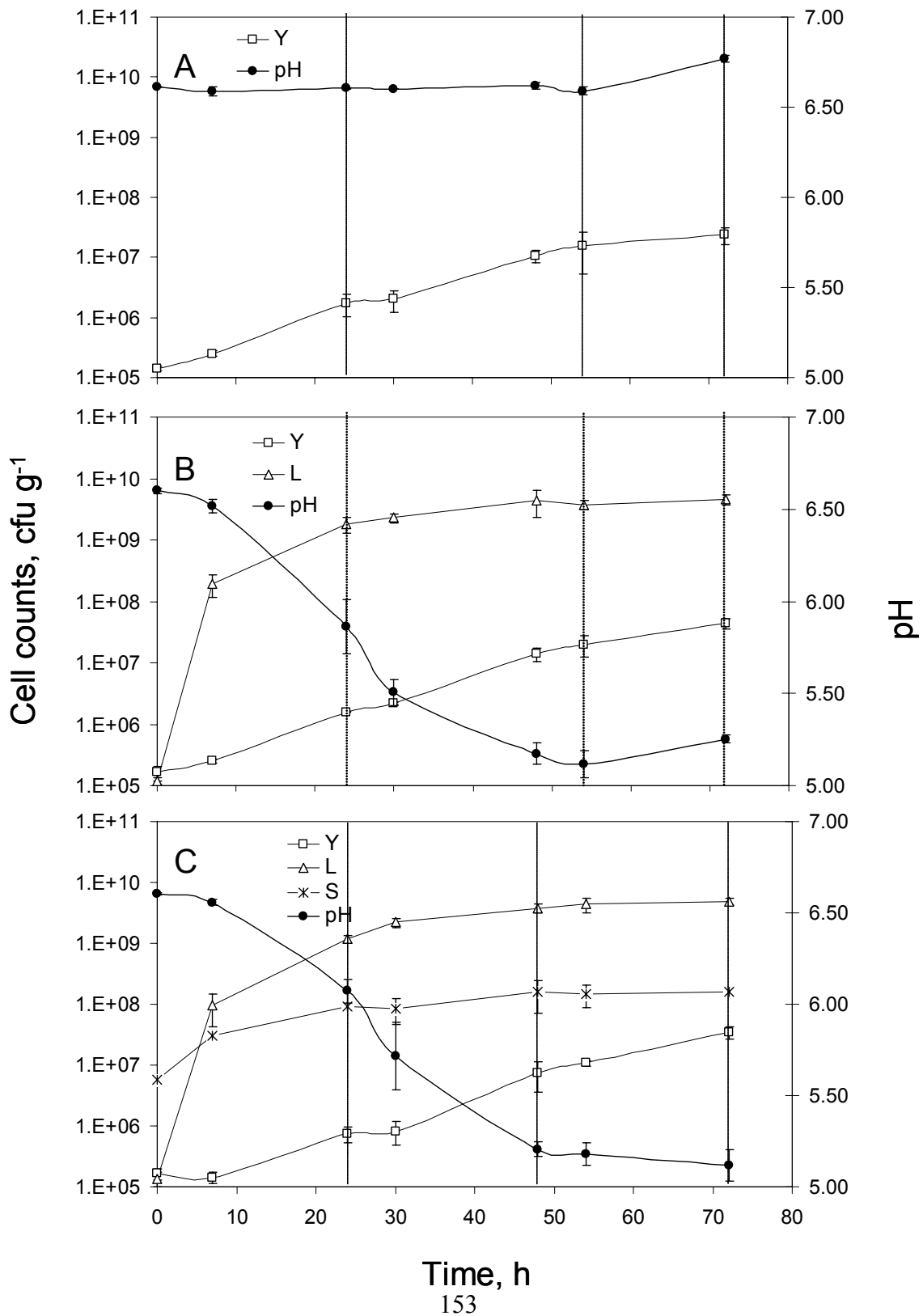




FIG. 2. Lactose and lactate measured in the supernatant of the microorganism associations at 48 h of culture in a model cheese. B: Blank; Y: *Y. lipolytica* 1E07; S: *S. xylosum* C2a; L: *L. lactis* LD61; YL: *Y. lipolytica* 1E07 + *L. lactis* LD61; YLS: *Y. lipolytica* 1E07 + *L. Lactis* LD61 + *S. xylosum* C2a.

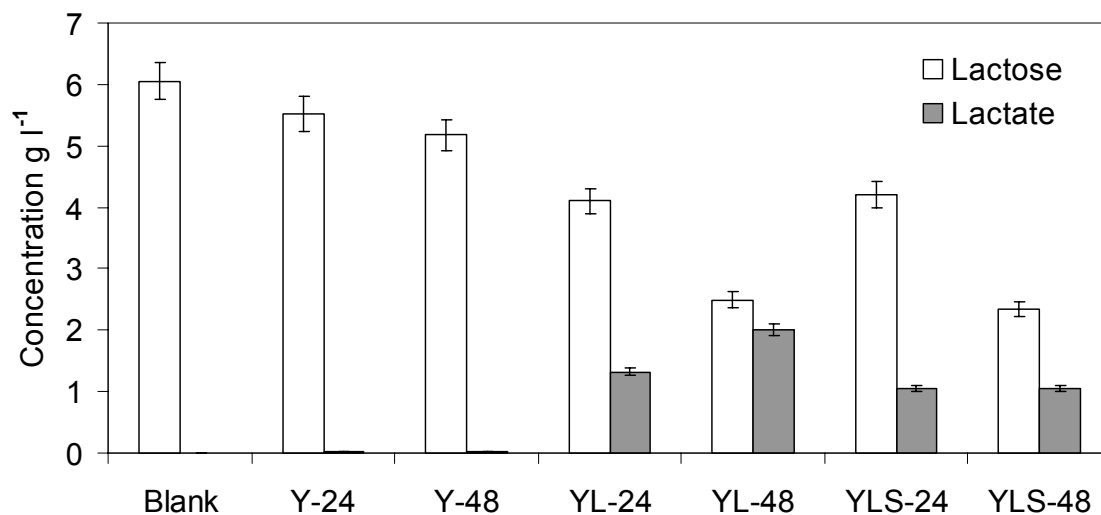


FIG. 3. Amino acids measured in the supernatant of the microorganisms associations at 48 h of culture on ultrafiltration cheese. Y: *Y. lipolytica* 1E07; YL: *Y. lipolytica* 1E07 + *L. lactis* LD61; YLS: *Y. lipolytica* 1E07 + *L. Lactis* LD61 + *S. xylosum* C2a.

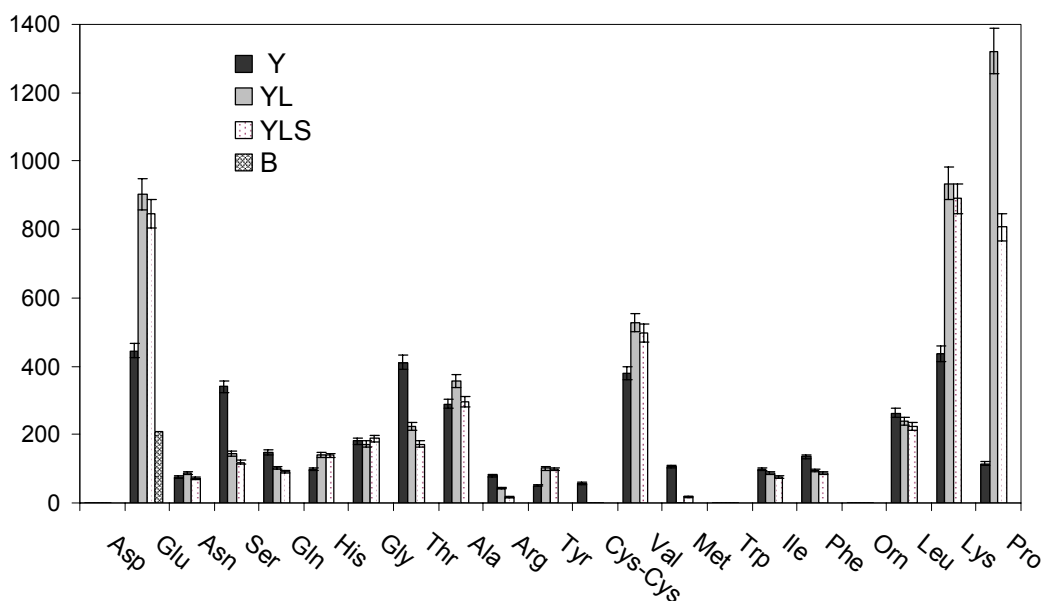


FIG. 4. Venn diagram showing intersections between sets of genes differentially expressed in mixed culture compared with pure culture of *Y. lipolytica* 1E07.

A: Differentially expressed genes in *Y. lipolytica* 1E07 + *L. lactis* LD61 association compared to the pure culture (102 genes expression varied: 42 up regulated, 45 down regulated, 17 unknown). B: Differentially expressed genes in *Y. lipolytica* 1E07 + *L. lactis* LD61 + *S. xylosus* C2a association compared to the pure culture (216 genes expression varied: 72 up regulated, 79 down regulated, 66 unknown). C: Similarly expressed genes in the 2 associations compared with *Y. lipolytica* 1E07 pure culture (54 genes expression varied: 22 up regulated, 15 down regulated, 17 unknown).

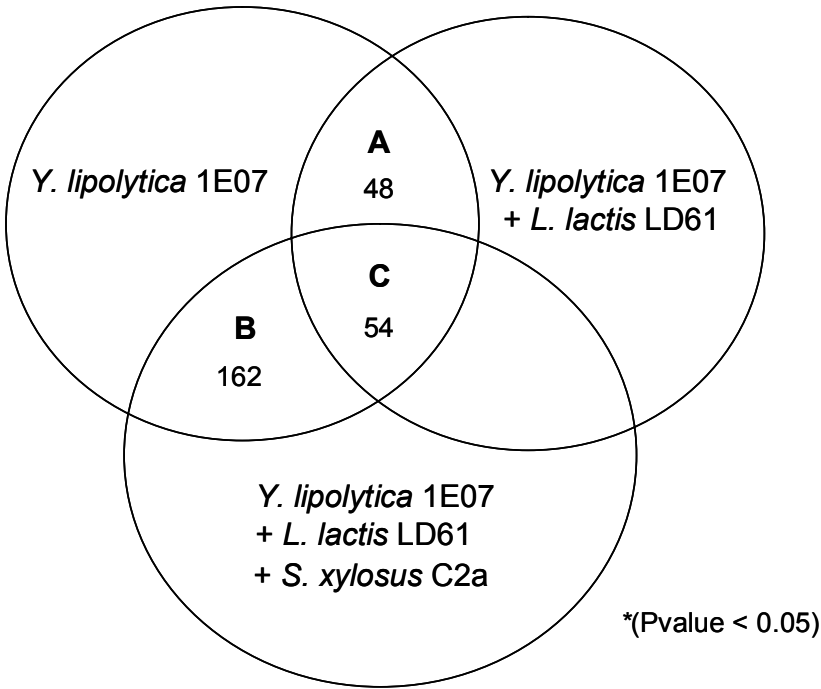


TABLE 1: Primers used for the transcriptomic study of *Y. lipolytica* genes

Primer	Accession no. <sup>a</sup>	Sequence (5'-3')	Putative function <sup>b</sup>
GAP1-R	YAL10B16522g	CGACCACAGCAATGACTTTAATA	Amino acid transporter
GAP1-F		AACTACTGGAATGAAGCTAACG	
BAT1-R	YAL10D01265g	GTTGGCTCCCAGCTTCTTGT	Branched-chain amino acid aminotransferase
BAT1-F		CTCTCGGCGTCGGAACC	
BAT2-R	YAL10F19910g	TCCAACGGCCTTGAGTTCT	Branched-chain amino acid aminotransferase
BAT2-F		CCTCAAGCTCTACTGCTCCGA	
LIP2-R	YAL10F27357g	TATAATTAACGTCCAGGTAGCTTGC	Lipase
LIP2-F		GAATCTGTCTCAATGTCAACAACAA	
XPR2-R	None	CCCTCATTATCTTGGTGAATAC	Protease
XPR2-F		TGATGAACCGACTTTGAGAGAC	
DLD1-R	YAL10E03212g	AAACGTATTCTCACCGATAG	Lactate oxidoreductase
DLD1-F		TGGCCCTTAAGAAGGAAGAT	
CYB2-2-R	YAL10E21307g	TGCATCCACTGAGTCTGTTT	Lactate dehydrogenase
CYB2-2-F		TACATCACCGCTACAGCTCTA	
CTT1-R	YAL10E34749g	AATGGAGTACCGGAACCTT	Cytosolic catalase T
CTT1-F		AACTGTCTGCCGAGAA	
ERG8-R	YAL10E06193g	CCATACCTGGAGTCTCAGAT	Phosphomevalonate kinase
ERG8-F		TCCGTGAACATGGTCATTG	
MEP1-R	YAL10F16896g	CAGAGCCTCCGTTGAATC	Ammonium permease
MEP1-F		TGGAAATTGCATCTGGTATCG	
PDR16-R	YAL10A08448g	CGTTTCTGAGGGCCAAG	Phosphatidylinositol transfer protein
PDR16-F		CGCAGAAGAGACTGTATC	
SOD2-R	YAL10C16621g	CCACTGTTTCTCGGCAA	Superoxide dismutase
SOD2-F		AACCAGGACGCTATTTCCG	
DUR3-R	YAL10E28622g	TGACCAGCCAGGTGATAA	Plasma membrane transporter
DUR3-F		TTGCCATTGGACTCTACT	
COX5A-R	YAL10F26675g	TCGTTTGGGAATGTTCAAAGT	Subunit Va of cytochrome c oxidase
COX5A-F		TTTCTGCACGTCTCAGC	
OAC1-R	YAL10E04048g	TTGTAGTAGGTCTGCGCT	Mitochondrial inner membrane transporter
OAC1-F		TGATCTGAACAAAGAGAACCC	
ATP1-R	YAL10F03179g	CGATACCATCACCAACGG	Alpha subunit of the F1 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase
ATP1-F		ATGTTTAAGAACGCTTTCGTC	
GHD2-R	YAL10E09603g	CTTGAGGAGCAAATCAATGACC	Glutamate dehydrogenase
GDH2-F		TCCATGTTTCGACGAGAACTAC	
PTR2-R	YAL10D19558g	GAGTTCCAATGTAGAACTTGGTGTT	OligoPeptide Permease
PTR2-F		AACCTGATTCTGTTTGTCACTTCTC	
NPR1-R	YAL10B00880g	CGAAATCAATCAGCTTGAGAATAC	Protein kinase
NPR1-F		GCCATAGTCATGTCGGG	
LYS5-R	YAL10E09306g	TCGCTGTGGTGACTGAT	Phosphopantetheinyl transferase
LYS5-F		AGAAGCGATGCCAAGAT	
CEM1-R	YAL10F30679g	TAACCACACACTTCAGCG	Mitochondrial beta-keto-acyl synthase
CEM1-F		GCTACCAAGTGAACGAC	
OLE1-R	YAL10C05951g	CAGAAATGTCAGTTCCGGC	Stearoyl-CoA desaturase
OLE1-F		TTTGGAGGAGGAGCTGT	
CIT1-R	YAL10E02684g	AGCAGAGAGGCGAAGTTA	Citrate synthase
CIT1-F		TACTGGCAGTACACCTACG	
Act21r	YAL10D08272g*	GGCCAGCCATATCGAGTCGCA	Gene encoding Actin
Act20		TCCAGGCCGCTCTCTCCC	

<sup>a</sup> Accession numbers of sequences were obtained from Génolevures (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/>)

<sup>b</sup> Annotations are from the Saccharomyces Genome Database (SGD) (<http://www.yeastgenome.org/>)

\*Blanchin-Roland *et al.*, 2005.

TABLE 2: Differentially expressed genes of *Y. lipolytica* 1E07 in association with *L. lactis* LD61 compared to *Y. lipolytica* 1E07 pure culture. RT qPCR analyses were done on selected genes. Functional categories were assigned based on MIPS annotation (<http://mips.gsf.de/proj/yeast/CYGD/db/>).

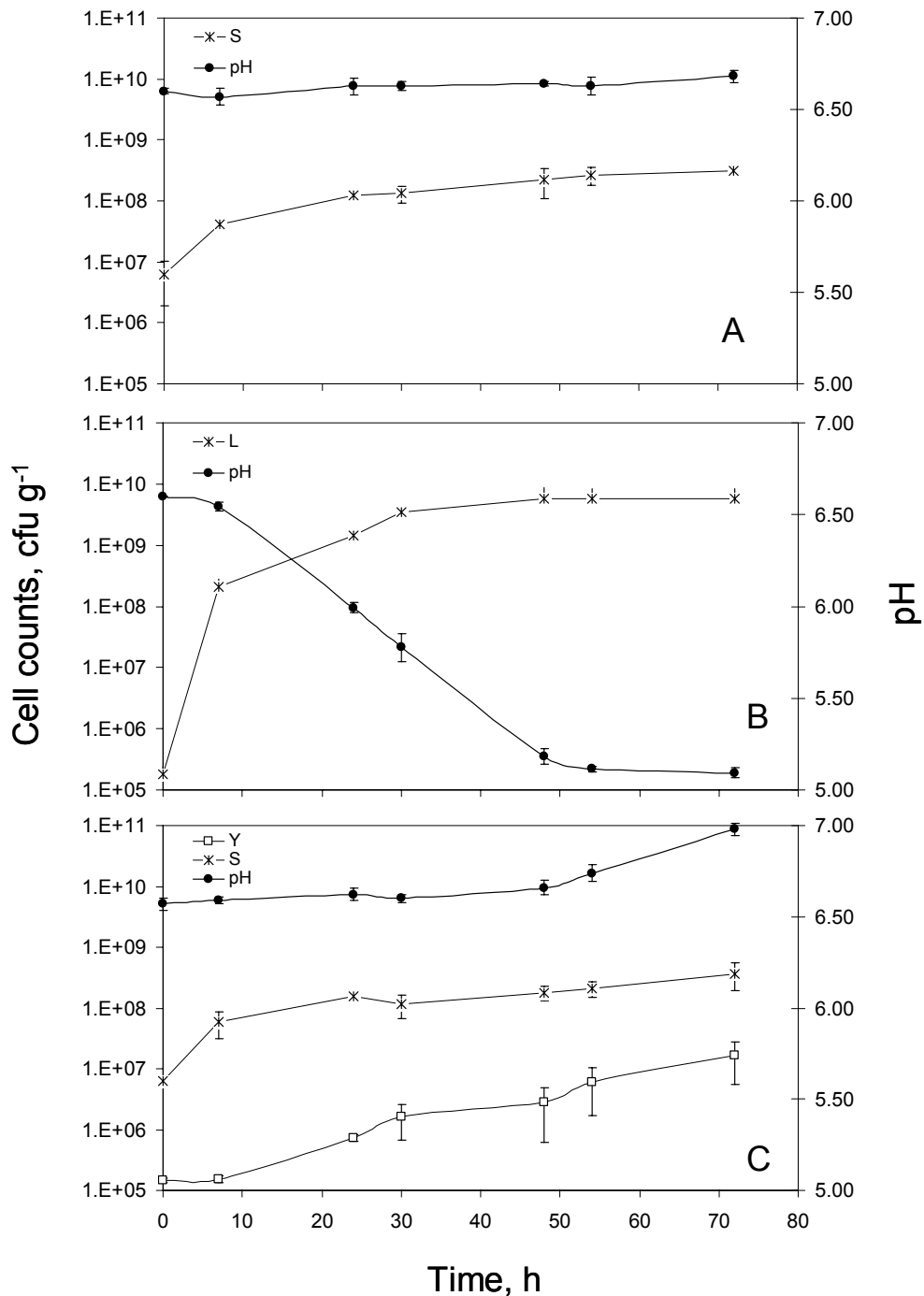
Up-regulated gene			Down-regulated gene		
	Microarray	RT qPCR		Microarray	RT qPCR
<b>Respiratory pathway</b>					
OAC1	nd	2.41 ± 0.36	ATP1	2.89E-02	
ATP23	2.32E+01		COX5A	nd	1.12 ± 0.22
OYE3	1.23E+01				
<b>Cellular cycle control</b>					
RRD2	4.53E+03				
CLB3	6.94E+02				
MAD3	6.47E+01				
SAT4	2.20E+01				
MAD1	2.16E+01				
<b>Oxidative stress</b>					
CTT1	nd	2.92 ± 0.13			
SOD2	nd	1.24 ± 0.11			
CIT1	nd	0.004 ± 0.25			
<b>Ribosomic proteins</b>					
SEN2	3.62E+01		DEG1	2.57E-02	
			MRI1	4.29E-03	
			MTO1	2.70E-05	
<b>Transcription/ Traduction</b>					
RPC40	8.56E+01		YPS3	3.55E-02	
CPR2	1.80E+01		GAA1	3.90E-02	
			CYM1	9.67E-03	
<b>Transport and inorganique ion metabolism</b>					
			HMX1	1.52E-02	
<b>Cellular trafic</b>					
SEC23	5.67E+02		RET3	5.39E-03	
SEC1	3.50E+01				
<b>Transport and amino acids metabolism</b>					
BAT2	nd	1.20 ± 0.11	NPR1	nd	0.004 ± 0.35
GAP1	nd	3.47 ± 0.38	GDH2	nd	0.97 ± 0.4
LYS5	nd				
BAT1	nd	3.61 ± 0.38			
<b>Ammonia metabolism</b>					
DUR3	1.44E+01	1.18 ± 0.27			
MEP1	nd	1.77 ± 0.27			
<b>Transport and nucleotide metabolism</b>					
			MEU1	1.30E-02	
<b>Transport and lipid metabolism</b>					
CYM1	6.13E+05		NMT1	1.55E-02	
ERG8	6.64E+01	1.69 ± 0.06			
OLE1	nd	1 ± 0.22			
LIP2	nd	1.31 ± 0.16			
PDR16	nd				
<b>Lactate metabolism</b>					
CYB2	nd	5.91 ± 0.18			
DLD1	nd	6.69 ± 0.17			
<b>Protein metabolism</b>					
PTR2	nd	1.27 ± 0.10	XPR2	nd	0.79 ± 0.14
<b>General function</b>					
YIM1	2.39E+06				

TABLE 3: Differentially expressed genes of *Y. lipolytica* 1E07 in association with *L. lactis* LD61 and *S. xylosum* C2a compared to *Y. lipolytica* 1E07 pure culture. RT qPCR analyses were done on selected genes. Functional categories were assigned based on MIPS annotation (<http://mips.gsf.de/proj/yeast/CYGD/db/>).

Up-regulated gene			Down-regulated gene		
	Microarray	RT qPCR		Microarray	RT qPCR
<b>Respiratory pathway</b>					
OAC1	5.78E+03	1.66 ± 0.47	CUP5	6.14E-02	0.95 ± 0.47
MSC7	1.77E+02		ATP1	4.95E-02	
CRP2	9.87E+01		COX5A	3.92E-02	
CTP1	9.84E+01		YICPR1	1.39E-02	
OYE3	4.06E+01				
<b>Cellular cycle control</b>					
MAD3	2.55E+02				
CLB3	1.09E+03				
RRD2	2.26E+04				
<b>Oxidative stress</b>					
CTT1	nd	1.223 ± 0.23			
SOD2	nd	1.610 ± 0.2			
CIT1	nd	nd			
<b>Ribosomic proteins</b>					
SEN2	1.90E+02		FRS2	1.89E-02	
			RSM18	1.79E-02	
			DEG1	2.76E-03	
			MTO1	7.80E-06	
<b>RNA modification</b>					
PRP24	2.74E+02		SKI2	4.83E-02	
CFT1	5.46E+01				
<b>Transcription/ Traduction</b>					
PTC2	3.78E+02		RPC34	2.70E-02	
CYR1	1.55E+02		POL3	7.26E-02	
MED6	5.85E+01		RAD16	1.42E-02	
SMB1	4.33E+01		RAD3	5.49E-04	
CBF1	8.44E+00		YPS3	4.26E-02	
UBC6	4.88E+01		UBC8	2.45E-02	
YKE2	3.17E+01		VHS1	4.40E-02	
PNG1	2.03E+01		BRE5	4.89E-05	
VPS64	6.75E+01		SSL2	4.06E-04	
<b>Transport and inorganique ion metabolism</b>					
GOT1	2.77E+02				
CCH1	8.27E+01				
MEP1	2.33E+01				
<b>Cellular trafic</b>					
NMD5	2.30E+03		SRP14	7.16E-02	
NUP116	5.49E+02		SEC12	5.53E-02	
SEC23	2.43E+02		RET3	5.17E-03	
SRP102	1.18E+02				
VPS21	2.81E+01				
<b>Transport and amino acids metabolism</b>					
BAT2	nd	1.48 ± 0.21	LYS5	2.21E-02	
GAP1	nd	2.31 ± 0.20	BAT1	1.07E-02	1.77 ± 0.52
GDH2	nd	1.63 ± 0.04	BNA1	6.14E-03	
			NPR1	5.86E-06	1 ± 0.17
<b>Ammonia metabolism</b>					
MEP1	nd	2.03 ± 0.11	DUR3	2.63E-02	1.31 ± 0.27
<b>Transport and nucleotide metabolism</b>					
DCD1	3.52E+01		SAL1	3.51E-03	
			URA6	3.08E-03	
<b>Transport and lipid metabolism</b>					
CEM1	8.71E+03	1 ± 0.1	PDR16	5.83E-02	
ERG8	1.52E+03		NMT1	3.87E-02	
MUQ1	2.04E+01		ALK5	7.64E-04	
OLE1	nd	1 ± 0.22			
LIP2	nd	1.50 ± 0.25			
<b>Lactate metabolism</b>					
CYB2	nd	4.76 ± 0.01			
DLD1	nd	6.80 ± 0.21			
<b>Protein metabolism</b>					
PTR2	nd	1.14 ± 0.08	XPR2	nd	0.69 ± 0.12
<b>General function</b>					
SWR1	3.04E+03		PAG1	2.55E-02	
YAR1	4.38E+01		CYM1	7.81E-03	
NHP10	1.86E+01		DOM34	3.77E-03	

**SUPPLEMENTAL DATA.**

S1: Kinetics and pH measurements of *S. xylosum* C2a (A), *L. lactis* LD61 (B) pure cultures; *Y. lipolytica* 1E07 and *S. xylosum* C2a in association (C) on ultrafiltration cheese. L : *L. lactis* LD61 S : *S. xylosum* C2a; Y: *Y. lipolytica* 1E07; YS: *Y. lipolytica* 1E07 + *S. xylosum* C2a.



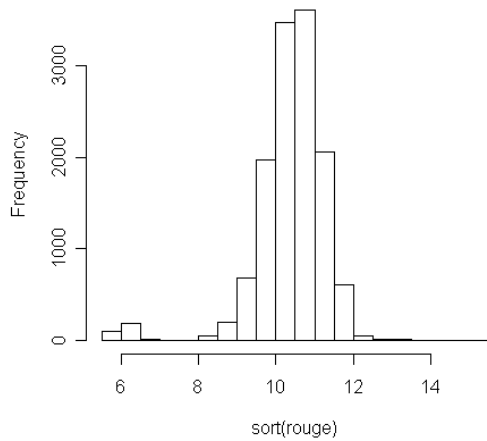
S2 A: Hybridization of *Y. lipolytica* 1E07 and *L. lactis* LD61 DNA respectively labelled with Cy5 and Cy3. Ninety-eight percent of *Y. lipolytica* 1E07 DNA hybridized on *Y. lipolytica* E150 microarray, why only 4 % of *L. lactis* LD61 DNA hybridized on the microarray.

**S 2**

**A**

***Y. lipolytica* 1E07**

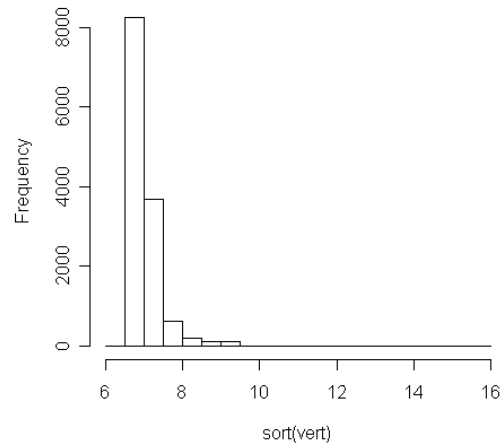
Histogram of sort(rouge)



**303 spots / 2.3 %**

***L. lactis* LD 61**

Histogram of sort(vert)



**12554 spots / 96.4 %**  
**3.6 % of cross-hybridation**

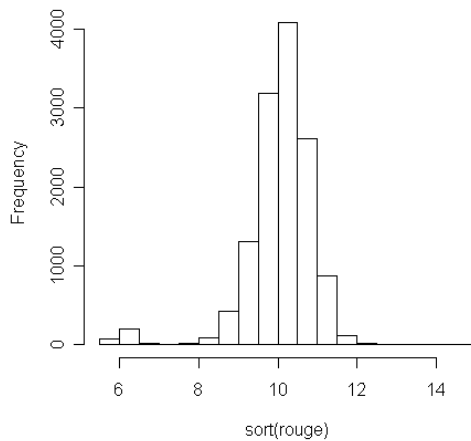
S2 B: Hybridization of *Y. lipolytica* 1E07 and *S. xylosus* C2a DNA respectively labelled with Cy5 and Cy3. Ninety-eight percent of *Y. lipolytica* 1E07 DNA hybridized on *Y. lipolytica* E150 microarray, why only 1 % of *S. xylosus* C2a DNA hybridized on the microarray.

**S 2**

**B**

***Y. lipolytica* 1E07**

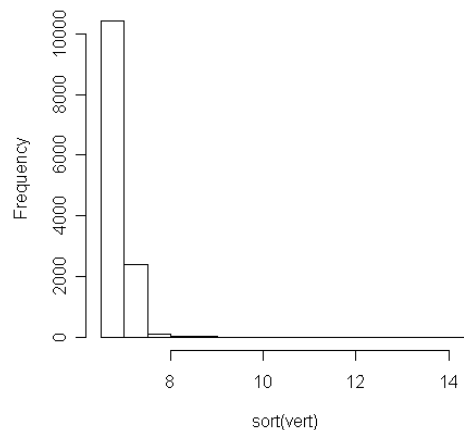
Histogram of sort(rouge)



**305 spots / 2.3 %**

***S. xylosus* C2a**

Histogram of sort(vert)



**12920 spots / 99 %**  
**1 % of cross-hybridation**

### II. 3. 3. Bilan de l'étude de *Yarrowia lipolytica* en co-culture

Afin de comprendre le métabolisme adaptatif de la levure *Y. lipolytica* en présence d'autres micro-organismes, un écosystème réduit composé de la levure *Y. lipolytica* 1E07, de *S. xylosus* et de *L. lactis* a été choisi. Cette étude s'est déroulée dans le cadre du projet ANR Géoferment dont le but était d'étudier le métabolisme de ces 3 micro-organismes en association grâce notamment à l'étude transcriptomique. Ce projet a été réalisé en collaboration avec différents partenaires détenant les génomes séquencés de *L. lactis* et de *S. xylosus* : i) l'UMR 5504, UMR 792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, CNRS, INRA, INSA, 31400, de Toulouse, d'où l'utilisation de la souche *L. lactis* LD61 et ii) l'INRA, centre de Clermont-Ferrand Theix, unité microbiologique, qualité et sécurité des aliments, F-63122, Saint-Genès Champenelle d'où l'utilisation de la souche *S. xylosus* C2a. L'objectif premier du projet étant de comparer le profil d'expression des gènes de chaque micro-organisme d'intérêt en mono-culture et en co-culture par puce à ADN, il a été indispensable de retenir un milieu de culture identique par chaque partenaire. Dans un premier temps le milieu liquide chimiquement défini a été sélectionné (Fiche technique n°2), en utilisant le glucose comme source principale de carbone. L'utilisation de ce milieu a permis de s'affranchir des complications dues à l'extraction d'ARN à partir de fromage. Dans un second temps, un milieu modèle fromager, le rétentat, a été utilisé (Fiche technique n°9).

Concernant l'étude de l'expression des gènes de *Y. lipolytica* en co-culture, les problèmes de mise au point de marquage de l'ARN ainsi que son hybridation sur les puces à ADN a constitué un réel frein à l'utilisation de l'approche globale. En effet, l'ARN extrait de la co-culture (Fiche technique n°6) contient dans des proportions différentes les ARN de chaque micro-organisme. L'ARN des procaryotes étant plus facilement extrait que celui des eucaryotes, on a supposé que les ARN des 2 bactéries ont été plus abondants. Les premiers résultats de marquage des ARN à l'aide du kit *CyScribe™ First strand cDNA Labelling* (Amersham Biosciences), où des amorces aléatoires ont été utilisées, a montré un très faible rendement de marquages. De plus, la qualité des puces à ADN n'ayant toujours pas été réglé, l'approche ciblé par RT-PCR quantitative a été retenue. Au vu des résultats biochimiques et microbiologiques, il nous a semblé judicieux de sélectionner des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose, du lactate et des acides aminés pour les trois micro-organismes. Toutes les amorces sélectionnées ont été validées comme étant spécifiques de chaque micro-



organisme. Cette étude a permis de mettre en évidence un changement métabolique de la levure en fonction de l'association et des substrats disponibles.

Dans le but de se rapprocher au mieux de l'écosystème fromager, l'étude de *Y. lipolytica* en association a été réalisée sur la matrice rétentat. De leur côté, les deux autres partenaires devaient réaliser les études du transcriptome du côté de *L. lactis* et de *S. xylosum* mais cela n'a pas été possible pour des raisons techniques. En ce qui nous concerne, l'utilisation de la puce à ADN de la levure a été cette fois, le problème du « spotting » au niveau de la puce ayant été réglé par le fournisseur Eurogentec. De plus, le protocole d'extraction d'ARN à partir de la matrice rétentat avait été mis au point dans le cadre du projet ANR Génofement (Monnet et coll., 2008), ce qui a rendu notre étude possible. L'optimisation du protocole de marquage de l'ARN a, en revanche, été indispensable en i) doublant la quantité de fluorochromes initialement décrite dans le kit de marquage *CyScribe™ First strand cDNA Labelling* (Amersham Biosciences) et en ii) utilisant des amorces aléatoires couplées à des Oligo-dT.

Des vérifications au niveau de la puce ont également été nécessaires. D'une part, il a été essentiel de vérifier la spécificité de la puce à ADN de la levure séquencée *Y. lipolytica* E150 vis à vis de la souche d'intérêt *Y. lipolytica* 1E07. Ce contrôle effectué à l'aide d'ADN génomique des 2 génomes, a mis en évidence une spécificité de 99 % de la puce à ADN au pour *Y. lipolytica* 1E07. D'autre part, le but étant d'étudier l'expression des gènes de la levure en association, le protocole d'hybridation de l'ARN (contenant l'ensemble des ARN des différentes espèces) a été mis au point de sorte à minimiser les cross-hybridations des génomes des 2 bactéries sur la puce à ADN de la levure. Dans ce but, les résultats obtenus à l'aide de la station d'hybridation automatique Ventana Discovery™ System et celle à l'aide du four Agilent (AgilentTechnology®) ont été comparés. Le tampon ainsi que la température d'hybridation varie considérablement selon le type d'hybridation. Il s'est avéré que l'utilisation du protocole d'hybridation Agilent (Fiche technique n°11) à une température de 60°C a permis de réduire jusqu'à 40 fois le pourcentage de cross-hybridation inter-espèces. Les résultats par puce à ADN, qui sont encore à ce jour en cours d'analyse, ont été réalisés en collaboration avec AgroparisTech-INRA UMR 518. Ces résultats ont mis en évidence un changement métabolique important de la levure en fonction de l'association, malgré une croissance stable en co-culture.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les études de la diversité et de la dynamique des flores d'affinage ont permis de mettre l'accent sur la complexité des écosystèmes fromagers. Les phénomènes qui régissent l'affinage sont multiples tels que les paramètres physico-chimiques et microbiologiques. L'adaptation des micro-organismes à leur environnement dépend à la fois de leurs aptitudes à faire face aux paramètres physico-chimiques propres au fromage et à dégrader les substrats présents dans le milieu, tout en étant en interaction (positive ou négative) avec les différentes espèces. La maîtrise de la dynamique des populations reste un enjeu majeur dans le but de maîtriser les étapes de fabrication du fromage. De plus, cette maîtrise permettrait, une fois la flore sélectionnée, de raccourcir le temps d'affinage de manière significative, tout en conservant, voire en améliorant les qualités organoleptiques et sanitaires du fromage. De nombreux travaux ont montré l'incapacité d'adaptation de la flore inoculée, qui se retrouve en compétition avec la flore indigène de l'environnement fromager. De plus, peu de travaux se sont focalisés sur la fonctionnalité des micro-organismes, ceci étant dû à la complexité d'une telle approche multidisciplinaire intégrant à la fois la microbiologie, la biochimie et la biologie moléculaire. Le manque d'outils moléculaires, fait que de nombreux aspects concernant la physiologie propre à chaque micro-organisme restent à élucider. Quelques travaux récents ont permis l'étude fonctionnelle des micro-organismes en association (Cholet et coll., 2007 ; Maligoy et coll., 2008). L'objectif de ce travail était de mieux comprendre la capacité d'adaptation métabolique de levure ubiquitaire du fromage, *Yarrowia lipolytica*, et deux bactéries *Lactococcus lactis* et *Staphylococcus xylosus*. Ces 3 espèces ont leurs génomes séquencés ce qui a d'envisager une étude transcriptomique.

Dans un premier temps, nous avons choisi d'étudier le métabolisme de la levure en mono-culture en se focalisant sur des voies métaboliques clés de l'affinage, le catabolisme du lactate et des acides aminés. Les résultats microbiologiques, biochimiques et transcriptomiques ont mis en évidence une réelle préférence de *Y. lipolytica* pour les acides aminés (induction préférentielle des aminotransférases). En effet, le lactate n'est consommé qu'après l'utilisation de la totalité des acides aminés. Une corrélation entre la consommation d'acides aminés et la production/accumulation d'ammoniac par la levure a été mise en évidence. Cette production d'ammoniac correspond à une alcalinisation du milieu par la levure, le lactate étant peu consommé à forte concentration en acides aminés. La remontée du pH étant une étape essentielle dans la fabrication du fromage pour l'implantation de la flore

d'affinage acido-sensible, la capacité de production d'ammoniac par les micro-organismes pourrait être un nouveau paramètre à prendre en compte pour le choix des flores inoculées. De plus, le rôle de l'ammoniac comme molécule signal, connu sous le nom de « quorum sensing » chez les bactéries, a récemment été montré. L'ammoniac agirait sur la croissance et le développement des colonies de levures et on pourrait transporter ce concept au développement des levures sur substrat fromager (Gori et coll., 2007 ; Palkova et Vachova, 2006). L'arrêt de la croissance de la flore d'affinage en présence de *Y. lipolytica* pourrait être dû à la production d'ammoniac par la levure.

Dans le but de confirmer l'hypothèse d'une préférence de la levure pour les acides aminés, une étude protéomique a été menée, en comparant l'abondance des protéines de la levure dans un milieu dépourvu d'acides aminés (AA<sup>-</sup>) par rapport à un milieu riche (AA<sup>+</sup>). Les résultats ont montré une abondance des protéines impliquées dans le stress oxydatif dans le milieu AA<sup>-</sup>, tandis que dans la condition AA<sup>+</sup>, les protéines impliquées dans le métabolisme carboné et azoté sont plus abondantes. La combinaison des techniques moléculaires, microbiologiques, biochimiques et protéomiques a permis de confirmer que la levure a une réelle préférence pour les acides aminés, l'absence de ces derniers pouvant provoquer un état de stress oxydant chez *Y. lipolytica*.

*Y. lipolytica* s'avère être une levure atypique par sa préférence pour les acides aminés, en comparaison avec d'autres levures d'affinage tels que *Debaryomyces hansenii* et *Kluyveromyces lactis* qui consomment respectivement le lactose et le lactate de manière préférentielle (Cholet et coll., 2007).

Dans un second temps, l'étude de la levure en interaction avec les 2 bactéries a été réalisée. Dans le but de s'affranchir des complications de l'extraction d'ARN dans une matrice solide fromagère contenant de la matière grasse, une première étape a consisté à comprendre les phénomènes d'interactions dans le milieu MCD. Une approche ciblée sur des gènes impliqués dans des voies de dégradation du lactate, du pyruvate, des acides aminés a été réalisée par RT-PCR quantitative. Les résultats soulignent une possible compétition entre *Y. lipolytica* et *S. xylosus* pour les acides aminés. En effet, les gènes impliqués dans le catabolisme des acides aminés sont réprimés chez la levure en présence du staphylocoque. La production du lactate par les deux bactéries provoque l'induction de la lactate déshydrogénase chez la levure. De plus, la possible compétition pour les acides aminés ainsi que l'acidification du milieu sont à l'origine d'un arrêt total de la croissance du staphylocoque en association avec la levure et la bactérie lactique. Ajoutons à cela que la croissance de *Y. lipolytica* est ralentie en présence du staphylocoque. Les fabricants de fromage considèrent la

levure *Y. lipolytica* comme une flore d'altération. En effet, il s'avère qu'une fois inoculé, sa présence empêcherait la croissance d'autres micro-organismes d'affinage (Eric Spinnler, communication personnelle). Dans le but de canaliser sa croissance, il semblerait intéressant de la mettre en association avec des micro-organismes d'affinage qui ralentirait sa croissance. L'étude en culture mixte a permis de mettre en évidence des phénomènes d'interactions entre micro-organismes en termes de croissance, voire de complémentarité métabolique.

Dans le but de reproduire au mieux les conditions fromagères, l'étude de l'association a été réalisée dans un milieu modèle fromager, le rétentat. A notre connaissance c'est la première fois qu'une étude transcriptomique se fait dans une matrice fromagère en présence de 3 micro-organismes. Afin d'obtenir une information complète de l'effet des interactions sur l'expression des gènes de *Y. lipolytica*, une approche globale par puce à ADN a été retenue. Cette approche a nécessité la mise au point d'un protocole permettant une hybridation optimale et spécifique (absence de cross-hybridation avec les 2 bactéries) de *Y. lipolytica* aux oligonucléotides de la puce. Cette étude a mis en évidence un état de stress oxydatif chez la levure en présence de *S. xylosus*, ainsi qu'une modification du fonctionnement mitochondriale et de l'expression des gènes de la chaîne respiratoire.

Le fromage, malgré sa complexité reste un modèle d'étude intéressant, sachant que plus de 90 % des micro-organismes de la flore fromagère sont cultivables (Abriouel et coll., 2008 ; Delbes et Montel, 2005 ; Dolci et coll., 2009 ; Ercolini et coll., 2003 ; Feurer et coll., 2004a ; Mounier et coll., 2005 ; Mounier et coll., 2009). De plus, la mise au point d'un protocole fiable d'extraction d'ARN à partir de la matrice fromagère (Monnet et coll., 2008) ainsi que le séquençage massif des génomes des espèces à propriétés technologiques importantes, permettrait une étude « *in vivo* » des interactions au sein même de la matrice fromagère. La connaissance des mécanismes d'interactions s'avère très intéressante pour la compréhension du pouvoir d'adaptation des micro-organismes dans le fromage. Ceci permettrait une maîtrise des qualités organoleptiques et microbiologique du fromage. L'intérêt technologique de la levure *Y. lipolytica* porte sur sa forte activité protéolytique et lipolytique qui est à l'origine de la production de nombreux précurseurs d'arômes dans le fromage (Suzzi et coll., 2001). La souche de *Y. lipolytica* 1E07 est connue pour sa capacité dans les fromages à pâte molle (Françoise Irlinger, communication personnelle). La régulation de sa croissance (ex : en la mettant en compétition avec d'autres micro-organismes) au sein de l'écosystème fromager pourrait faire l'objet de nouvelles voies d'exploration. L'intérêt de cette levure porte aussi sur son potentiel à produire de l'ammoniac, qui s'avère être une molécule importante dans la

désacidification du caillé, et jouerait un rôle de signalisation entre les levures (Gori et coll., 2007 ; Palkova et coll., 1997 ; Palkova et Vachova, 2003).

## FICHES TECHNIQUES

### Fiche technique n° 1 : Milieux gélosés utilisés

Toutes les quantités sont données pour la préparation d'un litre de milieu.

#### Composition du milieu gélosé BHI (Brain Heart Agar) pour la croissance de *S. xylosus* C2a

Ce milieu, d'un pH final de  $7,4 \pm 0,2$ , est autoclavé 15 minutes à 120°C.

Après refroidissement, ajouter 50 mg/l d'amphotéricine B (Sigma-Aldrich) afin d'empêcher le développement des levures.

<b>Composition</b> (Biokar Dignostics BK 029)	<b>Quantité (g)</b>
Extrait cœur-cervelle	17,5
Peptone pancréatique de gélatine	10,0
Chlorure de sodium	5,0
Phosphate disodique	2,5
Glucose	2,0
Agar-agar bactériologique	15,0

#### Composition du milieu gélosé YEGC (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol) pour la croissance de *Y. lipolytica* 1E07

Ce milieu, d'un pH final de  $6,6 \pm 0,2$ , est autoclavé 15 minutes à 120 °C. Le chloramphénicol inhibe la flore bactérienne.

<b>Composition</b> (Biokar Dignostics BK 0079)	<b>Quantité (g)</b>
Extrait autolytique de levure	5,0
Glucose	20,0
Chloramphénicol	0,1
Agar-agar bactériologique	15,0

### Composition du milieu gélosée M17 pour la croissance de *L. lactis* LD61

Ce milieu a un pH final de  $7,1 \pm 0,2$ . Il est autoclavé 15 min à 120 °C.

Après refroidissement, ajouter 50 mg/l d'amphotéricine B (Sigma-Aldrich) afin d'empêcher le développement des levures.

<b>Composition</b> (Biokar Dignostics BK 012HA)	<b>Quantité (g)</b>
Tryptone	2,5
Peptone pepsique de viande	2,5
Peptone papainique de soja	5
Extrait autolytique de levure	2,5
Extrait de viande	5
Lactose	5
Glycérophosphate de sodium	19
Sulfate de magnésium	0,25
Acide ascorbique	0,5

## Fiche technique n°2 : Milieu Chimiquement défini (MCD)

### Objectif

Utilisation d'un milieu chimiquement défini permet la maîtrise totale de la composition du milieu, ainsi que la concentration des différents composés.

### Méthode

Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau osmosée et les quantités sont données pour la préparation d'un litre de milieu. Il est constitué de 8 solutions et a un pH final  $6,5 \pm 0.3$ .

### Composition du milieu

#### Solution 1 : sucre et sels 1

*Préparation de cette solution à 10X*

Composé	Concentration 1X (g/l)	Référence
lactose*	20	Prolabo 24379.294
Lactate de sodium 60 %*	18	Prolabo 27925.922
Acétate de sodium	1	Sigma S 2889
Citrate d'ammonium	0,6	Aldrich 247561
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<b>9</b>	VWR 104873
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	<b>7,5</b>	VWR 105104

*\*La source de carbone et sa concentration peut varier selon la condition de culture*

#### Solution 2 : sels 2

*Préparer cette solution à 50 X.*

Composé	Concentration 1X (g/l)	Référence
MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,2	Sigma M 0250
FeCl <sub>2</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	0,011	Merck 1038610250
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,050	Prolabo 22317.231
ZnCl <sub>2</sub> ,	0,005	Merck 1088160250
CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,0025	Sigma C8661



### Solution 3 : acides aminés

*Préparer cette solution à 20X*

Composé	Concentration 1X (g/l)	Référence
L-Alanine	0,24	Sigma A5824
L-Arginine	0,12	Sigma A8094
L-Asparagine	0,34	Sigma A4284
L-Glutamine	0,51	Fluka 49420
L-Glycine	0,17	Merk 4201
L-Histidine	0,11	Sigma H8125
L-Isoleucine	0,20	Aldrich cat15-171-8
Leucine	0,47	Aldrich cat 60-2
L-Lysine	0,35	Sigma L5626
L-Méthionine	0,12	Sigma M9625
Proline	0,68	Sigma P0380
L-Sérine	0,34	Sigma S4500
Thréonine	0,23	Sigma T8625
Tryptophane	0,05	Sigma T0254
Valine	0,33	Sigma V0500
Glutamate	0,68	G1251

### Solution 4 : Phénylalanine

*Préparer cette solution à 20X. Ajouter quelques gouttes d'HCl 37% pour dissoudre*

Composé	Concentration 1X (g/l)	Référence
Phénylalanine	0,28	Fluka 78019

### Solution 5 : Tyrosine

*Préparer cette solution à 20X. Ajouter quelques gouttes de KOH 10N pour dissoudre*

Composé	Concentration 1X (g/l)	Référence
Tyrosine	0,29	Sigma T3754

### Solution 6 : Bases

*Préparer cette solution à 50X. Ajouter quelques gouttes de KOH 10N pour dissoudre*

Composé	Concentration 1X (g/l)	Référence
Adénine	0,010	Sigma A8626
Guanine	0,010	Sigma G6779
Uracile	0,010	Sigma V0750
Xanthine	0,010	Sigma X0626

## Solution 7 : Vitamines

*Préparer cette solution à 20X*

Composé	Concentration 1X (g/l)	Référence
Acide P-aminobenzoïque	0,010	Sigma A9878
Biotine	0,010	Sigma B4501
Cyano-cobalamine	0,001	Sigma V2876
Acide folique	0,001	Interchim 47620
Inosine	0,005	Sigma I4125
Acide nicotinique	0,001	Sigma N4126
Acide orotique	0,005	Sigma O2750
Pantothénate de calcium	0,001	Labosi
Pyridoxamine	0,005	Sigma P9380
Pyridoxine	0,002	Sigma P9755
Riboflavine	0,001	Sigma R4500
Thiamine	0,001	Sigma T4625
Acide D,L 6-8 thioctique	0,0025	Sigma T5625
Thymidine	0,005	Sigma T9250

## Solution 8: Cystéine

*Préparer cette solution à 20X*

Composé	Concentration 1X (g/l)	Référence
Cystéine	0,17	Fluka 30090

## Préparation du milieu

Les solutions sont stérilisées par filtration membranaire de 0,22 µm (TPP, vacuum filtration-system) et mélangées dans l'ordre indiqué. De l'eau osmosée est ajoutée afin de compléter le volume final souhaité.

<b>Solution</b>	<b>Concentration finale</b>	<b>Volume (mL)</b>
Solution 1(10X)	1X	100
Solution 2 (50X)	1X	20
Solution 3 (20X)	1X	50
Solution 4 (20X)	1X	50
Solution 5 (20X)	1X	50
Solution 6 (50X)	1X	20
Solution 7 (20X)	1X	50
Solution 8 (20X)	1X	50
Eau osmosée		610
Volume final		1000 mL

## Fiche technique n°3 : Suivi de la croissance microbienne

### Principe

La croissance des micro-organismes (levures et bactéries de surface) est estimée par dénombrement des cellules viables sur milieux gélosés.

### Méthode

#### Traitement des échantillons

Pour les cultures en milieu chimiquement défini (MCD), un volume de 1 ml est prélevé stérilement de l'Erlenmeyer et dilué au 1/10 dans de l'eau physiologique stérile (9 ‰ de NaCl). Des dilutions décimales de cette suspension sont ensuite effectuées dans de l'eau physiologique. La plage de dilution varie de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$  en fonction de l'avancement de la croissance des micro-organismes dénombrés.

#### Dénombrement des cellules viables

Pour un échantillon et une dilution donnée, trois boîtes de Petri sontensemencées en surface avec 100 µl de suspension. L'ensemencement se fait sur des boîtes de 140 mm de diamètre à l'aide de bille de verre stérile. Les milieux de culture utilisés sont YEGC pour les levures et BHI pour les bactéries (Fiche technique n°1). L'incubation des boîtes se fait à 25 °C pendant 2 à 3 jours selon les micro-organismes. Cette méthode permet de dénombrer le nombre d'unités formant colonies (UFC) sur la totalité de la boîte. Le nombre d'UFC doit être compris entre 30 et 300 UFC par boîte pour chaque micro-organisme. De plus, l'ensemencement en surface permet de distinguer les colonies en fonction de leur taille, de leur pigmentation, de leur aspect, et de constater immédiatement l'existence d'une éventuelle contamination. La concentration en cellules viables est donnée par la relation :

$$CV = \frac{\sum_{x=1}^n C_x \times 10^{-d} \times F}{V}$$

Avec :

[CV] : Concentration en cellules viables en ufc/ml,

d : Dilution par rapport à la suspension de départ,

C<sub>x</sub> : Nombre de colonies comptées pour la boîte x,

V : Volume de solutionensemencée (ml),

F : Facteur de dilution du prélèvement initial (=10).

## Fiche technique n°4 : Dosage par HPLC

### **Principe**

La chromatographie en liquide sous haute pression a été utilisée pour doser divers composés provenant de milieux de culture. Le principe de la méthode de dosage est basé sur le partage des composés entre la phase mobile dans laquelle ils sont élués, et la phase stationnaire qui est une colonne dotée d'une capacité de rétention plus au moins importante. Les composés sont élués à une vitesse différente selon leur affinité ce qui permet de les séparer. Les composés sont séparés puis caractérisés par leur temps de rétention.

### **Méthode**

#### Traitement des échantillons issus des cultures en milieu liquide synthétique

Lors du prélèvement, les échantillons sont filtrés à l'aide d'une seringue équipée à son extrémité d'un filtre en polyethersulfone (PES) d'une porosité de 0,22 µm (ministart®, Sartorius, France). Cette opération permet d'éliminer les particules insolubles susceptibles de gêner l'analyse. Pour le dosage des substrats carbonés, 0,5 mL de filtrat est réparti dans des vials de 1 mL et additionné de 0,5 mL d'étalon interne (acide propionique à 1 %).

#### Traitement des échantillons issus du rétentat

La préparation des échantillons, à partir d'une suspension fromagère, se fait par la précipitation au TCA. Cette technique permet d'obtenir des échantillons reproductibles et limpides. La suspension fromagère est préparée avec 10 grammes de fromage finement broyé, puis mis en contact avec 20 mL d'eau et laissée à 50 °C pendant une heure. L'ensemble est ensuite homogénéisé à l'aide d'un homogénéisateur Ultra-Turrax (25000 tr/min pendant 2 min). Ce protocole permet la migration des substrats carbonés des grains de caillés vers la solution aqueuse.

La suspension fromagère au ½ est alors mise en présence de 10 mL d'acide trichloracétique (TCA) à 24 %, puis vigoureusement agitée. La solution est laissée au repos une heure avant d'être filtrée sur papier Whatman 42.

Pour le dosage des substrats carbonés, 0,5 mL de filtrat (TCA) à nouveau filtré sur un filtre minisart® de 0,22 µm (Sartorius, France) est réparti dans des vials de 1 mL et additionné de 0,5 mL d'étalon interne (acide propionique à 1 %).

#### Analyse du lactose et du lactate

Un appareil HPLC Waters TCM (Millipore, France) équipé d'une pompe LC-6A (Shimadzu, Japon), d'un injecteur automatique (Waters), d'un intégrateur CR-3A (Shimadzu) et d'une

colonne, échangeuse de cations, Aminex HPX 87H (Biorad Hercules, CA 94547, USA) est utilisé. La solution éluée est analysée par un détecteur à longueur d'onde variable Waters 490 (programmable multiwave detector) et un réfractomètre différentiel RID-6A (Shimadzu), tous deux connectés en série. Un volume de 20 µl est injecté par un injecteur automatique d'échantillons (717 plus Waters). Les analyses sont réalisées à 35 °C, avec une vitesse d'écoulement de 0,6 mL/min. La colonne de 7,8 mm de diamètre et de 300 mm de longueur est couplée à une pré-colonne Aminex HPX-87H de 50 mm (Biorad). Cette colonne permet de séparer les acides organiques, les sucres et les alcools. La détection des sucres est réalisée grâce à un réfractomètre différentiel Waters 410. L'identification des acides organiques se fait à l'aide du détecteur UV Waters 486, dont la longueur d'onde est ajustée à 210 nm.

## Fiche technique n°5 : Analyse des composés volatils par GC/MS

### **Principe**

L'analyse des composés volatils repose essentiellement sur 3 étapes : la micro-extraction en phase solide (SPME), la séparation par chromatographie en phase gazeuse (GC) et l'identification des molécules par spectrométrie de masse (MS).

### Dispositif instrumental

Le dispositif analytique utilisé est composé d'un passeur/injecteur permettant d'effectuer la micro-extraction en phase solide de manière automatisée (Combi Pal ; CTC Analytics), d'un chromatographe en phase gazeuse (Varian CP3800), lui-même couplé à un détecteur de masse (Varian MS1200). L'unité de SPME est constituée d'une fibre de silice enrobée de polydiméthylsiloxane (PDMS, 1cm de longueur, 100 µm d'épaisseur ; Supelco). La colonne du chromatographe est équipée d'un capillaire de silice dont la surface interne est tapissée de phénylméthylsiloxane (HP-5MS, 30 m de longueur, 0,25 mm de diamètre, 0,25 µm d'épaisseur de film).

### **Méthode**

#### Traitement des échantillons

Cette analyse a été conduite sur des échantillons issus de cultures en milieu chimiquement défini. Les échantillons stockés à -80 °C après prélèvement, sont rapidement décongelés à 4 °C. Après agitation, un volume de 5 ml est prélevé et introduit dans un vial de 10 ml. Les échantillons sont ensuite placés dans un bloc chauffant thermostaté dont la température est fixée à 4 °C (durant le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre).

#### Extraction des composés volatils

La première étape de l'extraction consiste en un équilibre de partage entre la phase solide (la fibre) et la phase liquide (l'échantillon). Les échantillons sont ensuite soumis à un préchauffage de 2 min à 40 °C, sous agitation magnétique (250 rpm), afin d'améliorer la répétabilité et l'efficacité de l'extraction. La fibre est ensuite déployée dans l'espace tête ou « headspace » du vial. L'ensemble est maintenu à une température constante de 40 °C pendant les 40 min d'extraction, et sous agitation magnétique (250 rpm). Une fois les composés extraits, la fibre est directement introduite dans le dispositif d'injection split/splitless (Varian 1777) du chromatographe. La deuxième étape de l'extraction consiste alors à désorber thermiquement les composés de la fibre et à les entraîner vers la colonne. Le mode splitless

est maintenu à 250 °C pendant 1 min, afin de permettre à la totalité des composés d'être entraînée dans la colonne.

### Séparation des composés

Les composés injectés en tête de colonne sont séparés par chromatographie en phase gazeuse. Ils sont élués suivant un gradient de température en fonction de leur volatilité, et identifiés en sortie de colonne. La colonne capillaire non polaire HP-5MS, placée dans un four thermostaté, constitue la phase stationnaire. Le gaz vecteur, l'hélium, circulant avec un débit fixé à 1,2 ml/min, constitue la phase mobile.

#### *Programme du four*

Ramps	°C/min	Température finale (°C)	Temps final (min)
1		15	8
2	5	220	0
Run time			49

La chromatographie en phase gazeuse ne permettant pas une identification structurale des composés, elle est couplée à la spectrométrie de masse.

### Identification des composés

Le principe de fonctionnement du spectromètre de masse (MS) est basé sur la séparation des ions en fonction du rapport de la masse à la charge de leurs ions ( $m/z$ ). Le MS est constitué de plusieurs parties (sources, analyseurs et détecteur) permettant de réaliser les étapes suivantes : L'ionisation. Les molécules séparées sont dirigées vers une chambre d'ionisation où un flux d'électrons de forte énergie les fragmente en ions. La molécule est ionisée suivant la réaction :  $M + e^- \rightarrow 2 e^- + M^+$ . L'ion mono-chargé obtenu, appelé ion moléculaire, correspond au poids moléculaire du composé. En raison de la forte énergie du faisceau électronique, cet ion se décompose ensuite selon la structure, en une série d'ions dont la proportion et la nature sont caractéristiques de la molécule étudiée.

L'accélération. Dans la source, une différence de potentiel de plusieurs milliers de volts est appliquée entre deux plaques se trouvant en amont de l'analyseur. La vitesse acquise par l'ion est fonction de sa masse, sa charge et de la tension d'accélération.

La séparation. Les ions sont ensuite séparés suivant le rapport  $m/z$  à l'aide d'un analyseur quadrupole soumis à une tension qui affecte la trajectoire des ions qui circulent au centre. Les ions stables arrivent au détecteur. En faisant varier le potentiel, il est possible d'obtenir un spectre de masse.

La détection. L'ion sortant de l'analyseur pénètre dans un photomultiplicateur d'électron. C'est une plaque métallique qui émet des électrons secondaires lors d'un choc avec des ions. Ces électrons sont multipliés et permettent l'élaboration d'un signal électrique d'intensité

proportionnelle à la quantité d'ions reçus. L'ensemble des signaux émis par les ions permet d'obtenir un spectre de masse caractéristique de la molécule. Lors de la caractérisation spectrale des composés, le spectromètre de masse fonctionne en mode SCAN (2 scan/s) ce qui permet d'analyser tous les ions de rapport masse/charge compris entre 30 et 400 uma.

Les chromatogrammes sont reconstitués à partir du flux ionique total. Le logiciel Varian MS Work station (version 6.42) permet de faire l'acquisition et le traitement des chromatogrammes. Les pics sont identifiés par comparaison des spectres obtenus avec les spectres existants dans la banque NIST/02 Mass Spectral Library (National Institute of Standards and Technology, USA).



## Fiche technique n°6 : Extraction d'ARN par le Trizol

### **Objectif**

L'utilisation du Trizol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen, 15596-018) étant une solution monophasique de phénol et de guanidine isothiocyanate, d'une méthode mécanique (« Bead-beating ») et de colonnes RNeasy<sup>®</sup>Midi kit de Qiagen permet d'extraire les ARN en une seule étape et de manière spécifique sans contamination d'ADN.

### **Méthode**

#### Préparation des réactifs et du matériel

Les réactifs sont préparés dans de l'eau traitée au DEPC (Diéthyl Pyrocarbonate)(1:1000) et autoclavée à 120°C pendant 20 minutes. Les surfaces et les pipettes, réservées à cet usage, sont décontaminées avec la solution RNaseAway<sup>®</sup> (Molecular Bio-Products). Les contenants en plastique, Eppendorfs, tubes à vis et pointes à filtre sont garantis RNase-free et sont manipulés uniquement avec des gants en nitrile afin d'éviter toute contamination par des RNases.

#### Préparation des échantillons

Dans des tubes à vis de 2 ml, 1 ml de culture est ajouté puis centrifugé à 4000g pendant 5 min. Le surnageant est éliminé et on rajoute au culot cellulaire 200 mg de billes de zirconium (100µm, BioSpec Products) et 1,25 ml de Trizol dans tous les tubes. Chaque tube est ensuite vigoureusement agité au broyeur MP-FastPrep-24 pendant 60 secondes à 6,5 m/s puis incubé 5 min avant et après traitement. Les tubes sont agités trois fois dans ces conditions. Après refroidissement les tubes sont centrifugés 10 min à 12 000 g à 4°C. Le surnageant limpide est transféré par pipetage dans des tubes Phase Log Gel de 2 ml à température ambiante. Les tubes sont incubés 5 min à température ambiante permettant ainsi une meilleure dissociation des complexes nucléoprotéiques. Après incubation, 230 µl de chloroforme sont ajoutés à chaque tube. Les tubes, une fois fermés, sont agités à la main pendant 15 secondes (sans dissocier le gel) puis incubés 3 min à température ambiante puis 2 minutes dans la glace. Les tubes sont alors centrifugés 15 minutes à 12 000 g et à 3°C (la température doit être basse afin d'éviter que l'ADN reste en phase aqueuse). La solution se sépare alors en 3 phases : i) la phase organique inférieure rose contenant les protéines et contaminant dans le phénol-chloroforme, ii) la barrière de gel, iii) une phase limpide aqueuse supérieure contenant l'ARN. Le volume de la phase aqueuse à récupérer doit être de l'ordre de 700 µl. Le surnageant est

transféré dans un tube à vis pré-refroidi dans lequel 700 µl de phénol/chloroforme/alcool isoamyl à pH 4,7 (125/24/1) sont ajoutés. Les tubes sont agités manuellement pendant 15 secondes, puis centrifugés pendant 10 minutes à 3°C.

La phase aqueuse (à raison de 500 µl par tube) est récupérée et un volume d'éthanol à 100% correspondant à un huitième du volume initial est ajouté. Les échantillons sont ensuite purifiés sur colonne avec le kit RNeasy®Mini kit

#### Protocole d'extraction utilisé avec le RNeasy®Mini kit (Qiagen)

-Déposer l'échantillon (volume maximum 500 µl) sur une colonne RNeasy Mini placée sur un tube à Eppendorf. Fermer le tube et centrifuger 30 secondes à 3000 g à 15 °C. L'éluât est ensuite éliminé. Répéter cette étape de manière à « pooler » 4 échantillons d'ARN dans une colonne. La colonne est ensuite lavé avec 500 µl de tampon RW1. Les tubes sont alors centrifugés 30 secondes à 3000 g à 15 °C. L'éluât est par la suite éliminé, puis 500 µl de tampon RPE sont ajoutés. Les échantillons sont centrifugés 30 secondes à 3000 g à 15 °C. Cette étape est répétée 2 fois. Une fois l'éluât éliminé, les échantillons sont centrifugés à vide 30 secondes à 3000 g à 15 °C afin d'éliminer le reste du tampon. Par la suite, la colonne est transférée dans un tube Eppendorf propre. L'ARN est alors élué en ajoutant 20 µl d'eau RNase-free au centre de la colonne. Dans le but de récupérer le maximum d'ARN, il est indispensable d'attendre au moins 2 min avant de centrifuger l'échantillon.

**Remarque :** Le dosage de l'ARN (ng/µl) se fait à l'aide du Nanodrop® (ND-1000 spectrophotometer). De plus, le rapport A260/A280 doit être supérieur à 1,8 pour un échantillon d'ARN de bonne qualité.

La pureté et la qualité de l'ARN sont vérifiées à l'aide du Bioanalyseur 2100 (Agilent RNA 6000 nano), qui attribue un RIN (RNA Integrity Number) de 1 à 10 aux échantillons d'ARN. Un échantillon est considéré de bonne qualité si son RIN est supérieur à 8,5.

Pour une extraction d'ARN à partir de rétentat, le même protocole est utilisé en prenant 125 mg d'échantillon dans lequel est ajouté les billes de zirconium (Monnet et coll., 2008).

## Fiche technique n°7 : RT-PCR quantitative

### Objectif

La molécule SYBR Green I se fixe dans le petit sillon de l'ADN double brin. Suite à cette liaison, la fluorescence augmente considérablement. Ainsi lors d'une PCR en présence de SYBR Green, l'augmentation de la quantité d'ADN double brin va générer un signal fluorescent. Grâce à un système d'enregistrement de la fluorescence, la progression de l'amplification peut être suivie à chaque cycle et en temps réel.

### Méthode

#### Reverse transcription avec le kit SuperScript® III First Strand Synthesis System

Afin de générer des fragments d'ADN complémentaire à partir des ARN totaux, une transcription inverse est réalisée avec le kit SuperScript® III First Strand Synthesis System (Invitrogen®).

-Chaque échantillon contient 500 ng d'ARN

-Le mélange pour la reverse transcription est préparé dans un tube Eppendorf de 500 µl comme suit :

500 ng d'ARN	<i>n</i> µl
Amorce*	1 µl
<i>*50 µM oligo(dT)20 ou 2 µM de l'amorce spécifique du gène ou 50 ng/ µl d'amorces aléatoire</i>	
10 mM de mix de dNTP	1 µl
Eau RNase free	qsp 10 µl

-Incuber à 65 °C pour 5 min, puis mettre au moins 1 min dans la glace

-Préparer le mix pour la synthèse du cDNA comme suit :

	Une Réaction
10X RT buffer	2 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µl
0.1 M DTT	2 µl
RNaseOUT™ (40 U/µl)	1 µl
SuperScript™ III RT (200 U/µl)	1 µl

-Ajouter 10 µl du mix pour la synthèse de cDNA dans chaque tube contenant ARN/Mélange d'amorces. Mélanger gentiment et centrifuger. Incuber comme suit :

Oligo(dT)20 ou amorces GSP      50 min à 50 °C  
Amorces aléatoires                      10 min à 25 °C suivit de 50 min à 50 °C

-Les réactions se terminent en mettant 5 min les échantillons à 85 °C

-Centrifuger brièvement les tubes, y ajouter 1 µl de RNase H et les incuber à 37 °C pendant 5 min

-Les cDNA synthétisé peuvent être stockés à -20 °C

### PCR quantitative en utilisant le protocole du kit LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I

Afin de réaliser l'étape de PCR quantitative (PCRq), le kit LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science) a été sélectionné.

-Pour chaque échantillon préparer le mix dans un tube Eppendorf comme suit :

	Une Réaction
H <sub>2</sub> O, PCR grade	4,1 µl
MgCl <sub>2</sub>	1,2 µl
PCR primer mix	1,2 µl*
Lightcycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	1 µl†

\*Les amorces ont été choisies à l'aide du logiciel LightCycler® Probe Design Software 2.0 (Roche Applied Science) et commandées chez Eurogentec. Etant à 100 mM, préparer un mélange des amorces sens et antisens de sorte que la concentration finale du mélange soit de 5 mM.

†Un mélange enzyme (1a) + tampon (1b) est préalablement effectué, en mettant 10 µl de l'enzyme (1a) dans le tube (1b).

-Chaque capillaire contient un volume total de 10 µl : 2,5 µl de l'échantillon à amplifier + 7,5 µl du mix de la PCR quantitative.

-Régler le programme de l'appareil de PCR quantitative, LightCycler® Systems for Real-Time PCR, comme suit :

- Une étape de Pré-incubation permettant l'activation de l'enzyme de 10 min à 95 °C.
- 45 cycles comportant (i) une étape de dénaturation de 10 sec à 95 °C, (ii) une étape d'hybridation des amorces de 7 sec à 60 °C, (iii) une étape d'élongation de 6 sec à 72 °C et (iv) une acquisition de la fluorescence (530 nm) à la fin de chaque étape d'élongation.

### Contrôles indispensables requis

- Un gène calibrateur est utilisé en parallèle ; ce gène dont l'expression n'est pas modifiée dans les différentes conditions biologiques permet d'éviter que des modifications de quantités d'ADN dans l'essai soient analysées comme des différences d'expression
- Un capillaire contenant de l'eau à la place de l'échantillon est indispensable afin de contrôler la non contamination (par de l'ADN ou de l'ARN) des différents mix préparés.
- Il est indispensable de contrôler l'efficacité des amorces choisies pour cela, 5 dilutions successives de l'ADN du micro-organisme d'intérêt allant de 50 ng/μl à 5 pg/μl sont réalisées. Une PCR quantitative est réalisée en utilisant le couple d'amorce choisi (sens + antisens). Pour une efficacité de PCR à 100 %, la pente de la droite Ct en fonction du log de la concentration en ADN matrice doit être égale à -3,33. Lorsque toutes ces manipulations préliminaires sont réalisées, on analyse les échantillons d'intérêt.

## Fiche Technique n°8 : Analyse protéomique

### **Principe**

L'analyse protéomique permet d'étudier l'expression globale des protéines d'un micro-organisme dans un état physiologique donné. C'est une méthode utile pour construire une banque de protéomes pour des micro-organismes d'intérêt. L'analyse différentielle de l'expression des protéines peut aussi permettre de démontrer l'existence de mécanismes de réponse et d'adaptation métaboliques. L'analyse protéomique s'effectue par la technique de l'électrophorèse bidimensionnelle (2D) qui permet de séparer, visualiser et quantifier des protéines sur un gel d'acrylamide, selon leur pH isoélectrique (pI) et leur poids moléculaire (PM). Les protéines séparées peuvent ensuite être identifiées, soit par détermination de leur séquence N-terminale, ou par analyse de leur spectre de masse, avec la technique MALDI-TOF, en comparaison avec une banque de données.

### **Méthodes**

La première étape d'une analyse protéomique consiste à extraire les protéines cytoplasmiques des cellules. Puis intervient la focalisation isoélectrique (séparation en première dimension, selon le pI des protéines). Les protéines sont ensuite séparées, en deuxième dimension, par migration sur un gel SDS-page, selon leur poids moléculaire. Enfin, elles sont visualisées par coloration et les gels obtenus sont scannés, puis analysés à l'aide de logiciels spécialement conçus.

### Extraction et purification des protéines

#### *Lavage et lyse des cellules*

Après décongélation, la biomasse de la levure est lavée. Les cellules sont ensuite lysées par broyage dans un tampon Tris-EDTA (50mM - 1mM, pH 8,8) (Sigma), à raison de 1 mL de tampon pour 0,2 g culot lavé, dans un tube de 1,5 ml contenant 0,6 g de billes de broyage de 0,1 mm de diamètre (Biospec Products, Batlesville, Etats-Unis). Ce mélange est broyé trois fois pendant 20 secondes à l'aide d'un broyeur Bio101 (Savant Instruments, Holbrook, Etats-Unis), à une vitesse de 6,5. Entre chaque broyage, l'échantillon est plongé pendant 5 min dans de l'eau glacée. Une centrifugation est ensuite effectuée (24000 g, 15 min, 4 °C) pour éliminer les cellules non broyées et les débris cellulaires. Le surnageant contenant les protéines solubles est récupéré puis congelé à -80 °C jusqu'à son utilisation.

### *Dosage des protéines*

Afin de normaliser la quantité de protéines qui sera utilisée lors de l'électrophorèse, il est nécessaire de connaître la quantité de protéines extraites. La teneur en protéines totales est déterminée par la méthode de Bradford, à l'aide du réactif « Coomassie protein assay reagent » (Pierce, Rockford, IL).

### *Purification de l'échantillon*

Deux étapes permettent d'éliminer les composés cellulaires susceptibles d'interférer avec l'analyse protéomique.

- Traitement à l'endonucléase

Un échantillon contenant 300 µg de protéines, dont le volume dépend de la concentration des protéines extraites, est prélevé. 50 U d'endonucléase (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) et 0,2 µL de sulfate de magnésium 1 M (WWR Prolabo, Leuven, Belgique) sont ajoutés. L'ensemble est incubé à 37 °C pendant 30 min. Cette étape permet d'éliminer les acides nucléiques grâce à l'enzyme endonucléase qui est capable d'hydrolyser une liaison phosphodiester à l'intérieur d'un nucléotide.

- Précipitation à l'acétone

L'acétone contribue à la précipitation des protéines et extrait les lipides et les autres composés liposolubles (les sels et les polysaccharides) qui peuvent interférer avec l'analyse. Un volume d'acétone, 5 à 10 fois supérieur au volume de l'échantillon (excès d'acétone), est ajouté et homogénéisé par retournement à 4 °C. Le mélange est placé à -20 °C, pendant 5 à 15 min, puis centrifugé (24 000 g, 10 min, 4 °C). Après l'élimination du surnageant, le culot protéique est séché par retournement sur du papier absorbant pendant 5 min.

### Première dimension de l'électrophorèse bidimensionnelle

#### *Focalisation isoélectrique*

La première dimension consiste à séparer les protéines selon leur pH isoélectrique. L'emploi d'agents de réduction, de détergents et d'ampholytes, inclus dans un tampon de focalisation isoélectrique, permet de solubiliser les protéines et de les ioniser. Les agents utilisés dans cette étude et leurs fonctions sont présentés à l'annexe 5. Ils ne doivent pas modifier le point isoélectrique (pI) des molécules mais doivent supporter le haut voltage appliqué lors de la première dimension. La première dimension s'effectue dans des bandelettes de gel d'acrylamide déshydraté (« strips ») selon un gradient de pH. Sous l'action d'un champ électrique les protéines chargées (négativement ou positivement) se déplacent, pour atteindre leur pI où la charge nette des protéines est égale à 0. Pratiquement, 300 µg de protéines purifiées sont solubilisées dans 350 µL de tampon de focalisation. La suspension protéique est

déposée dans une rainure de la plaque (Biorad) en évitant les bulles d'air. Un strip de 17 cm couvrant une gamme de pH allant de 4 à 7 (Biorad), préalablement décongelé, est mis en contact avec l'échantillon. La partie acide du strip (+) se situe à gauche de la plaque de focalisation (notée +). Le strip est recouvert d'huile minérale, pour éviter l'évaporation de l'échantillon, puis déposé dans le portoir de focalisation (Protein IEF Cell, Biorad), thermostaté à 20 °C. La focalisation se déroule à 20 °C selon le programme présenté à l'annexe 6. Une réhydratation active est réalisée sous faible voltage (50V) pendant 11 h afin de permettre aux protéines d'entrer dans la matrice du gel. Elle permet de réduire le temps de procédure et de faciliter la pénétration des grosses protéines. Après la réhydratation, la focalisation est effectuée en augmentant la tension par paliers, afin de limiter l'influence des composants ioniques des échantillons et l'élévation de la température du strip. Enfin, le courant est maintenu à 8000 V pendant 7 h 30 min, pour garantir une résolution et une séparation performantes des protéines. A l'issue de la focalisation, le strip est rincé avec de l'eau milliQ. Il peut être conservé à -80 °C ou subir directement l'étape d'équilibration.

#### *Equilibration*

Il est nécessaire de solubiliser les protéines focalisées dans un tampon contenant du sodium dodecyl sulfate (SDS). L'équilibration se fait en plaçant le strip successivement dans le tampon E1 pendant 15 min pour réduire les groupements sulfhydrate, puis dans le tampon E2 pendant 20 min pour alcaliniser les groupements sulfhydrate, à température ambiante et sous agitation. Entre chaque bain, le strip est rincé avec de l'eau milliQ.

#### Deuxième dimension de l'électrophorèse bidimensionnelle

La première dimension a permis de séparer les protéines en fonction de leur pI. La seconde dimension va les séparer en fonction de leur poids moléculaire (PM). Le SDS, présent dans le gel d'acrylamide, est un agent anionique. Il se fixe sur les protéines et masque leur charge propre, en formant un complexe avec une charge nettement négative. Le gel d'acrylamide fonctionne donc comme un tamis moléculaire : la migration d'une protéine sur le gel varie en fonction du poids moléculaire de la protéine et de la concentration en acrylamide.

#### *Nettoyage et montage des plaques de gel*

Les plaques sont préalablement nettoyées trois fois sous l'eau du robinet et avec une solution de détergent (Alconox, Sigma). Elles sont rincées avec de l'eau milliQ, puis séchées sur du papier absorbant. Enfin, un nettoyage à l'alcool est effectué afin d'éliminer toutes traces d'humidité. Les plaques sont ensuite dressées sur un portoir, en portant une attention particulière à la pose des joints afin d'éviter les fuites.

#### *Préparation d'un gel d'acrylamide*



La solution de gel est préparée selon la composition donnée à l'annexe 8. Juste avant de couler le gel, du persulfate d'ammonium (0,5 %) (Sigma) et du Temed (0,032 %) (Biorad) sont ajoutés dans la solution, comme catalyseurs de la polymérisation du gel. Le gel est ensuite coulé entre les plaques et un peigne, permettant le dépôt du strip et la création d'un puit pour insérer le marqueur de poids moléculaire, est ajouté. La polymérisation est totale après 2 h à température ambiante.

#### *Migration*

Après la polymérisation, le strip est déposé en haut du gel, partie acide (+) vers la droite. Il est maintenu en place par l'ajout de 2 mL d'agarose (Sigma) (1 % dans le tampon de migration). Le dépôt d'un marqueur de poids moléculaire (Precision Plus Protein™ Standards, 10–250 kD, Biorad) dans un puits à côté du strip, permet de déterminer les masses des protéines sur le gel. Pratiquement, 200 ng de marqueur sont ajoutés dans la rainure de marquage du gel de migration. Ces protéines de marquage vont migrer avec les protéines du strip sur le gel. Après 10 min (temps nécessaire à la polymérisation de l'agarose), le gel est déposé dans la cuve d'électrophorèse contenant 1,5 L de tampon de migration dans la chambre inférieure et 400 mL dans la chambre supérieure. Un maintien préalable du courant à 5 mA pendant 15 min permet de stabiliser le gel (pré-run), permettant aux protéines de bien migrer du strip vers le gel de deuxième dimension. La migration se déroule à 14 °C.

#### Coloration des gels

A la suite de la migration, les protéines séparées sur le gel sont colorées afin de visualiser les spots en vue de l'acquisition de l'image. Après rinçage du gel dans de l'eau milliQ, pendant 15 min sous agitation douce (table d'agitation, mouvement pendulaire), la coloration est effectuée, pendant 1 h, dans du bleu de Coomassie colloïdal (Biorad). Le gel est ensuite rincé deux fois, pendant 1 h, dans de l'eau miliQ.

#### Acquisition et analyse d'images

##### *Numérisation des images*

Il est nécessaire de numériser les spots observés sur les gels afin de les analyser avec un système d'analyse d'images. La numérisation est réalisée avec un scanner (GS800™, Biorad), préalablement étalonné dans les gris.

##### *Analyse d'images*

L'analyse est effectuée à l'aide du logiciel de traitement d'images PDQuest (Biorad). Il permet d'identifier la position de chaque spot protéique, de quantifier son intensité, de comparer des spots entre eux et de faire des analyses statistiques.

Un traitement primaire de l'image sert à bien aligner l'image scannée. L'augmentation des contrastes de l'image permet ensuite une meilleure visualisation des spots présents sur le gel et un amoindrissement du bruit de fond (l'intensité relative des spots entre eux ne varie pas). Après un calibrage en termes de taille des spots, de sensibilité et de bruit de fond, le logiciel détecte les spots présents sur le gel. Une étape de nettoyage est alors nécessaire : elle vise à éliminer les spots d'intensité trop faible pour être évalués correctement, ou situés dans des zones à fort bruit de fond. Afin d'obtenir une image représentative de la condition étudiée, une comparaison de trois gels obtenus dans la même condition est effectuée, en sélectionnant sur chaque gel, les spots communs et en créant des points d'ancrage. Au cours de cette étape, il est possible d'affiner encore le nettoyage. Le pH du strip varie de façon linéaire. Pour quantifier les pI, il est donc possible de positionner un spot ayant un pI acide proche de pH 4, un autre ayant un pI basique proche de pH 7 et au moins un troisième de pI intermédiaire (pH 5 à 6), préalablement connus. Un marqueur de poids moléculaire est inclus sur le gel, afin de permettre l'identification des masses des protéines. Enfin, quatre spots de référence, situés aux quatre extrémités d'une image, permettent de déterminer les valeurs de poids moléculaire et de pI de tous les spots présents sur le gel.

#### *Comparaison des gels obtenus dans des conditions différentes*

Pour comparer des gels issus de deux conditions expérimentales différentes, un « matchset » est constitué à partir de tous les gels correspondant aux deux conditions (2 séries de 3 gels au minimum). Les gels sont comparés en fonction des niveaux de gris et des surfaces de chaque spot, en déterminant 3 variables : RE1 : expression relative qui renseigne sur la surface et l'intensité de gris d'un spot dans les gels de référence ; RE2 : expression relative qui renseigne sur la surface et l'intensité de gris d'un spot dans les gels de comparaison ; DE : expression différentielle, correspondant au rapport des RE du même spot dans les deux séries de gels comparés :  $DE = RE2/RE1$

Quatre types d'analyse sont alors effectués :

- Une analyse statistique (test de student) pour identifier les spots statistiquement différents dans les deux séries de gel, en tenant compte de la variabilité entre les gels ;
- Une analyse qualitative qui permet de mettre en évidence des spots présents uniquement sur l'une des deux séries de gels ;
- Une analyse quantitative qui permet de comparer la densité des spots présents sur les deux séries de gels, selon trois niveaux de différence :

$DE \geq 2$ , le spot est sur-synthétisé dans la série 2 ;

$0,5 < DE < 2$ , le spot est considéré comme identique sur les deux séries de gels ;

$DE \leq 0,5$ , le spot est sur-synthétisé dans les gels de référence.

- Une analyse booléenne permet enfin de sélectionner les spots en commun, issus à la fois des analyses statistiques et des analyses qualitatives ou quantitatives. A l'issue des analyses, une vérification visuelle des spots est toujours nécessaire. Ensuite, les données relatives aux spots retenus lors des analyses sont collectées dans un fichier qui regroupe le numéro du spot, sa masse moléculaire, son point isoélectrique et sa densité normalisée, pour l'ensemble des gels traités.

### Identification des protéines par spectrométrie de masse MALDI-TOF

#### **Principe**

La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice – Temps de Vol) permet d'identifier des peptides et des protéines après hydrolyse. Son principe consiste à effectuer une désorption-ionisation qui a pour but d'ioniser les molécules, qui passent ainsi de l'état solide à l'état gazeux, en appliquant des impulsions laser. Appliquée à la caractérisation de protéines, la méthode requiert une hydrolyse trypsique préalable qui permet l'obtention de peptides. L'échantillon est alors déposé sur une matrice dont le rôle est de minimiser la dégradation de l'échantillon provoquée par les rayons laser et d'absorber l'énergie transmise par le faisceau. La matrice, porteuse de plusieurs échantillons, est alors bombardée par le laser, permettant aux peptides intacts d'être ionisés. Une fois les ions formés, ils sont accélérés à haute tension (20 kV) et envoyés jusqu'au détecteur. Les ions, ayant une énergie cinétique fixe, circulent à des vitesses différentes selon la masse de la molécule : les ions ayant une masse élevée transitent plus lentement que les ions ayant une masse plus faible. L'appareil mesure le temps que mettent les ions pour atteindre le détecteur (temps de vol) et l'associe à leur rapport masse/charge ( $m/z$ ). Le signal est ensuite visualisé en spectre et enregistré sous la forme d'une liste de masses.

Tous les essais d'identification des protéines ont été effectués au sein de la plateforme protéomique PAPSS (Plateau d'Analyse Protéomique par Séquençage et Spectrométrie de Masse, INRA, Jouy-en-Josas) de l'unité de Biochimie Bactérienne. Le protocole expérimental a été développé par Guillot et al. (2003). Les spots de protéines issus de l'électrophorèse bidimensionnelle sont excisés, puis lavés avec 30  $\mu\text{L}$  d'un mélange 1:1 (v:v) de carbonate d'ammonium (50 mM, Biochemica, Fluka, Steinheim, Allemagne) et d'acétonitrile (Merk, Paris, France) puis séchés pendant 30 min (Sécheur Speed-vac, Savant, Hicksville, NY). Ils sont ensuite réhydratés avec 50 mM de carbonate d'ammonium contenant 13  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  de trypsine porcine, à 37 °C pendant 12 h. Le surnageant de la solution réhydratée et hydrolysée est utilisé directement pour l'analyse MALDI-TOF. Les échantillons sont déposés sur une

matrice composée d'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (4 mg.mL<sup>-1</sup> dans 0,1 % d'acide trifluoroacétique et 500 mL.L<sup>-1</sup> d'acétonitrile). Ils sont analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF sur un appareil Voyager DE STR Instrument (Applied Biosystems, Farmingham, MA), comme décrit par Guillot et coll. (2003). Une calibration interne est réalisée avec deux peptides issus de la trypsine, de masses égales à 842,5 et 2211,1 Da.

#### *Traitements des résultats*

Les peptides sont identifiés à partir des listes de masses mono-isotopiques obtenues expérimentalement. Ces listes sont ensuite comparées avec les listes incluses dans des bases de données en utilisant le programme MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu>). Une base locale (*Yarrowia lipolytica*) et une base de données publique Génolevures, (<http://cbi.labri.fr/Genolevures>) sont utilisées. La précision sur la masse est de 15 à 30 ppm. Il faut identifier au minimum quatre peptides et obtenir une couverture de séquence supérieure à 20 % pour confirmer un résultat d'identification. La concordance entre les masses moléculaires et points isoélectriques des valeurs théoriques et expérimentales est également vérifiée.

## Fiche technique n°9 : Préparation du Rétentat

### **Objectif**

Mise au point d'un milieu fromage modèle, permettant une manipulation plus aisée qu'un fromage fabriqué en plate –forme expérimentale.

### **Méthode**

#### Préparation des inocula

Les précultures sont réalisées dans des erlenmeyers de 50 ml contenant 10 ml de milieu. Les milieux inoculés sont incubés à 25 °C, 150 rpm (incubateur rotatif, 5 cm de diamètre de rotation ; Unitron, Ht Infors), pour une durée allant de 18 h à 72 h afin d'obtenir la densité optique (DO) voulut. Ces précultures serviront d'inoculum pour les rétentats. Pour chaque facteur étudié au moins trois replicats sont réalisés.

#### Préparation du rétentat

La veille les flacons contenant le rétentat sont placés dans la chambre à 4 °C. Les flacons sont ensuite bien décongelés au bain marie à 50 °C pendant 40 min. Si le liquide est toujours visqueux, agiter fortement le flacon à la main jusqu'à obtention d'un liquide fluide et homogène. Le flacon est ensuite décontaminé à l'alcool avant ouverture (sous la hotte à flux laminaire). Dans un becher de 500 ml, 150 ml de rétentat sont ajoutés et agités à l'aide d'un barreau et un agitateur magnétique. Sous agitation, 135 µl de présure diluée préalablement au 1/10<sup>ème</sup>, sont ajouté. Les différentes souches sont ensuiteensemencées selon les concentrations voulues. La levure *Y. Lipolytica* 1E07 estensemencé à 10<sup>5</sup> ufc g<sup>-1</sup>, les deux bactéries *L. Lactis* LD61 et *S. xylosus* C2a sont respectivementensemencés à 10<sup>5</sup> UFC.g<sup>-1</sup> et 10<sup>7</sup> UFC.g<sup>-1</sup>. Le rétentatensemencé est ensuite mélanger manuellement puis répartit par volume de 10 ml dans des flacons conique stériles de 40 ml. Afin d'avoir une entrée constante d'oxgène, les flacons sont fermés à l'aide de bouchons en cellulose.

Les rétentats sont placés pendant 7 h à 30 °C afin qu'ils prennent en masse (la prise en masse est d'environ 4 heures), puis transférer dans des cristallisoirs et laisser incuber à 14 °C, pendant 24, 48 et 72 h. Afin de vérifier la concentration de l'inoculum, un dénombrement est effectué à 0 h, puis au cours de la culture.

#### Traitement des échantillons pour le dénombrement des cellules viables

Pour les cultures sur rétentat, le dénombrement se fait en prélevant 1 g de rétentat à l'aide d'une spatule stérile et transféré dans 10 ml d'eau physiologique stérile (9 ‰ de NaCl). Cette

suspension cellulaire est homogénéisée à l'Ultra-Turrax (modèle T25 ; IMLAB) à 8000 rpm (1 min), puis des dilutions décimales de cette suspension sont effectuées dans de l'eau physiologique. La plage de dilution varie de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$  en fonction de l'avancement du temps de culture et des micro-organismes dénombrés.

**Remarques** : Tout au long de la manipulation différentes analyses sont effectuées :

- Suivi de la croissance microbienne par dénombrement (Fiche technique n°3)
- Dosage lactate/ lactose et acides aminés par HPLC (Fiche technique n°4)
- Extraction d'ARNm à partir du rétentat afin de réaliser les études transcriptomiques (Monnet et coll., 2008)

## Fiche technique n°10 : Marquage par synthèse d'ADNc

### Principe

Adaptation du kit *CyScribe™ First-Strand cDNA Labelling* (Amersham Biosciences) pour procéder au marquage direct de l'ARN de la levure *Y. lipolytica*. L'étape de marquage a lieu directement au cours de la synthèse d'ADNc par l'incorporation d'un nucléotide couplé à un fluorochrome. Les fluorochromes utilisés sont la cyanine 3 (Cy3) et cyanine 5 (Cy 5) qui émettent respectivement à 532 nm et 645 nm.

### Méthode

Le marquage s'effectue à partir de 5 µg d'ARN total (quantité adaptée à notre modèle d'étude)

#### Mix d'hybridation des amorces

Pour chaque échantillon préparer le mix d'hybridation dans un tube de PCR comme suit :

	Volume en µl	
	cyanine 3	cyanine 5
oligodT	1	1
Random	1	1
ARN (5 µg)	X	X
Eau (qsp)	11	11

Les échantillons sont mis 5 min à 70 °C dans le thermocycleur, puis 10 min à température ambiante.

#### Mix de marquage

Le mix de marquage est alors ajouté pour chaque échantillon comme suit :

	Volume en µl	
	cyanine 3	cyanine 5
Tampon	4	4
DTT	2	2
dNTP*	1	2
Enzyme	1	1
dCTP-cyanine 2		4

\*Le Mix de dNTP est préparé séparément en mettant des dATP, dGTP, dTTP à 10 mM et le dCTP à 2.5 mM.

Une fois le mix de marquage ajouté, les tubes sont placés 2 h à 42 °C dans le thermocycleur. L'ARN restant est dégradé en ajoutant 2 µl de NaOH (Prolabo 33618.268) à 5 M, le tout est alors vortexé puis incubé 15 min à 37 °C. La réaction est ensuite neutralisée en ajoutant 20 µl d'HEPES à 2 M.

Purification sur colonnes QiaQuick (élimination des oligos et nucléotides libres) en suivant le protocole QIAquick<sup>®</sup> nucleotide (Qiagen)

- Ajouter le tampon PN à 10X du volume de chaque échantillon (430 µl pour l'échantillon marqué en cyanine 3 et 460 µl pour celui marqué en cyanine 5)
- Le volume ADNc marqué + PN est placé sur la colonne pour fixer l'ADNc. Centrifuger 1 min à 1500 g et éliminer le liquide collecté.
- Un premier lavage de la colonne s'effectue avec 500 µl de tampon PE sur la colonne, et centrifuger 1 min à 1500 g. Renouveler le lavage.
- La colonne est séchée en centrifugeant 1 min à 9000 g.
- Mettre 50 µl du tampon d'élution EB, attendre 1 min, centrifuger 1 min à 9000 g.

Les échantillons sont concentrés sur colonne Amicon<sup>®</sup> (Millipore) en centrifugeant 1 min à 9000 g. 10 µl d'eau RNase free sont ajoutés afin d'éluer l'ADNc de la colonne, puis centrifuger pendant 1 min à 13000 rpm. L'ADNc marqué peut être stocké à -80 °C, à l'obscurité.



## Fiche technique n°11 : Hybridation et lavage de la puce

### Hybridation

Les cibles marquées sont alors mélangées avec 8 µl de tampon de fragmentation 25X AgilentTechnology® et incubé pendant 30 min à 60 °C. Une fois la réaction terminée, 200 µl du tampon d'hybridation 2X HI sont alors ajouté. Le volume final des cibles marquées est de 400 µl. Les cibles marquées sont alors déposées sur la puce à ADN. La lame est placée dans la chambre d'hybridation en suivant les indications fournis par Agilent (Agilent Microarray Hybridization Chamber User Guide) .L'hybridation se déroule dans le four Agilent (rotation 4 rpm) à 60 °C pour 16 h.

### Lavage

Une fois l'hybridation terminée, la lame est plongée dans différentes solutions de lavage de stringence croissante. Cette étape permet d'éliminer les sondes non hybridées et diverses hybridations aspécifiques.

La lame est placé dans un bain n°1 (SSC 2X-SDS 0,1 %), afin de décoller la lame de la gaskette à l'aide d'une pince. La lame est ensuite placé à nouveau dans un bain n°1 pendant 5 min, puis lavée successivement dans le bain n°2 (SSC 0,5X-SDS 0,1 %), le bain n°3 (SSC 0,1X-SDS 0.1%) et le bain n°4 (SSC 0,1X-SDS 0,1%).

La lame est finalement séchée par centrifugation à 150 g pendant 1 min. Elle est ensuite rangée dans une boîte en plastique à l'abri de la poussière, de la lumière et de l'humidité, puis scannée dans la journée.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Abriouel, H., Martín-Platero, A., Maqueda, M., Valdivia, E. & Martínez-Bueno, M. (2008).** Biodiversity of the microbial community in a Spanish farmhouse cheese as revealed by culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology* **127**, 200-208.

**Abu-Tarboush, H. M. (1996).** Comparison of associative growth and proteolytic activity of yogurt starters in whole milk from camels and cows. *Journal of Dairy Science* **79**, 366-371.

**Adams, M. R. & Hall, C. J. (1988).** Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *International Journal of Food Science and Technology* **23**, 287-292.

**Addis, E., Fleet, G. H., Cox, J. M., Kolak, D. & Leung, T. (2001).** The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology* **69**, 25-36.

**Ahamad, N. & Marth, E. H. (1989).** Behavior of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21, and 35°C in tryptose broth acidified with acetic, citric, or lactic acid. *Journal of Food Protection* **52**, 688-695.

**Akin, H. (2008).** Evolution du pH pendant la fermentation alcoolique de moûts de raisins : modélisation et interprétation métabolique. *Thèse de doctorat. Génie des Procédés et Environnement*. Institut national polytechnique de Toulouse, Toulouse, 21-30.

**Alwine, J. C., Kemp, D. J. & Stark, G. R. (1977).** Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5350-5354.

**Amoroso, M. J., Manca de Nadra, M. C. & Olivier, G. (1989).** The growth and sugar utilization by *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* isolated from market yoghurt. *Le Lait* **69**, 519-528.

**Anderson, L. & Seilhamer, J. (1997).** A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* **18**, 533-537.

**Andrighetto, C., Marcazzan, G. & Lombardi, A. (2004).** Use of RAPD-PCR and TTGE for the evaluation of biodiversity of whey cultures for Grana Padano cheese. *Letter and Applied Microbiology* **38**, 400-405.

**Arfi, K., Amarita, F., Spinnler, H. E. & Bonnarne, P. (2003).** Catabolism of volatile sulfur compounds precursors by *Brevibacterium linens* and *Geotrichum candidum*, two microorganisms of the cheese ecosystem. *Journal of Biotechnology* **105**, 245-253.

**Arfi, K., Leclercq-Perlat, M. N., Spinnler, H. E. & Bonnarme, P. (2005).** Importance of curd-neutralising yeasts on the aromatic potential of *Brevibacterium linens* during cheese ripening. *International Dairy Journal* **15**, 883-891.

**Arfi, K., Spinnler, H. E., Tache, R. & Bonnarme, P. (2002).** Production of volatile compounds by cheese-ripening yeasts: requirement for a methanethiol donor for S-methyl thioacetate synthesis by *Kluyveromyces lactis*. *Applied and Microbiology Biotechnology* **58**, 503-510.

**Arfi, K., Tâche, R., Spinnler, H. E. & Bonnarme, P. (2003).** Dual influence of the carbon source and L-methionine on the synthesis of sulphur compounds in the cheese-ripening yeast *Geotrichum candidum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **61**, 359-365.

**Ascon-Reyes, D. B., Ascon-Cabrera, M. A., Cochet, N. & Lebeault, J. M. (1995).** Indirect conductance for measurements of carbon dioxide produced by *Streptococcus salivarius* ssp. thermophilus TJ 160 in pure and mixed cultures. *Journal of Dairy Science* **78**, 8-16.

**Ayad, E. H. E., Verheul, A., Engels, W. J. M., Wouters, J. T. M. & G., S. (2000).** Enhanced flavour formation by combination of selected lactococci from industrial and artisanal origin with focus on completion of a metabolic pathway. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 59-67.

**Baker, G. C., Smith, J. J. & Cowan, D. A. (2003).** Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiology Methods* **55**, 541-555.

**Balasubramanyam, V. (1998).** Cultural conditions for the production of bacteriocin by a native isolate of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CFR 2028 in milk medium. *Journal of Applied Microbiology* **84**, 97-102.

**Barczak, A., Rodriguez, M. W., Hanspers, K., Koth, L. L., Tai, Y. C., Bolstad, B. M., Speed, T. P. & Erle, D. J. (2003).** Spotted long oligonucleotide arrays for human gene expression analysis. *Genome Research* **13**, 1775-1785.

**Baroiller, C. & Schmidt, J. L. (1990).** Contribution à l'étude de l'origine des levures du fromage de camembert. *Le lait* **70**, 67-84.

**Barth, G. & Gaillardin, C. (1997).** Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews* **19**, 219-237.

**Béal, C. & Sodini, I. (2003).** Fabrication des yaourts et des laits fermentés. *Les techniques de l'Ingénieur*. Editions TI Sciences et Techniques, 1-16.

**Benkerroum, N., Oubel, H. & Mimoun, L. B. (2002).** Behavior of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in yogurt fermented with a bacteriocin-producing thermophilic starter. *Journal of Food Protection* **65**, 799-805.

**Benthin, S. & Villadsen, J. (1995).** Different inhibition of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by D- and L-lactic acid: effects on lag phase, growth rate and cell yield. *Journal of Applied Microbiology* **78**, 647-654.

- Bizani, D., Morrissy, J. A. C., Dominguez, A. P. M. & Brandelli, A. (2008).** Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A. *International Journal of Food Microbiology* **121**, 229-233.
- Blake, W. J., Kaern, M., Cantor, C. R. & Collins, J. J. (2003).** Noise in eukaryotic gene expression. *Nature* **422**, 633-637.
- Blanchin-Roland, S., Cordero Otero, R. R. & Gaillardin, C. (1994).** Two upstream activation sequences control the expression of the XPR2 gene in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 327-338.
- Blanchin-Roland, S., Costa, G. D. & Gaillardin, C. (2005).** ESCRT-I components of the endocytic machinery are required for Rim101-dependent ambient pH regulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology* **151**, 3627-3637.
- Bockelman, W., Krusch, U., Engel, G., Klijn, N., Smit, G. & Heller, J. (1997).** The microflora of Tilsit cheese. Part 1. Variability of the smear flora. *Nahrung* **41**, 208-212.
- Bockelmann, W. & Hoppe-Seyler, T. (2001).** The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk. *International Dairy Journal* **11**, 307-314.
- Bockelmann, W., Willems, K. P., Neve, H. & Heller, K. H. (2005).** Cultures for the ripening of smear cheeses. *International Dairy Journal* **15**, 719-732.
- Bonaïti, C., Irlinger, F., Spinnler, H. E. & Engel, E. (2005).** An iterative sensory procedure to select odor-active associations in complex consortia of microorganisms: application to the construction of a cheese model. *Journal of Dairy Science* **88**, 1671-1684.
- Bonnarme, P., Arfi, K., Dury, C., Helinck, S., Yvon, M. & Spinnler, H. E. (2001).** Sulfur compound production by *Geotrichum candidum* from L-methionine: importance of the transamination step. *FEMS Microbiology Letters* **205**, 247-252.
- Brassow, H. (2001).** Phages of dairy bacteria. *Annual Review of Microbiology* **55**, 283-303.
- Brennan, N. M., Brown, R., Goodfellow, M., Ward, A. C., Beresford, T. P., Simpson, P. J., Fox, P. F. & Cogan, T. M. (2001a).** *Corynebacterium mooreparkense* sp. nov. and *Corynebacterium casei* sp. nov., isolated from the surface of a smear-ripened cheese. *International Journal of Systematic Evolution Microbiology* **51**, 843-852.
- Brennan, N. M., Brown, R., Goodfellow, M., Ward, A. C., Beresford, T. P., Vancanneyt, M., Cogan, T. M. & Fox, P. F. (2001b).** *Microbacterium gubbeenense* sp. nov., from the surface of a smear-ripened cheese. *International Journal of System Evolution Microbiology* **51**, 1969-1976.
- Brennan, N. M., Ward, A. C., Beresford, T. P., Fox, P. F., Goodfellow, M. & Cogan, T. M. (2002).** Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 820-830.
- Brinkman, N. E., Haugland, R. A., Wymer, L. J., Byappanahalli, M., Whitman, R. L. & Vesper, S. J. (2003).** Evaluation of a Rapid, Quantitative Real-Time PCR Method for

Enumeration of Pathogenic *Candida* Cells in Water. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 1775-1782.

**Brûlé, G., Lenoir, J. & Remeuf, F. (1997).** La micelle de caséine et la coagulation du lait *In* Eck, A. & Gillis, J. C. (ed.). *Le fromage*. Lavoisier, Technique et Documentation, Paris, 7-39.

**Bustin, S. (2004).** A-Z of Quantitative PCR. *In* Tsigelny, I. F. (ed.). *IUL Biotechnology Series*, La Jolla, California, 102-104.

**Bustin, S. A. (2000).** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* **25**, 169-193.

**Bustin, S. A. (2002).** Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* **29**, 23-39.

**Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T. & Pfaffl, M. W. (2005).** Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *J Mol Endocrinol* **34**, 597-601.

**C.N.I.E.L (2005).** Centre National Interprofessionnel de l'Économie Laitière. "L'économie laitière en chiffres". Paris.

**Callon, C., Delbès, C., Duthoit, F. & Montel, M.-C. (2006).** Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. *Systematic and Applied Microbiology* **29**, 172-180.

**Cantéri, G. (1997).** Les levains lactiques. *In* Eck, I. N. & Gillis, J. C. (ed.). *Le fromage*. Lavoisier, Technique et Documentation, Paris

**Caplice, E. & Fitzgerald, G. F. (1999).** Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* **50**, 131-149.

**Carreira, A., Ferreira, L. M. & Loureiro, V. (2001).** Brown Pigments Produced by *Yarrowia lipolytica* Result from Extracellular Accumulation of Homogentisic Acid. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 3463-3468.

**Casaregola, S., Neuveglise, C., Lepingle, A., Bon, E., Feynerol, C., Artiguenave, F., Wincker, P. & Gaillardin, C. (2000).** Genomic Exploration of the Hemiascomycetous Yeasts: 17. *Yarrowia lipolytica*. *FEBS Letters* **487**, 95-100.

**Cernat Bondar, D., Beckerich, J.-M. & Bonnarme, P. (2005).** Involvement of a Branched-Chain Aminotransferase in Production of Volatile Sulfur Compounds in *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 4585-4591.

**Chich, J. F. (2001 ).** A mini review: proteomic analysis, a post-genomic approach. *Le Lait* **81**, 13-18.

**Choisy, C., Desmazeaud, M., Gripon, J.-C., Lambert, G. & Lenoir, J. (1997a).** La biochimie de l'affinage *In* Eck, A. & Gillis, J.-C. (ed.). *Le fromage*. Lavoisier, Technique et Documentation, Paris, 86-153.

- Choisy, C., Desmazeaud, M., Gueguen, M., Lenoir, J., Schmidt, J.-L. & Tourneur, C. (1997b).** Les phénomènes microbiens. In Eck, A. & Gillis, J. C. (ed.). *Le fromage*. Lavoisier, Technique et Documentation, Paris, 377-446.
- Cholet, O., Henaut, A., Casaregola, S. & Bonnarme, P. (2007).** Gene Expression and Biochemical Analysis of Cheese-Ripening Yeasts: Focus on Catabolism of L-Methionine, Lactate, and Lactose. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 2561-2570.
- Cocolin, L., Diez, A., Urso, R., Rantsiou, K., Comi, G., Bergmaier, I. & Beimfohr, C. (2007).** Optimization of conditions for profiling bacterial populations in food by culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology* **120**, 100-109.
- Cocolin, L., Innocente, N., Biasutti, M. & Comi, G. (2004).** The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *International Journal of Food Microbiology* **90**, 83-91.
- 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.
- Coppola, S., Blaiotta, G., Ercolini, D. & Moschetti, G. (2001).** Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 414-420.
- Coppola, S., Fusco, V., Andolfi, R., Aponte, M., Blaiotta, G., Ercolini, D. & Moschetti, G. (2006).** Evaluation of microbial diversity during the manufacture of Fior di Latte di Agerola, a traditional raw milk pasta-filata cheese of the Naples area. *Journal of dairy research* **73**, 264-272.
- Corsetti, A., Rossi, J. & Gobbetti, M. (2001).** Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology* **69**, 1-10.
- Cosentino, S., Fadda, M. E., Deplano, M., Mulargia, A. F. & Palmas, F. (2001).** Yeasts associated with Sardinian ewe's dairy products. *International Journal of Food Microbiology* **69**, 53-58.
- Courtin, P. & Rul, F. (2004).** Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. *Le Lait* **84**, 125-134.
- Curtin, A. C., Gobbetti, M. & McSweeney, P. L. H. (2002).** Peptidolytic, esterolytic and amino acid catabolic activities of selected bacterial strains from the surface of smear cheese. *International Journal of Food Microbiology* **76**, 231-240.
- Dacosta, Y. (2000).** *La bio-protection des aliments*. Process, Cesson-Sévigné, France, Paris.
- Dahl, S., Tavaría, F. K. & Xavier Malcata, F. (2000).** Relationships between flavour and microbiological profiles in Serra da Estrela cheese throughout ripening. *International Dairy Journal* **10**, 255-262.

- Dako, E., El Soda, M., Vuilleumard, J.-C. & Simard, R. E. (1995).** Autolytic properties and aminopeptidase activities of lactic acid bacteria. *Food Research International* **28**, 503-509.
- Das, S., Holland, R., Crow, V. L., Bennett, R. J. & Manderson, G. J. (2005).** Effect of yeast and bacterial adjuncts on the CLA content and flavour of a washed-curd, dry-salted cheese. *International Dairy Journal* **15**, 807-815.
- Deetae, P., Bonnarme, P., E. Spinnler, H. E. & Helinck, S. (2007).** Production of volatile aroma compounds by bacterial strains isolated from different surface-ripened French cheeses *Applied microbiology and biotechnology* **76**, 1161-1171.
- Delbes, C., Ali-Mandjee, L. & Montel, M.-C. (2007).** Monitoring Bacterial Communities in Raw Milk and Cheese by Culture-Dependent and -Independent 16S rRNA Gene-Based Analyses. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 1882-1891.
- Delbes, C. & Montel, M. C. (2005).** Design and application of a *Staphylococcus*-specific single strand conformation polymorphism-PCR analysis to monitor *Staphylococcus* populations diversity and dynamics during production of raw milk cheese. *Letter and Applied Microbiology* **41**, 169-74.
- Dellaglio, F., H. De Roissart, S. Torriani, M. C. Curk, and D. Janssens. (1994).** Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In De Roissart, H. D. & Luquet, F. M. (ed.). *Bactéries Lactiques : Aspects fondamentaux et technologiques*, Lorica, Paris., 25-70.
- Devoyod, J. J. (1969).** Flore microbienne du fromage de Roquefort. II-Staphylocoques et microcoques. *Le Lait* **49**, 20-39.
- Dickinson, J. R., Harrison, S. J. & Hewlins, M. J. E. (1998).** An Investigation of the Metabolism of Valine to Isobutyl Alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **273**, 25751-25756.
- Dickinson, J. R. & Norte, V. (1993).** A study of branched-chain amino acid aminotransferase and isolation of mutations affecting the catabolism of branched-chain amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 29-32
- Dolci, P., Barmaz, A., Zenato, S., Pramotton, R., Alessandria, V., Cocolin, L., Rantsiou, K. & Ambrosoli, R. (2009).** Maturing dynamics of surface microflora in Fontina PDO cheese studied by culture-dependent and -independent methods. *Journal of Applied Microbiology* **106**, 278-287.
- Dorigo, U., Volatier, L. & Humbert, J.-F. (2005).** Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research* **39**, 2207-2218.
- Dudoit, S., Yang, Y., Speed, T. & Callow, M. (2002).** Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments. *Statistica Sinica* **12**, 111-139.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., de Montigny, J., Marck, C., Neuveglise, C., Talla, E., Goffard, N., Frangeul, L., Aigle, M., Anthouard, V., Babour, A., Barbe, V., Barnay, S., Blanchin, S., Beckerich, J.-M., Beyne,**

E., Bleykasten, C., Boisrame, A., Boyer, J., Cattolico, L., Confaniolero, F., de Daruvar, A., Despons, L., Fabre, E., Fairhead, C., Ferry-Dumazet, H., Groppi, A., Hantraye, F., Hennequin, C., Jauniaux, N., Joyet, P., Kachouri, R., Kerrest, A., Koszul, R., Lemaire, M., Lesur, I., Ma, L., Muller, H., Nicaud, J.-M., Nikolski, M., Oztas, S., Ozier-Kalogeropoulos, O., Pellenz, S., Potier, S., Richard, G.-F., Straub, M.-L., Suleau, A., Swennen, D., Tekaiia, F., Wesolowski-Louvel, M., Westhof, E., Wirth, B., Zeniou-Meyer, M., Zivanovic, I., Bolotin-Fukuhara, M., Thierry, A., Bouchier, C., Caudron, B., Scarpelli, C., Gaillardin, C., Weissenbach, J., Wincker, P. & Souciet, J.-L. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**, 35-44.

Dummont, J. P., Roger, S. & J., A. (1974a). Etude des composés neutres volatils présents dans le Vacherin. *Le Lait* **54**, 243-251.

Duthoit, F., Callon, C., Tessier, L. & Montel, M.-C. (2005). Relationships between sensorial characteristics and microbial dynamics in "Registered Designation of Origin" Salers cheese. *International Journal of Food Microbiology* **103**, 259-270.

Duthoit, F., Godon, J.-J. & Montel, M.-C. (2003). Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 3840-3848.

Duthoit, F., Tessier, L. & Montel, M. C. (2005). Diversity, dynamics and activity of bacterial populations in 'Registered Designation of Origin' Salers cheese by single-strand conformation polymorphism analysis of 16S rRNA genes. *Journal of Applied Microbiology* **98**, 1198-1208.

Eisler, H., Fröhlich, K.-U. & Heidenreich, E. (2004). Starvation for an essential amino acid induces apoptosis and oxidative stress in yeast. *Experimental Cell Research* **300**, 345-353.

El-Baradei, G., Delacroix-Buchet, A. & Ogier, J.-C. (2007). Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional egyptian Domiati cheese. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 1248-1255.

El Soda, M. A. (1993). The role of lactic acid bacteria in accelerated cheese ripening. *FEMS Microbiology Reviews* **12**, 239-251.

Eliskases-Lechner, F. & Ginzinger, W. (1995). The bacterial flora of surface-ripened cheeses with special regard to coryneforms. *Le Lait* **75**, 571-584.

Eliskases-Lechner, F. & Ginzinger, W. (1995). The yeast flora of surface-ripened cheeses. *Milchwissenschaft-Milk Science International* **50**, 458-462.

Entian, K. D. & de Vos, W. M. (1997). Genetics of subtilin and nisin biosyntheses: biosynthesis of lantibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek* **69**, 109-117.

Ercolini, D., Blaiotta, G., Moschetti, G. & Coppola, S. (2002). Evaluation of PCR-DGGE analysis for molecular typing cheeses. *Annals of Microbiology* **52**, 81-87.



- Ercolini, D., Frisso, G., Mauriello, G., Salvatore, F. & Coppola, S. (2008).** Microbial diversity in Natural Whey Cultures used for the production of Caciocavallo Silano PDO cheese. *International Journal of Food Microbiology* **124**, 164-170.
- Ercolini, D., Hill, P. J. & Dodd, C. E. R. (2003).** Bacterial Community Structure and Location in Stilton Cheese. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 3540-3548.
- Ercolini, D., Mauriello, G., Blaiotta, G., Moschetti, G. & Coppola, S. (2004).** DGGE fingerprints of microbial succession during a manufacture of traditional water buffalo mozzarella cheese. *Journal of Applied Microbiology* **96**, 263-270.
- Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G. & Coppola, S. (2001).** The Potential of a Polyphasic PCR-DGGE Approach in Evaluating Microbial Diversity of Natural Whey Cultures for Water-Buffered Mozzarella Cheese Production: Bias of Culture-Dependent and Culture-Independent Analyses. *Systematic and Applied Microbiology* **24**, 610-617.
- Famelart, M. H., Bouillanne, C., Kobilinsky, A. & Desmazeaud, M. (1987).** Studies on *Brevibacterium linens* metabolism in fermentor. *Applied Microbiology and Biotechnology* **26**, 378-382.
- Famelart, M. H., Kobilinsky, A., Bouillanne, C. & Desmazeaud, M. J. (1987).** Influence of temperature, pH and dissolved oxygen on growth of *Brevibacterium linens* in a fermentor. *Applied Microbiology and Biotechnology* **25**, 442-448.
- Farkye, N. Y., Madkor, S. A. & Atkins, H. G. (1995).** Proteolytic abilities of some lactic acid bacteria in a model cheese system. *International Dairy Journal* **5**, 715-725.
- Feurer, C., Irlinger, F., Spinnler, H. E., Glaser, P. & Vallaes, T. (2004a).** Assessment of the rind microbial diversity in a farmhouse-produced vs a pasteurized industrially produced soft red-smear cheese using both cultivation and rDNA-based methods. *Journal of Applied Microbiology* **97**, 546-556.
- Feurer, C., Vallaes, T., Corrieu, G. & Irlinger, F. (2004b).** Does smearing inoculum reflect the bacterial composition of the smear at the end of the ripening of a French soft, red-smear cheese? *Journal of Dairy Science* **87**, 3189-3197.
- Fickers, P., Fudalej, F., Le Dall, M. T., Casaregola, S., Gaillardin, C., Thonart, P. & Nicaud, J. M. (2005).** Identification and characterisation of LIP7 and LIP8 genes encoding two extracellular triacylglycerol lipases in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Fungal Genetics and Biology* **42**, 264-274.
- Fickers, P., Le Dall, M. T., Gaillardin, C., Thonart, P. & Nicaud, J. M. (2003).** New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Microbiological Methods* **55**, 727-737.
- Fiedler, F., Schäffler, M. & Stackebrandt, E. (1981).** Biochemical and nucleic acid hybridisation studies on *Brevibacterium linens* and related strains. *Archives of microbiology* **129**, 85-93.

- Fleet, G. H. (2007).** Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology* **18**, 170-175.
- Flórez, A. B. & Mayo, B. (2006).** Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *International Journal of Food Microbiology* **110**, 165-171.
- Fournier, P., Guyaneux, L., Chasles, M. & Gaillardin, C. (1991).** Scarcity of *ars* sequences isolated in a morphogenesis mutant of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **7**, 25-36.
- Fox, P. F. & McSweeney, P. L. H. (2004).** Cheese, chemistry, physics and microbiology. General aspects. Elsevier Academic Press.
- Fox, P. F. & Wallace, J. M. (1997).** Formation of flavor compounds in cheese. *Advances in Applied Microbiology* **45**, 17-85.
- Freeman, W. M., Robertson, D. J. & Vrana, K. (2000).** Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *Biotechniques* **29**, 1042-1046.
- Furet, J.-P., Quéneé, P. & Tailliez, P. (2004).** Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* **97**, 197-207.
- Gadaga, T. H., Mutukumira, A. N. & Narvhus, J. A. (2001).** The growth and interaction of yeasts and lactic acid bacteria isolated from Zimbabwean naturally fermented milk in UHT milk. *International Journal of Food Microbiology* **68**, 21-32.
- Gaillardin, C. & Ribet, A. M. (1987).** LEU2 directed expression of beta-galactosidase activity and phleomycin resistance in *Yarrowia lipolytica*. *Current Genetics* **11**, 369-375.
- Gaillardin, C., Ribet, A. M. & Heslot, H. (1985).** Integrative transformation of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Current Genetics*, 49-58.
- Gavrish, E. Y., Vrauzova, V. I., Potekhina, N. V., Karasev, S. G., Poltnikova, E. G., Altyntseva, O. V., Korosteleva, L. V. & Evtushenko, L. I. (2004).** Three new species of *Brevibacteria*, *Brevibacterium antiquum* sp. nov., *Brevibacterium aurantiacum* sp. nov., *Brevibacterium permense* sp. nov. *Microbiology* **73**, 176-183.
- Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Snauwaert, C., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Cogan, T. M. & Swings, J. (2005).** *Corynebacterium mooreparkense*, a later heterotypic synonym of *Corynebacterium variabile*. *International Journal of System Evolution in Microbiology* **55**, 1129-1131.
- Gente, S., Larpin, S., Cholet, O., Gueguen, M., Vernoux, J.-P. & Desmasures, N. (2007).** Development of primers for detecting dominant yeasts in smear-ripened cheeses. *Journal of dairy research* **74**, 137-45.
- Gingeras, T. & Rosenow, C. (2000).** Studying microbial genomes with high-density oligonucleotide arrays. *ASM News* **66**, 463-469.

**Ginzinger, D. G. (2002).** Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* **30**, 503-512.

**Goerges, S., Mounier, J., Rea, M. C., Gelsomino, R., Heise, V., Beduhn, R., Cogan, T. M., Vancanneyt, M. & Scherer, S. (2008).** Commercial ripening starter microorganisms inoculated into cheese milk do not successfully establish themselves in the resident microbial ripening consortia of a south German red smear cheese. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 2210-2217.

**Gori, K., Mortensen, H. D., Arneborg, N. & Jespersen, L. (2007).** Ammonia production and its possible role as a mediator of communication for *Debaryomyces hansenii* and other cheese-relevant yeast species. *Journal of Dairy Science* **90**, 5032-5041.

**Götz, F., Zabielski, J., Philipson, L. & Lindberg, M. (1983).** DNA homology between the arsenate resistance plasmid pSX267 from *Staphylococcus xylosus* and the penicillinase plasmid pI258 from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* **9**, 126-137.

**Granjeaud, S., Bertucci, F. & Jordan, B. R. (1999).** Expression profiling: DNA arrays in many guises. *BioEssays* **21**, 781-790.

**Guéguen, M. (1995).** Les levures, agents indispensables en industries agro-alimentaires *Bulletin de la Société Française de Microbiologie* **10**, 273-278.

**Guéguen, M. & Schmidt, J. L. (1992).** *Les levures et Geotricum candidum*, Paris.

**Guillier, L., Stahl, V., Hezard, B., Notz, E. & Briandet, R. (2008).** Modelling the competitive growth between *Listeria monocytogenes* and biofilm microflora of smear cheese wooden shelves. *International Journal of Food Microbiology* **128**, 51-57.

**Guillot, A., Gitton, C., Anglade, P. & Mistou, M.-Y. (2003).** Proteomic analysis of *Lactococcus lactis*, a lactic acid bacterium. *Proteomics* **3**, 337-354.

**Gummalla, S. & Broadbent, J. R. (2001).** Tyrosine and Phenylalanine Catabolism by *Lactobacillus* Cheese Flavor Adjuncts. *Journal of Dairy Science* **84**, 1011-1019.

**Gvozdiak, O., Nogina, T. M. & Schumann, P. (1992).** Taxonomic study of the genus *Brachybacterium*: *Brachybacterium nesterenkovi* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**, 74-78.

**Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R. & Aebersold, R. (1999).** Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 1720-1730.

**Hansena, B. V., Houlberg, b. U. & Ardö, Y. (2001).** Transamination of branched-chain amino acids by a cheese related *Lactobacillus paracasei* strain *International Dairy Journal* **11**, 225-233

**Hassouna, M. & Guizani, N. (1995).** Evolution de la flore microbienne et des caractéristiques physico-chimiques au cours de la maturation du fromage tunisien de type Camembert fabriqué avec du lait pasteurisé. *In Revue. Association africaine de microbiologie*

et d'hygiène alimentaire, S., TUNISIE (1989) (ed.). *Microbiologie, hygiène alimentaire*, 14-23.

**Hein, I., Klein, D., Lehner, A., Bubert, A., Brandla, E. & Wagner, M. (2001).** Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay *Research in Microbiology* **152**, 37-46.

**Herve-Jimenez, L., Guillouard, I., Guedon, E., Boudebouze, S., Hols, P., Monnet, V., Maguin, E. & Rul, F. (2009).** Post-genomic analysis of *Streptococcus thermophilus* co-cultivated in milk with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*: involvement of nitrogen, purine and iron metabolisms. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 2062-2073.

**Herve-Jimenez, L., Guillouard, I., Guedon, E., Gautier, C., Boudebouze, S., Hols, P., Monnet, V., Rul, F. & Maguin, E. (2008).** Physiology of *Streptococcus thermophilus* during the late stage of milk fermentation with special regard to sulfur amino-acid metabolism. *Proteomics* **8**, 4273-4286.

**Hinfray, J. (1997).** Les puces à ADN *Biofutur* **166**, 1-15.

**Hoen, T., Peter, A. C., Turk, R., Boer, J. M., Sterrenburg, E., de Menezes, R. X., van Ommen, G.-J. B. & den Dunnen, J. T. (2004).** Intensity-based analysis of two-colour microarrays enables efficient and flexible hybridization designs. *Nucleic Acids Research*. **32**, e41.

**Holzappel, W. H., Geisen, R. & Schillinger, U. (1995).** Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology* **24**, 343-362

**Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J. & Schillinger, U. (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition* **73**, 365S-373S.

**Hoppe-Seyler, T. S., Jaeger, B., Bockelmann, W., Noordman, W. H., Geis, A. & Heller, K. J. (2004).** Molecular identification and differentiation of *Staphylococcus* species and strains of cheese origin. *Systematic Applied Microbiology* **27**, 211-8.

**Hyde, A. J., Parisot, J. I., McNichol, A. & Bonev, B. B. (2006).** Nisin-induced changes in *Bacillus* morphology suggest a paradigm of antibiotic action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 19896-19901.

**Irlinger, F. (2000).** Caractérisation phénotypique et moléculaire de la diversité des bactéries d'intérêt technologique, de la surface des fromages. Thèse de doctorat, Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris.

**Irlinger, F. (2008).** Safety assessment of dairy microorganisms: Coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology* **126**, 302-310.

**Irlinger, F., Bimet, F., Delettre, J., Lefevre, M. & Grimont, P. A. D. (2005).** *Arthrobacter bergerei* sp. nov. and *Arthrobacter arilaitensis* sp. nov., novel coryneform species isolated

from the surfaces of cheeses. *International Journal of Systematic Evolution and Microbiology* **55**, 457-462.

**Irlinger, F. & Morvan, A. (1997).** Taxonomic characterization of coagulase-negative staphylococci in ripening flora from traditional french cheese. *Systematic and Applied Microbiology* **20**, 319-328.

**Irlinger, F. & Mounier, J. (2009).** Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology* **In Press, Corrected Proof**.

**Iseppi, R., Pilati, F., Marini, M., Toselli, M., de Niederhäusern, S., Guerrieri, E., Messi, P., Sabia, C., Manicardi, G., Anacarso, I. & Bondi, M. (2008).** Anti-listerial activity of a polymeric film coated with hybrid coatings doped with Enterocin 416K1 for use as bioactive food packaging. *International Journal of Food Microbiology* **123**, 281-287.

**Izquierdo, E., Marchioni, E., Aoude-Werner, D., Hasselmann, C. & Ennahar, S. (2009).** Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multi-bacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology* **26**, 16-20.

**Jacobsen, T. & Poulsen, O. M. (1995).** Comparison of lipases from different strains of the fungus *Geotrichum candidum*. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism* **1257**, 96-102.

**Jameson, J. E. (1962).** A discussion of the dynamics of Salmonella enrichment. *Journal of Hygiene* **60**, 193-207.

**Jany, J.-L. & Barbier, G. (2008).** Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiology* **25**, 839-848.

**Jean-Claude Jauniaux, M. G. (1990).** *GAP1*, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* **190**, 39-44.

**Juillard, V., Foucaud, C., Desmazeaud, M. & Richard, J. (1996).** Utilization of nitrogen sources during growth of *Lactococcus lactis* in milk. *Le Lait* **76**, 13-24.

**Juillard, V., Le Bars, D., Kunji, E. R., Konings, W. N., Gripon, J. C. & Richard, J. (1995).** Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 3024-3030.

**Kagkli, D.-M., Bonnarme, P., Neugeglise, C., Cogan, T. M. & Casaregola, S. (2006).** L-Methionine degradation pathway in *Kluyveromyces lactis*: Identification and functional analysis of the genes encoding L-methionine aminotransferase. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 3330-3335.

**Kohlwein, S. D. & Paltauf, F. (1984).** Uptake of fatty acids by the yeasts, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces lipolytica*. *Biochimica and Biophysica Acta* **792**, 310-317.

**Komprda, T., Neznalová, J., Standara, S. & Bover-Cid, S. (2001).** Effect of starter culture and storage temperature on the content of biogenic amines in dry fermented sausage polican. *Meat Science* **59**, 267-276.

- Kreger van Rij, N. (1984).** *The yeasts, a taxonomic study* Elsevier Science & Technology.
- Kusch, H., Engelmann, S., Bode, R., Albrecht, D., Morschhäuser, J. & Hecker, M. (2008).** A proteomic view of *Candida albicans* yeast cell metabolism in exponential and stationary growth phases. *International Journal of Medical Microbiology* **298**, 291-318.
- Lagoda, P. J. L. & Regad, F. (2000).** Les puces à ADN : outils pour une nouvelle vision de la diversité et des ressources génétiques. *Cahiers Agricultures, Cahiers d'études et de recherches francophones.*, Montpellier, 329-340.
- Lanciotti, R., Vannini, L., Lopez, C. C., Gobbetti, M. & Guerzoni, M. E. (2005).** Evaluation of the ability of *Yarrowia lipolytica* to impart strain-dependent characteristics to cheese when used as a ripening adjunct. *International Journal of Dairy Technology* **58**, 89-99.
- Larpin, S., Mondoloni, C., Goerges, S., Vernoux, J.-P., Guéguen, M. & Desmasures, N. (2006).** *Geotrichum candidum* dominates in yeast population dynamics in Livarot, a French red-smear cheese. *FEMS Yeast Research* **6**, 1243-1253.
- Law, J. & Haandrikman, A. (1997).** Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* **7**, 1-11.
- Le Bourhis, A.-G., Doré, J., Carlier, J.-P., Chamba, J.-F., Popoff, M.-R. & Tholozan, J.-L. (2007).** Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. *International Journal of Food Microbiology* **113**, 154-163.
- Le Bourhis, A.-G., Saunier, K., Dore, J., Carlier, J.-P., Chamba, J.-F., Popoff, M.-R. & Tholozan, J.-L. (2005).** Development and validation of PCR primers to assess the diversity of *Clostridium* spp. in cheese by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 29-38.
- Le Dall, M. T., Nicaud, J. M. & Gaillardin, C. (1994).** Multiple-copy integration in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Current Genetics* **1**, 38-44.
- Le Graët, Y., Brûlé, G., Maubois, J. L. & Oeuvarard, G. (1986).** Répartition et évolution des éléments minéraux au cours de l'affinage des fromages à pâte cuite type Beaufort. *Le Lait* **66**, 391-404.
- Leclercq-Perlat, M.-N., Oumer, A., Bergere, J.-L., Spinnler, H.-E. & Corrieu, G. (1999).** Growth of *Debaryomyces hansenii* on a bacterial surface-ripened soft cheese. *Journal of Dairy Research* **66**, 271-281.
- Leclercq-Perlat, M. N., Buono, F., Lambert, D., Spinnler, H. E. & Corrieu, G. (2004).** Controlled Production of Camembert-Type Cheeses : Part I. Microbiological and physicochemical evolutions. *Journal of Dairy Research* **71**, 346-354.
- Lecocq, J., Gueguen, M. & Coiffier, O. (1996).** Importance de l'association *Geotrichum candidum*-*Brevibacterium linens* pour l'affinage de fromages à croûte lavée. *Science des Aliments* **16**, 317-327.

**Lee, C.-W., Lucas, S. & Desmazeaud, M. J. (1985).** Phenylalanine and tyrosine catabolism in some cheese coryneform bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **26**, 201-205.

**Lefresne, G. (2000).** *Identification aromatique par phénotypie et ribotypie de la flore corynéforme de la surface des fromages.* Thèse de doctorat, Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris.

**Lennon, G. G. & Lehrach, H. (1991).** Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries. *Trends in Genetics* **7**, 314-317.

**Lenoir, J., Lambert, G., Schmidt, J. L. & Tourneur, C. (1985).** La maîtrise du bioréacteur fromage. *Biofutur* **41**, 23-50.

**Liang, P. & Pardee, A. B. (1992).** Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**, 967-971.

**Liu, L., O'Conner, P., Cotter, P. D., Hill, C. & Ross, R. P. (2008).** Controlling *Listeria monocytogenes* in cottage cheese through heterologous production of enterocin A by *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology* **104**, 1059-1066.

**Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001).** Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* **25**, 402-408.

**Loessner, M., Guenther, S., Steffan, S. & Scherer, S. (2003).** A pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *listeria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 1854-1857.

**Lortal, S. & Chapot-Chartier, M.-P. (2005).** Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal* **15**, 857-871.

**Lucia, V., Daniela, B. & Rosalba, L. (2001).** Use of Fourier transform infrared spectroscopy to evaluate the proteolytic activity of *Yarrowia lipolytica* and its contribution to cheese ripening. *International Journal of Food Microbiology* **69**, 113-123.

**Lücke, F.-K. (2000).** Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science* **56**, 105-115.

**Mader, U., Homuth, G., Scharf, C., Buttner, K., Bode, R. & Hecker, M. (2002).** Transcriptome and Proteome Analysis of *Bacillus subtilis* Gene Expression Modulated by Amino Acid Availability. *Journal of Bacteriology* **184**, 4288-4295.

**Maligoy, M., Mercade, M., Coccagn-Bousquet, M. & Loubiere, P. (2008).** Transcriptome analysis of *Lactococcus lactis* in coculture with *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 485-494.

**Maoz, A., Mayr, R. & Scherer, S. (2003).** Temporal stability and biodiversity of two complex antilisterial cheese-ripening microbial consortia. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 4012-4018.

- Marcellino, N. & Benson, D. R. (1992).** Scanning electron and light microscopic study of microbial succession on Bethlehem St. Nectaire cheese. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 3448-3454.
- Marilley, L. & Casey, M. G. (2004).** Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology* **90**, 139-159.
- Masoud, W. & Jakobsen, M. (2005).** The combined effects of pH, NaCl and temperature on growth of cheese ripening cultures of *Debaryomyces hansenii* and coryneform bacteria. *International Dairy Journal* **15**, 69-77.
- Massa, S. & Turtura, G. C. (1989).** Identification of Staphylococci and Micrococci isolated from hard cheese made from raw cow and sheep milk. *Milchwissenschaft* **44**, 219-221.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Takada, T. & Tanaka, R. (2004).** Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 7220-7228.
- Mauriello, G., Moio, L., Genovese, A. & Ercolini, D. (2003).** Relationships between flavoring capabilities, bacterial composition, and geographical origin of natural whey cultures used for traditional water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. *Journal of Dairy Science* **86**.
- Mc Sweeney, P. L. H. (2004).** Biochemistry of cheese ripening *International Journal of Dairy Technology* **57**, 127-144.
- 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.
- Monnet, C., Ulve, V., Sarthou, A.-S. & Irlinger, F. (2008).** Extraction of RNA from cheese without prior separation of microbial cells. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 5724-5730.
- Morín, M., Monteoliva, L., Insenser, M., Gil, C. & Domínguez, Á. (2007).** Proteomic analysis reveals metabolic changes during yeast to hypha transition in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Mass Spectrometry* **42**, 1453-1462.
- Mounier, J., Gelsomino, R., Goerges, S., Vancanneyt, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Scherer, S., Swings, J., Fitzgerald, G. F. & Cogan, T. M. (2005).** Surface microflora of four smear-ripened cheeses. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 6489-6500.
- Mounier, J., Goerges, S., Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Brennan, N. M., Scherer, S., Swings, J., Fitzgerald, G. F. & Cogan, T. M. (2006).** Sources of the adventitious microflora of a smear-ripened cheese. *J. Appl. Microbiol.* **101**, 668-681.



- Mounier, J., Monnet, C., Jacques, N., Antoinette, A. & Irlinger, F. (2009).** Assessment of the microbial diversity at the surface of Livarot cheese using culture-dependent and independent approaches. *Journal of Food Microbiology*, *In press*.
- Mounier, J., Monnet, C., Vallaëys, T., Arditì, R., Sarthou, A.-S., Helias, A. & Irlinger, F. (2008).** Microbial interactions within a cheese microbial community. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 172-181.
- Mounier, J., Rea, M. C., O'Connor, P. M., Fitzgerald, G. F. & Cogan, T. M. (2007).** Growth characteristics of *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, and *Staphylococcus* spp. Isolated from Surface-Ripened Cheese. *Applied Environmental Microbiology* **73**, 7732-7739.
- Nagase, N., Sasaki, A., Yamashita, K., Shimizu, A., Wakita, Y., Kitai, S. & Kawano, J. (2002).** Isolation and species distribution of *Staphylococci* from animal and human skin. *Journal of Veterinary Medical Science* **64** 245-250.
- Narvhus, J. A. & Gadaga, T. H. (2003).** The role of interaction between yeasts and lactic acid bacteria in African fermented milks: a review. *International Journal of Food Microbiology* **86**, 51-60.
- Neueglise, C., Chalvet, F., Wincker, P., Gaillardin, C. & Casaregola, S. (2005).** Mutator-Like Element in the Yeast *Yarrowia lipolytica* Displays Multiple Alternative Splicings. *Eukaryotic Cell* **4**, 615-624.
- Neueglise, C., Feldmann, H., Bon, E., Gaillardin, C. & Casaregola, a. S. (2002).** Genomic evolution of the long terminal repeat retrotransposons in hemiascomycetous yeasts. *Genome Research* **12**, 930-943.
- Noomen, A. (1983).** Proteolysis in cheese: sources and consequences. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **37**, 96-97.
- Noordman, W. H., Reissbrodt, R., Bongers, R. S., Rademaker, J. L. W., Bockelmann, W. & Smit, G. (2006).** Growth stimulation of *Brevibacterium* sp. by siderophores. *Journal of Applied Microbiology* **101**, 637-646.
- O'Sullivan, L., O'Connor, E. B., Ross, R. P. & Hill, C. (2006).** Evaluation of live-culture-producing lactacin 3147 as a treatment for the control of *Listeria monocytogenes* on the surface of smear-ripened cheese. *Journal of Applied Microbiology* **100**, 135-143.
- Ogier, J.-C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P. & Delacroix-Buchet, A. (2002).** Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 3691-3701.
- Ogier, J. C., Lafarge, V., Girard, V., Rault, A., Maladen, V., Gruss, A., Leveau, J. Y. & Delacroix-Buchet, A. (2004).** Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 5628-5643.

- Oh, D. H. & Marshall, D. L. (1993).** Antimicrobial activity of ethanol, glycerol monolaurate or lactic acid against *Listeria monocytogenes*. *International journal of food microbiology* **20**, 239-246
- Olson, N. F. (1990).** The impact of lactic acid bacteria on cheese flavor. *FEMS Microbiology Letters* **87**, 131-147.
- Ortiz de Apocada, M. J., Selgas, M. D. & Ordonez, J. A. (1993).** Lipolytic and proteolytic activities of Micrococci isolated from cheese. *Food reseach International* **26**, 319-325.
- Palkova, Z., Devaux, F., Icicova, M., Minarikova, L., Le Crom, S. & Jacq, C. (2002).** Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development. *Molecular Biology of the cell* **13**, 3901-14.
- Palkova, Z. & Forstova, J. (2000).** Yeast colonies synchronise their growth and development. *Journal of Cell Science* **113**, 1923-1928.
- Palkova, Z., Janderova, B., Gabriel, J., Zikanova, B., Pospisek, M. & Forstova, J. (1997).** Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* **390**, 532-536.
- Palkova, Z. & Vachova, L. (2003).** Ammonia signaling in yeast colony formation. *Internatinal Review of Cytology* **225**, 229-72.
- Palkova, Z. & Vachova, L. (2006).** Life within a community: benefit to yeast long-term survival. *FEMS Microbiology Reviews* **30**, 806-824.
- Papamanoli, E., Kotzekidou, P., Tzanetakis, N. & Litopoulou-Tzanetaki, E. (2002).** Characterization of Micrococcaceae isolated from dry fermented sausage. *Food Microbiology* **19**, 441-449.
- Papanikolaou, S. & Aggelis, G. (2003).** Modeling lipid accumulation and degradation in *Yarrowia lipolytica* cultivated on industrial fats. *Current Microbiology* **46**, 398-402.
- Parayre, S., Falentin, H., Madec, M.-N., Sivieri, K., Le Dizes, A.-S., Sohier, D. & Lortal, S. (2007).** Easy DNA extraction method and optimisation of PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis to identify the predominant high and low GC-content bacteria from dairy products. *Journal of Microbiological Methods* **69**, 431-441.
- Patrignani, F., Lanciotti, R., Mathara, J. M., Guerzoni, M. E. & Holzapfel, W. H. (2006).** Potential of functional strains, isolated from traditional Maasai milk, as starters for the production of fermented milks. *International Journal of Food Microbiology* **107**, 1-11.
- Pearce, L. & Flint, S. (2003).** *Streptococcus thermophilus*. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*, pp. 2577-2582. Edited by Roginski, H., Fuquay, J. W. & Fox, P. F. London: Academic Press.
- Pennington, S. R., Wilkins, M. R., Hochstrasser, D. F. & Dunn, M. J. (1997).** Proteome analysis: from protein characterization to biological function. *Trends in Cell Biology* **7**, 168-173.

- Pham, T. K. & Wright, P. C. (2008).** The Proteomic Response of *Saccharomyces cerevisiae* in Very High Glucose Conditions with Amino Acid Supplementation. *J. Proteome Res.* **7**, 4766-4774.
- Pignède, G., Wang, H., Fudalej, F., Gaillardin, C., Seman, M. & Nicaud, J.-M. (2000).** Characterization of an Extracellular Lipase Encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Bacteriology* **182**, 2802-2810.
- Poitras, E. & Houde, A. (2002).** La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology* **2**, 2-11.
- Rademaker, J. L. W., Peinhopf, M., Rijnen, L., Bockelmann, W. & Noordman, W. H. (2005).** The surface microflora dynamics of bacterial smear-ripened Tilsit cheese determined by T-RFLP DNA population fingerprint analysis. *International Dairy Journal* **15**, 785-794.
- Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W. & Nitsche, A. (2004).** Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **313**, 856-862.
- Ramet, J. P. (1997).** Technologie comparée des différents types de caillé. In Eck, A. & Gillis, J. C. (ed.). *Le fromage*. Technique et Documentation, Lavoisier Paris, 334-364.
- Randazzo, C. L., Torriani, S., Akkermans, A. D. L., de Vos, W. M. & Vaughan, E. E. (2002).** Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 1882-1892.
- Randazzo, C. L., Vaughan, E. E. & Caggia, C. (2006).** Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: Microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR-DGGE analyses. *International Journal of Food Microbiology* **109**, 1-8.
- Rattray, F. P. & Fox, P. F. (1999).** Aspects of enzymology and biochemical properties of *Brevibacterium linens* relevant to cheese ripening : A review. *Journal of Dairy Science* **82**, 891-909.
- Rea, M. C., Gorges, S., Gelsomino, R., Brennan, N. M., Mounier, J., Vancanneyt, M., Scherer, S., Swings, J. & Cogan, T. M. (2007).** Stability of the Biodiversity of the Surface Consortia of Gubbeen, a Red-Smear Cheese. *Journal of Dairy Science* **90**, 2200-2210.
- Religio, A., Schwager, C., Richter, A., Ansorge, W. & Valcarcel, J. (2002).** Optimization of oligonucleotide-based DNA microarrays. *Nucleic Acids Research* **30**, 51-.
- Reviriego, C., Fernández, L. & Rodríguez, J. M. (2007).** A food-grade system for production of pediocin PA-1 in nisin-producing and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains: application to inhibit *Listeria* growth in a cheese model system. *Journal of Food Protection* **70**, 2512-2517.
- Robinson, R. K., Tamime, A. Y. & Wszolek, M. (2002).** *Dairy Microbiology Handbook, the Microbiology of Milk and Milk Products*, New York.

- Roostita, R. & Fleet, G. H. (1996).** The occurrence and growth of yeasts in Camembert and Blue-veined cheeses *International Journal of Food Microbiology* **28**, 393-404.
- Roudot-Algaron, F. & Yvon, M. (1998).** Le catabolisme des acides aminés aromatiques et des acides aminés à chaîne ramifiée chez *Lactococcus lactis*. *Le Lait* **78**, 23-30.
- Saizieu, A. d., Certa, U., Warrington, J., Gray, C., Keck, W. & Mous, J. (1998).** Bacterial transcript imaging by hybridization of total RNA to oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnology* **16**, 45-48.
- Saubusse, M., Millet, L., Delbès, C., Callon, C. & Montel, M. C. (2007).** Application of single strand conformation polymorphism -PCR method for distinguishing cheese bacterial communities that inhibit *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **116**, 126-135.
- Schena, M. (1999).** DNA microarray: a practical approach. In Press, O. u. (ed.)
- Schmittgen, T. D. & Zakrajsek, B. A. (2000).** Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **46**, 69-81.
- Schmittgen, T. D., Zakrajsek, B. A., Mills, A. G., Gorn, V., Singer, M. J. & Reed, M. W. (2000).** Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction to Study mRNA Decay: Comparison of Endpoint and Real-Time Methods. *Analytical Biochemistry* **285**, 194-204.
- Schubert, K., Ludwig, W., Springer, N., Kroppenstedt, R. M., Accolas, J.-P. & Fiedler, F. (1996).** Two coryneform bacteria isolated from the surface of French Gruyere and Beaufort Cheeses are new species of the genus *Brachybacterium*: *Brachybacterium alimentarium* sp. nov. and *Brachybacterium tyrofermentans* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**, 81-87.
- Selao, T. T., Nordlund, S. & Norén, A. (2008).** Comparative proteomic studies in *Rhodospirillum rubrum* grown under different nitrogen conditions. *Journal of Proteome Research* **7**, 3267-3275.
- Sieuwerts, S., de Bok, F. A. M., Hugenholtz, J. & van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2008).** Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 4997-5007.
- Song, Y., Liu, C. & Finegold, S. M. (2004).** Real-time PCR quantitation of Clostridia in feces of autistic children. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 6459-6465.
- Soullignac, L. (1995).** Propriétés des levures fromagères. Influence des sources de carbone utilisées sur leurs aptitudes à désacidifier les caillés et à former des composés d'arôme. *Thèse de doctorat, Institut National Agronomique de Paris-Grignon, Paris*
- Southern, E. M. (1974).** An improved method for transferring nucleotides from electrophoresis strips to thin layers of ion-exchange cellulose. *Analytical Biochemistry* **62**, 317-318.

**Spinnler, H. E. & Corrieu, G. (1989).** Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. *Journal of Dairy Research* **56**, 755-764.

**Stackebrandt, E., Rainey, F. A. & WardRainey, N. L. (1997).** Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 479-491.

**Stiles, M. E. & Holzapfel, W. H. (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* **36**, 1-29.

**Sturino, J. M., Klaenhammer, T. R., Laskin, A. I., Bennett, J. W. & M., G. G. (2004).** Bacteriophage defense systems and strategies for lactic acid bacteria. *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, 331-378.

**Suzzi, G., Lanorte, M. T., Galgano, F., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lanciotti, R. & Guerzoni, M. E. (2001).** Proteolytic, lipolytic and molecular characterisation of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese. *International Journal of Food Microbiology* **69**, 69-77.

**Talon, R., Lebert, I., Lebert, A., Leroy, S., Garriga, M., Aymerich, T., Drosinos, E. H., Zanardi, E., Ianieri, A., Fraqueza, M. J., Patarata, L. & Lauková, A. (2007).** Traditional dry fermented sausages produced in small-scale processing units in Mediterranean countries and Slovakia. 1: Microbial ecosystems of processing environments. *Meat Sci.* **77**, 570-579.

**Theis, T., Skurray, R. A. & Brown, M. H. (2007).** Identification of suitable internal controls to study expression of a *Staphylococcus aureus* multidrug resistance system by quantitative real-time PCR. *J Microbiol Methods* **70**, 355-62.

**Urbach, G. (1995).** Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. *International Dairy Journal* **5**, 877-903.

**Váchová, L., Kucerová, H., Devaux, F., Úlehlová, M. & Palková, Z. (2009).** Metabolic diversification of cells during the development of yeast colonies. *Environmental Microbiology* **11**, 494-504.

**Valance, C. (1996).** Amélioration des qualités organoleptiques du Munster par sélection de la flore d'affinage. *Thèse de doctorat, Institut National Agronomique de Paris-Grignon*, Paris

**Valdes-Stauber, N., Scherer, S. & Seiler, H. (1997).** Identification of yeasts and coryneform bacteria from the surface microflora of brick cheeses. *International Journal of Food Microbiology* **34**, 115-129.

**van den Tempel, T. & Jakobsen, M. (2000).** The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. *International Dairy Journal* **10**, 263-270.

**Van der Walt, J. & Von Arx, J. (1980).** The yeast *Yarrowia* gen. nov. **46**.

- van Hal, N., Vorst, O., van Houwelingen, A., Kok, E., Peijnenburg, A., Aharoni, A., van Tunen, A. & Keijer, J. (2000).** The application of DNA microarrays in gene expression analysis. *Journal of Biotechnology* **78**, 271-280.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. & Speleman, F. (2002).** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**.
- Vassal, L., Monnet, V., Le Bars, D., Roux, C. & Gripon, J.-C. (1986).** Relation entre le pH, la composition chimique et texture des fromages de type Camembert. *Le Lait* **64**.
- Viljoen, B. C. (2001).** The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology* **69**, 37-44.
- Viljoen, B. C., Khoury, A. R. & Hattingh, A. (2003).** Seasonal diversity of yeasts associated with white-surface mould-ripened cheeses. *Food Research International* **36**, 275-283.
- Volkov, R. A., Panchuk, I. I. & Schoffl, F. (2003).** Heat-stress-dependency and developmental modulation of gene expression: the potential of house-keeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real-time RT-PCR. *Journal of Experimental Botany* **54**, 2343-2349.
- Weinbauer, M. G. (2004).** Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews* **28**, 127-181.
- Weinbauer, M. G. & Rassoulzadegan, F. (2004).** Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environmental Microbiology* **6**, 1-11.
- Wickerham, L. J., Kurtzman, C. P. & Herman, A. I. (1970).** Sexual reproduction in *Candida lipolytica*. *Science* **167**, 1141.
- Winer, J., Jung, C. K. S., Shackel, I. & Williams, P. M. (1999).** Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Analytical Biochemistry* **270**, 41-49.
- Won, J. I., Yang, Y. L., Kim, B. G. & Choi, C. Y. (1993).** Adaptive control of specific growth rate based on proton production in anaerobic fed-batch culture. *Biotechnology Letters* **15**, 511-516.
- Xu, S., Boylston, T. D. & Glatz, B. A. (2005).** Conjugated Linoleic Acid Content and Organoleptic Attributes of Fermented Milk Products Produced with Probiotic Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 9064-9072.
- Yang, Y., Buckley, M., Dudoit, S. & Speed, T. (2002).** Comparison of methods for image analysis on cDNA microarray data. *Journal of Computational and Graphical Statistics* **11**, 1-40.
- Yarmush, M. L. & Jayaraman, A. (2002).** Advances in proteomic technologies. *Annual Review of Biomedical Engineering* **4**, 349-373.

**Yarrow, D. (1972).** Four new combinations in Yeasts. **38**.

**Yvon, M., Chambellon, E., Bolotin, A. & Roudot-Algaron, F. (2000).** Characterization and role of the branched-chain aminotransferase (BcaT) isolated from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCDO 763. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 571-577.

**Yvon, M. & Rijnen, L. (2001).** Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal* **11**, 185-201.

**Zhang, J. & Byrne, C. D.. (1999).** Differential priming of RNA templates during cDNA synthesis markedly affects both accuracy and reproducibility of quantitative competitive reverse-transcriptase PCR. *Biochem. J.* **337**, 231–241.

**Zikanova, B., Kuthan, M., Ricicova, M., Forstova, J. & Palkova, Z. (2002).** Amino acids control ammonia pulses in yeast colonies. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **294**, 962-967.

**Zirnstein, G. & Hutkins, R. (2000).** *Streptococcus: Streptococcus thermophilus*. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, pp. 2127–2133. Edited by Robinson, R. K., Batt, C. A. & Patel, P. D. London: Academic Press.

**Zouraria, A., Accolasa, J. P. & Desmazeauda, M. J. (1991).** Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review *Le Lait* **72**, 1-34.

L'adaptation des micro-organismes à leur environnement dépend à la fois de leurs aptitudes à faire face aux paramètres physico-chimiques propre au fromage et à dégrader les substrats présents dans le milieu, tout en étant en interaction avec d'autres espèces microbiennes. La maîtrise de la dynamique des populations reste un enjeu majeur dans le but de maîtriser les étapes de la fabrication du fromage. Cela permettrait, une fois la flore sélectionnée, de raccourcir le temps d'affinage de manière significative, tout en conservant, voire en améliorant les qualités organoleptiques et sanitaires du fromage. De nombreux travaux ont mis en évidence l'incapacité d'adaptation de la flore inoculée, qui se retrouve en compétition avec la flore indigène de l'environnement fromager. L'objectif de ce travail était de mieux comprendre le métabolisme adaptatif de la levure ubiquitaire du fromage *Yarrowia lipolytica*. Dans un premier temps, nous avons choisi d'étudier le métabolisme de la levure en mono-culture en se focalisant sur des voies métaboliques clés de l'affinage, le catabolisme du lactate et des acides aminés. La combinaison des techniques moléculaires, microbiologiques, biochimiques et protéomiques a permis de confirmer une réelle préférence de la levure pour les acides aminés, l'absence de ces derniers pouvant provoquer un état de stress oxydant chez *Y. lipolytica*. De plus, une corrélation entre la consommation d'acides aminés et la production/accumulation d'ammoniac par la levure a été mise en évidence. L'ammoniac aurait un rôle i) dans l'alcalinisation du milieu, une étape essentielle dans la fabrication du fromage pour l'implantation de la flore d'affinage acido-sensible ; ii) de molécule signal entre les levures. Dans un second temps, l'étude de la levure en interaction avec deux bactéries *Lactococcus lactis* et *Staphylococcus xylosus* a été réalisée. Une première étape a consisté à comprendre les phénomènes d'interactions dans un milieu chimiquement défini, par une approche ciblée (RT-PCR quantitative) sur des gènes impliqués dans des voies de dégradation du lactate, du pyruvate et des acides aminés. L'étude en culture mixte a permis de mettre en évidence des phénomènes d'interactions entre micro-organismes en termes de croissance, mais également de complémentarité métabolique. En effet, les principaux gènes impliqués dans le catabolisme des acides aminés sont réprimés chez la levure en présence de *S. xylosus*. De plus, l'expression de la lactate déshydrogénase de la levure est induite par la production de lactate par les deux bactéries. Dans une seconde étape, l'étude de la levure en co-culture a été réalisée dans un milieu modèle fromager, le rétentat. Afin d'obtenir une information complète de l'adaptation métabolique de la levure aux différentes associations, une approche globale par puce à ADN a été retenue. On observe un état de stress oxydatif chez la levure en présence de *S. xylosus*, ainsi qu'une modification du fonctionnement mitochondriale et de l'expression des gènes de la chaîne respiratoire.



The adaptation of microorganisms to their environment depends on both their ability to cope with the physico-chemical characteristics of the cheese and their ability to degrade substrates in their environment, while interacting with other microbial species. Controlling the dynamics of populations remains a major challenge in order to control the different steps of cheese production. The flora being selected, this could enable, to shorten the ripening time significantly while maintaining or even improving the microbial and organoleptic qualities of the cheese. Many studies have highlighted the inability of adaptation of the inoculated microorganisms, which are in competition with the natural flora of the cheese. The objective of this work was to better understand the adaptive metabolism of the ubiquitous yeast *Yarrowia lipolytica*. As a first step, we chose to study the metabolism of this yeast in monoculture focusing on key metabolic pathways of cheese ripening, lactate and amino acids catabolism. The combination of molecular, microbiological, biochemical and proteomics techniques has helped to confirm a real preference of this yeast for amino acids. The lack of amino acids induces an oxidative stress in *Y. lipolytica*. Moreover, a correlation between the consumption of amino acids and the production/accumulation of ammonia by the yeast has been highlighted. Ammonia could have a role i) in the alcalinisation of the medium, an essential step in the manufacture of cheese for the development of the acid-sensitive flora ii) as a signal molecule between yeasts. In a second step, the study of the interaction in yeast with 2 bacteria was performed: *Lactococcus lactis* and *Staphylococcus xylosum*. A first step was to understand the phenomena of interaction in a chemically defined medium, using a targeted approach (quantitative RT-PCR) on genes involved in the catabolism of lactate, pyruvate or amino acids. The mixed culture study allows the identification of interactions phenomena between micro-organisms in terms of growth or metabolic complementarity. Indeed, in the presence of *S. xylosum* major genes involved in the amino acids catabolism are repressed in the yeast. In addition, the expression of *Y. lipolytica* lactate dehydrogenase is induced by the production of lactate by both bacteria. In a second step, the study of yeast coculture was conducted in a model cheese matrix called “retentat”. In order to obtain a comprehensive information of the metabolic adaptation of the yeast to various associations, a DNA microarray technique was used. This study underlines the induction of an oxidative stress response in yeast in the presence of *S. xylosum*, and a modification of mitochondrial function as well as a repression of gene expression involved in the respiratory chain.